

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**“ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES FISICOQUÍMICAS Y
ECOLÓGICAS EN LOS MECANISMOS DE ANTAGONISMO ENTRE
HONGOS OCRATOXIGÉNICOS PRESENTES EN CEREZAS DE CAFÉ Y
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

I.B.I JOSUE URIEL AMADOR HERNANDEZ

DIRECTOR **Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda**
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

ASESORES

- ❖ **M.C. Roberto Lazzarini Lechuga**
Universidad Autónoma Metropolitana
- ❖ **Dra. Isabelle Gaime Perraud**
Institut de Recherche pour le Développement
(IRD-Francia)

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana de la Unidad Iztapalapa está incluida en el programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC) del CONACyT con la referencia 001465, posgrado categorizado de calidad internacional.

Josué Uriel Amador Hernández agradece el apoyo de CONACyT por la beca recibida para obtener el grado Maestría en Biotecnología (CVU 785931).

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT- México) y a la Agencia Nacional de Investigación (ANR-Francia) en el marco del proyecto “Use of lactic acid bacteria for the control of level of ochratoxin in coffee beans Proyecto FONCICYT 273656”, por los múltiples apoyos para estancias, congresos y financiamiento durante el trabajo de investigación.

PARTENAIRES/ SOCIOS



Ciudad de México 17 de julio de 2019.

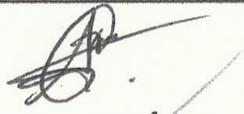
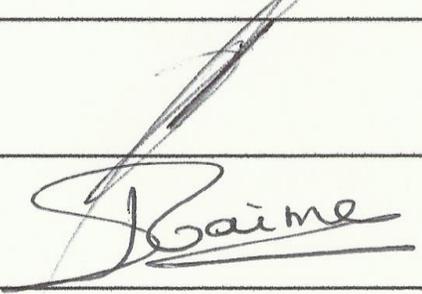
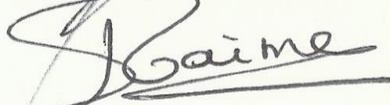
El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES FISICOQUÍMICAS Y ECOLÓGICAS EN LOS MECANISMOS DE ANTAGONISMO ENTRE HONGOS OCRATOXIGÉNICOS PRESENTES EN CEREZAS DE CAFÉ Y BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTÓ:
I.B.I JOSUE URIEL AMADOR HERNANDEZ

DIRECTOR	Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
ASESORES	<ul style="list-style-type: none"> ❖ M. en C. Roberto Lazzarini Lechuga Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa ❖ Dra. Isabelle Gaime Perraud Institut de recherche pour le développement, IRD, Francia

JURADO	FIRMA/SIGNATURE
Presidente: Dra. Gabriela María Rodríguez Serrano Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa	
Secretario: Dra. Angélica Román Guerrero Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa	
Vocal: M. en C. Roberto Lazzarini Lechuga Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa	
Vocal: Dra. Isabelle Gaime Perraud Institut de recherche pour le développement, IRD, Francia	

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a dios por permitirme cumplir una meta más en mi vida profesional, por cuidarme y guiarme en el camino y poder darme la paciencia y el ímpetu necesario para seguir adelante.

Agradezco al Institut de Recherche pour le Développement, IRD en Francia por la beca otorgada durante mi estancia (Mayo–Julio 2018).

Agradezco a mi director de tesis Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por compartir sus conocimientos, experiencia y darme sus consejos para llevar acabo la realización de este trabajo, y poder llegar a la meta.

Agradezco a mi Co-asesor el M. en C. Roberto Lazzarini Lechuga por compartirme su conocimiento y experiencia, guiarme y capacitarme en temas y equipos que no eran de mi conocimiento, pero fundamentales para el desarrollo de este trabajo de investigación. Por su amistad, risas y regaños que me llevaron a obtener los mejores resultados.

Así como a mis asesores la Dra. Angélica Román Guerrero por facilitarme e instruirme en la capacitación y uso de equipos necesarios para la realización de este trabajo de investigación.

A la Dra. Isabelle Gaimé Perraud, por compartir sus conocimientos, experiencia y amistad durante la realización de este trabajo, además le agradezco por el gran apoyo y por ser mi guía durante mi estancia de investigación en Francia (Montpellier y Marseille).

Al Dr. Noel Durand, por su gran apoyo en mi estancia en el CIRAD Francia, por sus consejos, conocimientos, capacitación y amistad. A la Dra. Angélique Fontaine por el apoyo para mi capacitación y facilitación de equipo necesario para la realización de mi trabajo de investigación en el CIRAD Francia y la Universidad de Montpellier. A la Dra. Nadira Taieb y al ingeniero y gran amigo mío Sebastien Frago por la capacitación y apoyo durante mi estancia el IRD, IMBE, en Marseille Francia.

De igual manera a la Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano, por su apoyo incondicional en aspectos académicos administrativos y personales, además por todo su apoyo para que fuera posible la realización de mi estancia en Francia.

Al Dr. José David Sepúlveda y a la Dra. María Cristina Acosta García, por su capacitación en el desarrollo de técnicas y uso de equipos y su disponibilidad para instruirme en su uso.

Agradezco al Dr. Roberto Olayo y Dr. Omar Eduardo Uribe Juárez de la división de CBI por su capacitación en el desarrollo de las técnicas, uso de equipo y su disponibilidad para instruirme en su uso del microscopio AFM-RAMAN.

Agradezco a todos los doctores y compañeros del proyecto ANGELICA por permitirme ser parte del mismo y poder proponer y dar soluciones a la problemática.

Muchas gracias a la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa por darme la oportunidad de formarme profesionalmente en sus instalaciones durante estos años. A mis profesores de la maestría en biotecnología por compartir su conocimiento, experiencia y tiempo, que me hicieron crecer profesionalmente y poder resolver problemas reales que afectan en nuestra sociedad.

Agradezco a mis amigos Rubén, Carlitos, Cristian Mora, Cristian Hernández, Kary, Viki... por haber hecho de estos dos años más a menos, lleno de experiencias inolvidables, por los consejos, por escucharme en los momentos más difíciles y darme sus diferentes puntos de vista.

A mis compañeros y a todos los que integran la planta piloto 4 por su apoyo durante estos dos años.

A mis padres y hermanos, por su apoyo incondicional, su confianza y recomendaciones, por su cariño, por ser mi guía e inspiración para seguir avanzando.

A mi pareja de vida, Araceli y a mi hija Ximena leylani por ser mi inspiración día a día para superarme y ser mejor persona y para quienes daré siempre lo mejor de mí.

RESUMEN

El café es considerado un producto de gran importancia en el comercio mundial. Sin embargo, desde 1960 se ha detectado la presencia de micotoxinas en diversos alimentos no solo el café. Las micotoxinas, como la ocratoxina A (OTA), está asociada a diversos trastornos de tipo neurotóxico, genotóxico, teratogénico, entre otros desordenes en animales y humanos. Además, los granos contaminados ocasionan importantes pérdidas económicas para el sector agrícola (932 millones de dólares/ año). Los principales microorganismos productores de micotoxinas son hongos del genero *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*.

Objetivo. Con este antecedente, el objetivo de este trabajo es determinar las interacciones fisicoquímicas y ecológicas implicados en el biocontrol del hongo *Aspergillus carbonarius* (considerado como mayor productor de OTA en alimentos) y la producción de ocratoxina A en frutos de café, con la aplicación de bacterias ácido lácticas “*Lactobacillus plantarum*” endémicas de pulpa de café. Comprender el modo de acción de *L. plantarum* y la influencia de los factores fisicoquímicos en la interacción bacteria-hongo generará alternativas biotecnológicas que permitan hacer recomendaciones para prevenir, controlar o eliminar la ocratoxina A de las plantaciones de café.

Métodos. Para tal propósito haciendo uso de microscopia electrónica de barrido (MEB), microscopia de barrido laser confocal (CLSM), microscopia de fuerzas atómicas (MFA), microscopia en campo claro (MCC), potencial Zeta (PZ), espectrometría infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) se estudian los mecanismos fisicoquímicos en la interacción célula-célula realizando caracterizaciones superficiales como rugosidad, topografía, composición química, carga superficial e hidrofobicidad de ambos microorganismos, que pudiesen estar implicados en la adhesión entre ambos microorganismos y su asociación con el biocontrol de *A. carbonarius*.

Resultados. Determinamos que *L. plantarum* inhibe el desarrollo (radial) fúngico en medio solido por encima del 50% durante 5-6 días (biocontrol fungistático). La máxima inhibición (84%) se alcanza al cuarto día, utilizando inóculo bacteriano de 5×10^4 cel/mL. En los co-cultivos en medio líquido pudimos observar efecto de biocontrol en la germinación de esporas fúngicas de hasta 72 h. Por otra parte, se caracterizó por HPLC la producción de ácido L-láctico, ácido D-láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico y etanol, como productos de fermentación de trehalosa por *L. plantarum*, moléculas sugeridas en

bibliografía con relación al biocontrol fúngico. Los estudios de interacción (co-cultivo), mostraron adhesión bacteriana sobre la superficie de esporas fúngicas como mecanismo antagonico, clasificado en bibliografía como antagonismo directo. Aunado a esto se determinó posible daño sobre la superficie de esporas fúngicas por la presencia de poros membranales de aproximadamente 140 ± 22.3 nm, que podrían estar relacionadas con el biocontrol del hongo micotoxigénico. Aunado a este estudio se determinó la capacidad de adsorción de OTA sobre la superficie de *L. plantarum*.

Por último se analizaron los mecanismos responsables de adhesión superficial de bacterias lácticas sobre esporas fúngicas. El PZ de bacterias y hongos (-11 a -18 mV y 0 a -10 mV respectivamente), no apoyan la hipótesis de atracción electrostática como mecanismo responsable de la adhesión (observada en MEB). Por otra parte, la rugosidad y topografía teóricamente sugieren que la rugosidad podría ser un factor condicionante en la adhesión bacteriana. Sin embargo el valor numérico de rugosidad superficial de esporas fúngicas estimados bajo el promedio aritmético de los valores absolutos de las alturas $R_a = 0.097 \pm 0.031$ μm , no relaciona en gran medida la rugosidad con la adhesión observada. Por otra parte, mediante CLSM y FTIR, se determinaron enlaces químicos superficiales los cuales se asociaron a proteínas y polisacáridos como posibles biomoléculas membranales implicadas en la adhesión de *L. plantarum* sobre esporas de *A. carbonarius*.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo proponen el uso eficaz de *Lactobacillus plantarum* como alternativa para el control de *A. carbonarius*. Así mismo los mecanismos físicos, químicos y ecológicos de biocontrol estudiados en este trabajo permiten comprender el modo de acción de *L. plantarum* lo cual amplía posibilidades y oportunidades para generar nuevas alternativas biotecnológicas en contra de los hongos contaminantes de cultivos y sus micotoxinas.

ABSTRACT

Coffee is considered a product of great importance in world trade. However, since 1960 the presence of mycotoxins has been detected in various foods, not just coffee. Mycotoxins, such as ochratoxin A (OTA), is associated with various neurotoxic, genotoxic, teratogenic disorders, among other disorders in animals and humans. In addition, the contaminated grains cause significant economic losses for the agricultural sector (932 million dollars / year). The main microorganisms that produce mycotoxins are fungi of the genus *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. **Objective.** With this background, the objective of this work is to determine the physicochemical and ecological interactions involved in the biocontrol of the *Aspergillus carbonarius* (considered as the largest producer of OTA in food) and the production of ochratoxin A in coffee beans, with the application of lactic acid bacteria "*Lactobacillus plantarum*" endemic of coffee pulp. Understanding the mode of action of *L. plantarum* and the influence of physicochemical factors on the bacterium-fungus interaction will generate biotechnological alternatives that allow making recommendations to prevent, control or eliminate ochratoxin A from coffee crops. **Methods.** For this purpose, using scanning electron microscopy (SEM), confocal laser scanning microscopy (CLSM), atomic force microscopy (AFM), light field microscopy (LFM), Zeta potential (ZP), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), the physicochemical mechanisms in the cell-cell interaction are studied making surface characterizations such as roughness, topography, chemical composition, surface charge and hydrophobicity of both microorganisms, which could be involved in the adhesion between both microorganisms and their association with the biocontrol of *A. carbonarius*. **Results.** We determined that *L. plantarum* inhibits fungal (radial) development in solid medium above 50% for 5-6 days (fungistatic biocontrol). The maximum inhibition (84%) is reached on the fourth day, using bacterial inoculum of 5×10^4 cell/mL. In the co-cultures in liquid medium we observed the effect of biocontrol on the germination of fungal spores up to 72 h. On the other hand, the production of L-lactic acid, D-lactic acid, formic acid, acetic acid, propionic acid and ethanol was characterized by HPLC, as fermentation products of trehalose by *L. plantarum*, molecules suggested in literature regarding fungal biocontrol. Interaction studies (co-culture) showed bacterial

adhesion on the surface of fungal spores as antagonist mechanism, classified in literature as direct antagonism. In addition to this, possible damage to the surface of fungal spores was determined by the presence of membrane pores of approximately 140 ± 22.3 nm, which could be related to the biocontrol of the mycotoxigenic fungus. In addition to this study, the capacity of OTA adsorption on the surface of *L. plantarum* was determined.

Finally, the mechanisms responsible for superficial adhesion of lactic acid bacteria on fungal spores were analyzed. The PZ of bacteria and fungi (-11 a -18 mV y 0 a -10 mV respectively) they do not support the hypothesis of electrostatic attraction as the mechanism responsible for adhesion (observed in SEM). On the other hand, the roughness and topography theoretically suggest that roughness could be a determining factor in the bacterial adhesion. However the numerical value of superficial roughness of fungal spores estimated under the arithmetic average of the absolute values of the heights $Ra = 0.097 \pm 0.031$ μm , it does not relate to a great extent the roughness with the adhesion observed. On the other hand, by LCSM and FTIR, superficial chemical bonds were determined, which were associated to proteins and polysaccharides as possible membrane biomolecules involved in the adhesion of *L. plantarum* on spores of *A. carbonarius*.

Finally, the results obtained in this work propose the effective use of *L. plantarum* as an alternative for the control of *A. carbonarius*. Likewise, the physical, chemical and ecological mechanisms of biocontrol studied in this work allow us to understand the mode of action of *L. plantarum*, which broadens possibilities and opportunities to generate new biotechnological alternatives against fungal contaminants of crops and their mycotoxins.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN -----	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA -----	4
2.1. PANORAMA MUNDIAL-----	4
2.1.1. <i>Consumo mundial de café</i> -----	5
2.1.2. <i>Producción mundial de café</i> -----	5
2.1.3. <i>Principales países productores.</i> -----	6
2.2. PANORAMA NACIONAL-----	7
2.3. EL FRUTO, PROCESAMIENTO Y SU CONTAMINACIÓN-----	8
2.4. PROCESAMIENTO O TRANSFORMACIÓN.-----	10
2.4.1. <i>Método por vía seca</i> -----	11
2.5. CONTAMINACIÓN DEL CAFÉ-----	11
2.6. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA CONTAMINACIÓN POR MICOTOXINAS.-----	16
2.7. MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINACIÓN DE MICOTOXINAS-----	21
2.8. REFERENCIAS-----	22
3. JUSTIFICACIÓN. -----	24
4. HIPÓTESIS. -----	25
5. OBJETIVOS. -----	26
5.1. OBJETIVO GENERAL:-----	26
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:-----	26
6. ENSAYOS DE ANTAGONISMO ENTRE <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> Y HONGO MICOTOXIGÉNICO <i>ASPERGILLUS CARBONARIUS</i> -----	27
6.1. RESUMEN-----	27
6.2. INTRODUCCIÓN-----	28
6.3. MATERIALES Y MÉTODOS-----	31
6.3.1. <i>Microorganismos y condiciones de cultivo.</i> -----	31
6.3.2. <i>Pruebas de antagonismo en medio sólido a nivel macroscópico</i> -----	32
6.3.3. <i>Cuantificación de la inhibición (%)</i> .-----	32
6.3.4. <i>Caracterización de productos de fermentación por HPLC</i> -----	33
6.3.5. <i>Tratamiento de muestras y métodos analíticos</i> -----	33
6.3.6. <i>Pruebas de antagonismo a nivel microscópico</i> -----	34
6.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	35
6.4.1. <i>Pruebas de antagonismo en medio sólido a nivel macroscópico</i> -----	35
6.4.2. <i>Caracterización por HPLC de productos de fermentación de BAL.</i> -----	43
6.4.3. <i>Pruebas de antagonismo en medio líquido a nivel microscópico</i> -----	48
6.5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS-----	51
6.6. REFERENCIAS-----	53
7. ESTUDIO DE CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE <i>A. CARBONARIUS</i> EN LA INTERACCIÓN CON <i>L. PLANTARUM</i> ASOCIADOS AL BIOCONTROL Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE OTA POR BAL. -----	56
7.1. RESUMEN-----	56
7.2. INTRODUCCIÓN-----	57
7.3. MATERIALES Y MÉTODOS-----	61
7.3.1. <i>Microorganismos y condiciones de cultivo</i> -----	61

7.3.2.	<i>Análisis de la interacción física como mecanismo antagónico determinado en microscopia laser confocal modo campo claro</i>	61
7.3.2.1.	Métodos analíticos para Microscopia de Barrido Laser Confocal	61
7.3.3.	<i>Análisis de la interacción física como mecanismo antagónico determinado en Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)</i>	61
7.3.3.1.	Tratamiento de muestras para análisis MEB	61
7.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
7.4.1.	<i>Análisis de la interacción física como mecanismo antagónico determinado en microscopia de barrido laser confocal modo campo claro</i>	63
7.4.2.	<i>Análisis de la interacción física como mecanismo antagónico determinado en Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)</i>	64
7.4.3.	<i>Morfología de Lactobacillus plantarum en MEB</i>	71
7.4.4.	<i>Adhesión superficial de bacterias lácticas sobre esporas fúngicas y daño superficial en esporas como mecanismo de biocontrol</i>	72
7.5.	ADSORCIÓN DE OTA POR BAL	78
7.6.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	81
7.7.	REFERENCIAS	83

8. ESTUDIO DE MECANISMOS DE ADHESIÓN SUPERFICIAL DE *L. PLANTARUM* SOBRE ESPORAS DE *A. CARBONARIUS* ----- 86

8.1.	RESUMEN	86
8.2.	INTRODUCCIÓN	87
8.3.	MATERIALES Y MÉTODOS	92
8.3.1.	<i>Interacciones eléctricas de doble capa (interfacial) implicadas en la adhesión bacteriana a superficies</i>	92
8.3.2.	<i>Tratamiento de muestras para análisis de potencial Zeta</i>	92
8.3.3.	<i>Estudio de rugosidad en microscopia de fuerzas atómicas (MFA) de superficie de esporas fúngicas y efecto sobre adhesión bacteriana</i>	93
8.3.4.	<i>Determinación de composición química superficial de esporas fúngicas en estado de dormancia y en vías germinativas, evaluado en espectroscopia infrarroja de transformada de fourier (FTIR)</i>	93
8.3.5.	<i>Evaluación de lípidos y polisacáridos superficiales en microscopia de barrido laser confocal (CLSM) como biomoléculas responsables de adhesión superficial bacteria láctica-espora fúngica</i>	94
8.3.5.1.	Determinación de no auto fluorescencia en medios de cultivo y materiales	94
8.3.5.2.	Inducción de fluorescencia mediante trazadores fluorescentes DIL, DID, en lípidos superficiales de bacterias lácticas y esporas fúngicas respectivamente	95
8.3.5.3.	Inducción de fluorescencia mediante (lectina WGA) en polisacáridos superficiales de bacterias lácticas y esporas fúngicas	96
8.3.6.	<i>Determinación de enlaces químicos moleculares implicados en la adhesión bacteriana mediante espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)</i>	96
8.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	97
8.4.1.	<i>Interacciones eléctricas de doble capa (interfacial) implicadas en la adhesión bacteriana a superficies</i>	97
8.4.2.	<i>Estudio de rugosidad en microscopia de fuerzas atómicas (MFA) de superficie de esporas fúngicas y efecto sobre adhesión bacteriana</i>	101
8.4.3.	<i>Evaluación de lípidos y polisacáridos superficiales con ayuda de la microscopía de barrido laser confocal (CLSM) como biomoléculas responsables de adhesión superficial bacteria láctica - espora fúngica</i>	104
8.4.4.	<i>Determinación de enlaces químicos moleculares implicados en la adhesión bacteriana mediante espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)</i>	114
8.5.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	127

8.6. REFERENCIAS----- 129

9. CONCLUSIONES GENERALES-----131

10. ANEXO A.-----133

11. ANEXO B.-----138

12. ANEXO C-----139

13. ANEXO D-----142

14. ANEXO E-----143

15. ANEXO F-----144

16. ANEXO G-----162

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1 CONSUMO MUNDIAL DE CAFÉ. FUENTE: © 2017 INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (WWW.ICO.ORG).....	5
FIGURA 2.2 PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES DE CAFÉ. FUENTE: © 2018 INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (WWW.ICO.ORG).....	6
FIGURA 2.3 VOLUMEN DE PRODUCCIÓN NACIONAL 2012-2017 (MILES DE TONELADAS). FUENTE: SAGARPA 2017	8
FIGURA 2.4 PRINCIPALES 10 ENTIDADES PRODUCTORAS. FUENTE: SAGARPA 2017	8
FIGURA 2.5 INDICADORES 2012-2017. FUENTE: SIAP, SIAVI 2017	8
FIGURA 2.6 PROCESO DE MADURACIÓN, CEREZAS DE CAFÉ.	9
FIGURA 2.7 DIAGRAMA DE PROCESAMIENTO DEL GRANO DE CAFÉ Y SUS SUBPRODUCTOS	10
FIGURA 2.8 CICLO DE VIDA DE LOS HONGOS FITO PATÓGENOS DE <i>FUSARIUM</i> . ABBAS ET AL. (2009).....	15
FIGURA 2.9 CICLO DE VIDA DE LOS HONGOS FITO PATÓGENOS DEL TIPO <i>ASPERGILLUS</i>	16
FIGURA 6.1 IMAGEN *A, CRECIMIENTO RADIAL DE <i>ASPERGILLUS CARBONARIUS</i> SIN BAL; IMAGEN *B, INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>A. CARBONARIUS</i> EN CO-CULTIVO CON BACTERIA ACIDO LÁCTICA BAL [4x10 ⁴ CEL/M ^L]; IMAGEN *C, INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>A. CARBONARIUS</i> EN CO-CULTIVO CON BACTERIA ACIDO LÁCTICA BAL [1x10 ⁵ CEL/M ^L]......	36
FIGURA 6.2 IMAGEN *D, CO-CULTIVO <i>L. PLANTARUM</i> BAL [1x10 ⁶ CEL/M ^L] Y <i>A. CARBONARIUS</i> ; IMAGEN *E, CO-CULTIVO <i>L. PLANTARUM</i> BAL [1x10 ⁷ CEL/M ^L] Y <i>A. CARBONARIUS</i> ; IMAGEN *F, CO-CULTIVO <i>L. PLANTARUM</i> BAL [4x10 ⁷ CEL/M ^L] Y <i>A. CARBONARIUS</i>	37
FIGURA 6.3 PRODUCCIÓN DE ESPORAS DE <i>A. CARBONARIUS</i> EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE BAL. *IMÁGENES EXPERIMENTALES CONVERTIDAS A SISTEMA BINARIO, Y CUANTIFICACIÓN DE ESPORAS EN SOFTWARE DE PROCESAMIENTO DIGITAL IMAGE J.	38
FIGURA 6.4 LA FIGURA A MUESTRA EL CRECIMIENTO RADIAL CARACTERÍSTICO DE HONGOS CON FORMACIÓN DE HALOS CONCÉNTRICOS DE ESPORAS EN CONDICIONES AMBIENTALES NORMALES. LA FIGURA B MUESTRA LA SOBRE PRODUCCIÓN DE ESPORAS BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS.	39
FIGURA 6.5 INHIBICIÓN (%) DEL CRECIMIENTO RADIAL DE <i>ASPERGILLUS CARBONARIUS</i> A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BAL (CEL/M ^L). LOS DATOS UTILIZADOS PARA CONSTRUIR LA GRÁFICA SE PUEDEN CONSULTAR EN EL ANEXO C	41
FIGURA 6.6 CINÉTICA DE INHIBICIÓN (%) EN FUNCIÓN DEL TIEMPO. EVALUANDO 5 DIFERENTES CONCENTRACIONES BACTERIANAS.	42
FIGURA 6.7 CROMATOGRAMA DE PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN POR <i>L. PLANTARUM</i> EN MEDIO MRS.	44
FIGURA 6.8 CROMATOGRAMA DE PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN POR <i>L. PLANTARUM</i> EN MEDIO CYA.	45
FIGURA 6.9 MICROGRAFÍA A, SERIE DE TIEMPO DEL PROCESO GERMINATIVO DE ESPORAS DE <i>ASPERGILLUS CARBONARIUS</i> BAJO CONDICIONES NUTRIMENTALES Y AMBIENTALES FAVORABLES. MICROGRAFÍAS B, CO-CULTIVO (CC) DE ESPORAS DE <i>ASPERGILLUS CARBONARIUS</i> Y BAL. *EL CONTEO BACTERIANO Y LA DETERMINACIÓN DEL DIÁMETRO DE ESPORAS SE DESCRIBEN EN EL ANEXO D.....	48
FIGURA 7.1 APLICACIONES DE INTERACCIONES BACTERIA-HONGO. FUENTE: DEVEAU ET AL. (2018)	57
FIGURA 7.2 INTERACCIÓN MICROSCÓPICA DE BACTERIAS LÁCTICAS Y ESPORAS DE <i>ASPERGILLUS CARBONARIUS</i> EN MEDIO LÍQUIDO, MICROGRAFÍA TOMADAS POR MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL.	64
FIGURA 7.3 ESTRUCTURAS MORFOLÓGICAS DEL CICLO REPRODUCTIVO ASEXUAL (PRODUCCIÓN DE CONIDIOS) DE <i>ASPERGILLUS CARBONARIUS</i> . MICROGRAFÍAS OBTENIDAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).....	65
FIGURA 7.4. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS DIMENSIONES MORFOLÓGICAS DE ESPORAS Y CONIDIÓFOROS DE <i>ASPERGILLUS CARBONARIUS</i> . ELABORACIÓN PROPIA CON ESTIMACIONES DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS EN MEB.	66
FIGURA 7.5 MORFOLOGÍA DE ESPORAS DE <i>ASPERGILLUS CARBONARIUS</i> VISUALIZADAS EN MEB.....	67
FIGURA 7.6 MORFOLOGÍA DE ESPORAS DE <i>ASPERGILLUS CARBONARIUS</i> EN ESTADO DE DORMANCIA (ESPICULADA) Y EN VÍAS GERMINATIVAS (SIN ESPÍCULAS) VISUALIZADAS EN MEB.....	68

FIGURA 7.7 SUCESIÓN MORFOLÓGICA DE DIFERENTES ESTADOS DE MADURACIÓN DE ESPORAS DE <i>ASPERGILLUS CARBONARIUS</i>	69
FIGURA 7.8 DIFERENCIA MORFOLÓGICA ENTRE ESPORAS EN ESTADO DE DORMANCIA (1) Y EN VÍAS DE GERMINACIÓN (2).....	70
FIGURA 7.9 MORFOLOGÍA DE <i>L. PLANTARUM</i>	71
FIGURA 7.10 MICROGRAFÍAS REPRESENTATIVAS DE LA ADHESIÓN BACTERIANA SOBRE SUPERFICIE DE ESPORAS DE <i>ASPERGILLUS CARBONARIUS</i>	74
FIGURA 7.11 MICROGRAFÍAS QUE MUESTRA POSIBLE DAÑO SUPERFICIAL EN ESPORAS FÚNGICAS POR PRESENCIA DE POROS MEMBRANALES.....	76
FIGURA 7.12 MICROGRAFÍA A, FLUORESCENCIA DEBIDA A OTA ADSORBIDA SOBRE LA SUPERFICIE DE <i>L. PLANTARUM</i> ; MICROGRAFÍA B, <i>L. PLANTARUM</i> EN CAMPO CLARO, MICROGRAFÍA C, COMBINACIÓN DE LOS CANALES A,B.....	79
FIGURA 7.13 MICROGRAFÍA A, FLUORESCENCIA NULA A 450NM DE LONGITUD DE ONDA. MICROGRAFÍA B, <i>L. PLANTARUM</i> EN PLANO ENFOCADO A 40X.....	80
FIGURA 8.1 FUERZAS DE ATRACCIÓN Y REPULSIÓN EN FUNCIÓN DE LA DISTANCIA ENTRE DOS COLOIDES, USO DE BACTERIOCINAS COMO MECANISMO DE ADHESIÓN. FUENTE: HTTP://MICROBIOLOGIAYEPIDEMIOLOGIA.BLOGSPOT.COM/2012/	91
FIGURA 8.2 POTENCIAL ZETA DE BACTERIAS DE <i>L. PLANTARUM</i> Y ESPORAS DE <i>ASPERGILLUS CARBONARIUS</i> EN FUNCIÓN DEL PH.....	97
FIGURA 8.3 IMAGEN A, ENERGÍA DE REPULSIÓN ELECTROESTÁTICA DOMINANTE EN EL SISTEMA COLOIDAL. IMAGEN B, SUSPENSIÓN BACTERIANA ESTABLE COMO CONSECUENCIA DE DOMINANCIA DE ENERGÍAS REPULSIVAS.....	99
FIGURA 8.4 IMAGEN A, ENERGÍA DE REPULSIÓN ELECTROESTÁTICA EN SISTEMAS COLOIDALES. IMAGEN B, ENERGÍA DE ATRACCIÓN DE VAL DER WAALS EN SISTEMAS COLOIDALES. IMAGEN C, CURVA DE ENERGÍA NETA DE INTERACCIÓN, SE FORMA AL SUBSTRAR LA CURVA DE ATRACCIÓN DE LA CURVA DE REPULSIÓN. *TODAS LAS CURVAS ENERGÉTICAS ESTÁN EN FUNCIÓN DE LA DISTANCIA DE INTERACCIÓN DE LOS COLOIDES.....	100
FIGURA 8.5 EFECTO DE $AlCl_3$ 0.01M SOBRE LA AGLOMERACIÓN BACTERIANA EN LA SUPERFICIE DE ESPORAS FÚNGICAS Y SU EFECTO DE BIOCONTROL A TRAVÉS DEL TIEMPO. ND= NO DETERMINADO. * EL CONTEO BACTERIANO Y LA DETERMINACIÓN DEL DIÁMETRO DE ESPORAS SE DESCRIBEN EN EL ANEXO D.	101
FIGURA 8.6 MICROGRAFÍA A, VISTA SUPERIOR DE ESPORAS FÚNGICAS EN MICROSCOPIA ÓPTICA DE MFA; MICROGRAFÍA B, RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL TOPOGRÁFICA DE LA SUPERFICIE DE ESPORAS FÚNGICAS. MICROGRAFÍA C, SELECCIÓN DE ÁREA RECTANGULAR A ESCANEAR EN MODO TAPPING MFA SOBRE LA SUPERFICIE DE ESPORAS FÚNGICAS; MICROGRAFÍAS D,E, RESULTADO DE ESCANEADO MODO TAPPING MFA Y SU RECONSTRUCCIÓN TOPOGRÁFICA RESPECTIVA A PROFUNDIDAD Y ALTURA DE VALLES EN μM	102
FIGURA 8.7 MICROGRAFÍAS A*, ESTUDIO DE AUTOFLUORESCENCIA EN MEDIO DE CULTIVO MRS; MICROGRAFÍAS B*, ESTUDIO DE AUTOFLUORESCENCIA EN MEDIO PDA.....	105
FIGURA 8.8 MICROGRAFÍAS A*, ESTUDIO DE AUTOFLUORESCENCIA DE BAL EN MEDIO MRS; MICROGRAFÍAS B*, ESTUDIO DE AUTOFLUORESCENCIA DE ESPORAS FÚNGICAS EN MEDIO CYA.....	106
FIGURA 8.9 MICROGRAFÍAS DE FLUORESCENCIA DE LÍPIDOS SUPERFICIALES DE ESPORAS FÚNGICAS, INDUCIDA MEDIANTE EL TRAZADOR FLUORESCENTE DID.....	107
FIGURA 8.10 MICROGRAFÍAS DE FLUORESCENCIA DE LÍPIDOS SUPERFICIALES DE <i>L. PLANTARUM</i> , INDUCIDA MEDIANTE EL TRAZADOR FLUORESCENTE DIL.....	108
FIGURA 8.11 MICROGRAFÍA A FLUORESCENCIA DE LÍPIDOS SUPERFICIALES DE BACTERIAS; MICROGRAFÍA B FLUORESCENCIA DE LÍPIDOS SUPERFICIALES DE ESPORAS FÚNGICAS; MICROGRAFÍA C FLUORESCENCIA MIXTA DE AMBOS MICRORGANISMOS EN CO-CULTIVO.....	109
FIGURA 8.12 MICROGRAFÍAS EN MC DE FLUORESCENCIA DE POLISACÁRIDOS SUPERFICIALES DE BACTERIAS LÁCTICAS, INDUCIDA MEDIANTE LECTINAS-ALEXA 488.....	110

FIGURA 8.13 MICROGRAFÍAS EN MC DE FLUORESCENCIA DE POLISACÁRIDOS SUPERFICIALES DE ESPORAS FÚNGICAS, INDUCIDA MEDIANTE LECTINAS-ALEXA 594.....	111
FIGURA 8.14 MICROGRAFÍAS A FLUORESCENCIA DE OCRATOXINA A (OTA); MICROGRAFÍAS B FLUORESCENCIA DEBIDA A POLISACÁRIDOS SUPERFICIALES DE BACTERIAS LÁCTICAS; MICROGRAFÍAS C VISUALIZACIÓN EN CAMPO CLARO (CC) DEL CO-CULTIVO BACTERIAS-ESPORAS; MICROGRAFÍAS D FLUORESCENCIA DEBIDA A POLISACÁRIDOS SUPERFICIALES DE ESPORAS FÚNGICAS; MICROGRAFÍAS E VISUALIZACIÓN CONJUNTA DE LOS CANALES A,B,C,D.....	113
FIGURA 8.15 SEDIMENTACIÓN ISOPÍCNICA DE DOS DIFERENTES ESTADOS DE MADURACIÓN DE ESPORAS FÚNGICAS.....	115
FIGURA 8.16 MICROGRAFÍAS A MUESTRAN A UN AUMENTO DE 100 X Y 40X DE LA PARTE ALTA (PA) DE SEDIMENTACIÓN ISOPÍCNICA DE ESPORAS CON DENSIDAD APROXIMADA DE (0-0.14G/ML) GLUC; MICROGRAFÍA B MUESTRAN A UN AUMENTO DE 100 X LA PARTE BAJA (PB) DE SEDIMENTACIÓN ISOPÍCNICA DE ESPORAS CON DENSIDAD APROXIMADA DE (0.7-0.89 G/ML) GLUC. *MICROSCOPIA EN CAMPO CLARO (CC).....	116
FIGURA 8.17 ESPECTROGRAMA IR DE COMPOSICIÓN QUÍMICA DE ESPORAS EN ESTADO DE DORMANCIA Y ESPORAS EN ETAPA DE GERMINACIÓN.....	119
FIGURA 8.18 ESPECTROGRAMA IR DE ESPORAS CON ESPÍCULAS, BACTERIAS LÁCTICAS, Y BACTERIAS ADHERIDAS SOBRE ESPORAS ESPICULADAS.....	121
FIGURA 8.19 ESPECTROGRAMA IR DE ESPORAS SIN ESPÍCULAS, BACTERIAS LÁCTICAS, Y BACTERIAS ADHERIDAS SOBRE ESPORAS SIN ESPÍCULAS FÚNGICAS.....	122
FIGURA 8.20 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA) DE ESPECTROGRAMAS IR.....	123
FIGURA 8.21 ESTUDIO DE ADHESIÓN DE BACTERIAS SOBRE ESPORAS CON ESPÍCULAS Y ESPORAS SIN ESPÍCULAS.....	126
FIGURA ANEXA A 1 PRINCIPALES PAÍSES EXPORTADORES A NIVEL MUNDIAL FUENTE: INFORME DEL MERCADO DE CAFÉ – AGOSTO 2018 ICO	134
FIGURA ANEXA A 2 ESTRUCTURA PORCENTUAL DE LAS EXPORTACIONES MUNDIALES DE CAFÉ. FUENTE: ELABORADO POR CIMA CON DATOS DE USDA/ EXTRANJERO AGRÍCOLA	134
FIGURA ANEXA A 3 PRINCIPALES PAÍSES IMPORTADORES DE CAFÉ.	135
FIGURA ANEXA A 4 PORCENTAJE DE CAFÉ EN EL VALOR TOTAL DE LAS EXPORTACIONES DE TODOS LOS PRODUCTOS. FUENTE: © 2015 INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (WWW.ICO.ORG)	136
FIGURA ANEXA A 5 CRECIMIENTO CONSUMO DE CAFÉ (MM SAC. 60 KG)	137
FIGURA ANEXA C 1 GRAFICA DE SUPERFICIE RESPUESTA Y CORRELACIÓN DE LAS VARIABLES CONCENTRACIÓN Y TIEMPO SOBRE INHIBICIÓN (%).....	141
FIGURA ANEXA F 1 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS DIFERENTES POTENCIALES Y CAPAS PERTENECIENTES AL SISTEMA ELÉCTRICO COLOIDAL. FUENTE: ARBOLEDA, J. (1981).....	147
FIGURA ANEXA F 2 MODELO DE LA DOBLE CAPA QUE ESQUEMATIZAR LA ATMÓSFERA IÓNICA EXISTENTE EN LA PROXIMIDAD DEL COLOIDE. FUENTE: HTTP://WWW.ZETA-METER.COM/	148
FIGURA ANEXA F 3 ENERGÍA DE INTERACCIÓN DE FUERZAS MOLECULARES EN COLOIDES. FUENTE: HTTP://WWW.ZETA-METER.COM/	150
FIGURA ANEXA F 4 ESQUEMA REPRESENTANDO AL MICROSCOPIO DE FUERZAS ATÓMICAS. (B) DETECCIÓN DE LA SEÑAL DEL LÁSER ENTRE LOS SEGMENTOS VERTICALES A Y B DEL FOTODETECTOR. FUENTE: CAROLINA DÍAZ (2011); HTTPS://HISTOPTICA.COM/MICROSCOPIO-DE-FUERZA-ATOMICA-MFA/	151
FIGURA ANEXA F 5 ESQUEMA REPRESENTANDO EL ESCANEADO DE LA PUNTA DEL MFA SOBRE UNA SUPERFICIE.....	152
FIGURA ANEXA F 6 REPRESENTACIÓN DE MFA EN MODO CONTACTO Y MFA EN MODO INTERMITENTE (TAPPING) DE UNA MUESTRA ESFÉRICA BLANDA.....	153

FIGURA ANEXA F 7 IMAGEN A: REPRESENTACIONES DE BARRIDO LÁSER CONFOCAL, PROPIEDADES DE REFLEXIÓN DE LUZ. IMAGEN B: ESPEJO DICROICO Y OBJETIVO QUE EXCITAN EL TINTE FLUORESCENTE EN EL ESPÉCIMEN. IMAGEN C: LA LUZ FLUORESCENTE EMITIDA. FUENTE: [HTTPS://HISTOPTICA.COM/MICROSCOPIO-CONFOCAL-O-LASER-DE-BARRIDO/](https://histoptica.com/microscopio-confocal-o-laser-de-barrido/) 155

FIGURA ANEXA F 8 PRINCIPIO DE FLUORESCENCIA, MODELO CLÁSICO DE BOHR. LA ABSORCIÓN DE UN CUANTO DE LUZ (AZUL) HACE QUE UN ELECTRÓN SE MUEVA A UNA ÓRBITA DE MAYOR ENERGÍA "ESTADO EXCITADO" DURANTE UN TIEMPO DETERMINADO, CUANDO EL ELECTRÓN VUELVE A SU ÓRBITA ORIGINAL Y EL FLUOROCROMO DISIPA EL EXCESO DE ENERGÍA EMITIENDO UN FOTÓN (VERDE). FUENTE: ISHIKAWA-ANKERHOLD, ANKERHOLD, DRUMMEN, (2012) 156

FIGURA ANEXA F 9 IMAGEN (A), SISTEMA DE DETECCIÓN EXCITACIÓN/EMISIÓN. IMAGEN (B) EXCITACIÓN DE UN SOLO FOTÓN. FUENTE: ISHIKAWA-ANKERHOLD, ANKERHOLD, DRUMMEN, (2012) 156

FIGURA ANEXA F 10 OBTENCIÓN DE IMAGEN "BARRIDO" DE MUESTRAS EN MICROSCOPIA CONFOCAL 158

FIGURA ANEXA F 11 ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO Y LONGITUDES DE ONDA RESPECTIVAS A CADA REGIÓN. 159

FIGURA ANEXA F 12 SUBDIVISIONES DEL ESPECTRO INFRARROJO. FUENTE: PRIEGO, (2017) 160

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 2.1 LISTA DE LAS MICOTOXINAS MÁS FRECUENTES ENCONTRADAS Y LOS HONGOS RESPONSABLES DE SU PRODUCCIÓN.	13
TABLA 2.2 ESPECIES FÚNGICAS PRODUCTORAS DE MICOTOXINAS DE IMPORTANCIA BIOLÓGICA Y ECONÓMICA EN HUMANOS, ANIMALES Y AGRICULTURA.	14
TABLA 6.1 PUBLICACIONES SOBRE ACTIVIDAD ANTI-FÚNGICA DE BAL	30
TABLA 6.2 TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES.	32
TABLA 6.3 PRODUCCIÓN DE ESPORAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE BAL Y AUMENTO (%) POR DÍA.	38
TABLA 6.4 ÁREA (%) REPRESENTATIVA DE CADA PRODUCTO DE FERMENTACIÓN DEL MEDIO MRS.....	44
TABLA 6.5 ÁREA REPRESENTATIVA (%) DE CADA COMPUESTO DE FERMENTACIÓN DEL MEDIO CYA	45
TABLA 6.6 CAPACIDAD GERMINATIVA DE <i>A. CARBONARIUS</i> EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE FUENTE DE CARBONO.	50
TABLA 8.1 RUGOSIDAD SUPERFICIAL DE ESPORAS DE <i>ASPERGILLUS CARBONARIUS</i>	103
TABLA 8.2. ANÁLISIS DE ESPECTRO IR. DIFERENCIAS COMPOSICIONALES ENTRE DIFERENTES ESTADOS DE MADURACIÓN DE ESPORAS DE <i>A. CARBONARIUS</i>	124
TABLA 8.3. ANÁLISIS DE ESPECTRO IR. PRINCIPALES MOLÉCULAS IMPLICADAS EN LA ADHESIÓN BAL-ESPORA FÚNGICA	125
TABLA ANEXA A 1 PRINCIPALES PAÍSES IMPORTADORES DE CAFÉ	134
TABLA ANEXA B 1 COMPOSICIÓN DEL MEDIO CYA 0.8%	138
TABLA ANEXA B 2 COMPOSICIÓN DEL MEDIO CZAPEK CONCENTRADO*	138
TABLA ANEXA C 1 INHIBICIÓN (%) DE CRECIMIENTO RADIAL EN FUNCIÓN DEL TIEMPO	139
TABLA ANEXA C 2 TABLA RESUMEN DE INHIBICIÓN (%) EN FUNCIÓN DE CONCENTRACIÓN BACTERIANA (CEL/M ^L) Y TIEMPO (DÍAS).....	141
TABLA ANEXA D 1 ANÁLISIS DE PARTÍCULAS DE BACTERIAS Y DIÁMETRO DE ESPORAS EN MEDIO LÍQUIDO. .	142
TABLA ANEXA E 1 ANÁLISIS DE PARTÍCULAS DE BACTERIAS Y DIÁMETRO DE ESPORAS EN MEDIO LÍQUIDO EN PRESENCIA DE ALCL ₃ 0.01M	143

Glosario de abreviaturas

15AcDon: 15-acetil DON	HACCP: Punto de control crítico de análisis de riesgos
ACB: Agentes de Control Biológico	HFB: Heptafluorobutirilo
ACN: Acetonitrilo	HPLC: Cromatografía líquida de alta presión
ADN: Acido desoxirribonucleico	HPLC-Fluo: Cromatografía líquida a alto rendimiento con detector de fluorescencia
AFB: Aflatoxina B	HPLC-UV: Cromatografía líquida de alto rendimiento con detector ultravioleta
AFB1: Aflatoxina B1	HSCAS: Aluminosilicatos de calcio y sodio
AFLA: Aflatoxinas	HT2: Toxina HT2
AFM: Microscopia de fuerzas atómicas	ICO: Organización Internacional del Café
AMECAFÉ: Asociación mexicana de la cadena productiva de café A.C	INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía
ANA-K: Acido naftalen acético	IR: Espectroscopia infrarroja
ARN: Ácido ribonucleico	LC-MS / MS: Cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de la masa del tipo triple cuadrupolo en tándem
ATP: Adenosina trifosfato	LC-MS: Cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas
BAL: Bacteria acido láctica	LTSEM: Microscopía electrónica de barrido a baja temperatura
BPA: Buenas prácticas agrícolas	LTSM: Microscopía electrónica de barrido a baja temperatura
CC: Co-cultivo	MADR: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural
CLSM: Microscopia de Barrido Laser Confocal	MATH: Prueba de adhesión microbiana a hidrocarburos
CODEX: Código Alimentario	MEB: Microscopia electrónica de barrido
CYA: Agar extracto de levadura de Czapek	MEC: Matriz extracelular
DAD: Detector de arreglo de diodos	MeOH: Metanol
DAS: Diacetoxyscirpenol	MET: Microscopia electrónica de transmisión
DLVO: Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek	MLC: Microscopia laser confocal
DON: Deoxynivalenol	MM Sac: Miles de millones de sacos
DON: Desoxinivalenol	MMT: Miles de millones de toneladas
ECD: Detector de captura de electrones	MRS: Medio de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe
EE.UU: Estados Unidos	Mt: Miles de toneladas
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	MX: México
EM: Espectrometría de masas	NEO: Neosolaniol
EPS: Sustancias poliméricas extracelulares	NIV: Nivalenol
ES: España	ODM: Objetivos de Desarrollo del Milenio
EUA: Estados unidos de américa	OMS: Organización Mundial de la Salud
FAO: Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura	ONU: Organización de las Naciones Unidas
FD: Detector de fluorescencia	OPA: O-ftaldialdéhído
FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos	OTA: Ocratoxina A
FID: Detector de ionización de llama	PCD: Muerte celular programada
FTIR: Espectrometría infrarroja de transformada de Fourier	PDA: Agar papa dextrosa
FusX: Fusarenona X	PFP: Pentafluoropropionilo
GC / MS: Cromatografía de gases acoplada a masas	PIB: Producto interno bruto
GC-FID: Cromatografía en fase de observación de la detección por ionización de la llama	PMF: Fuerza motriz protónica
GMP: Buenas prácticas de fabricación	
GRAS: Generalmente es reconocido como seguro	

QPS: Presunción de Seguridad Calificada
RASFF: Sistema de Alerta Rápida para la Alimentación humana y animal
RID: Detector de índice de refracción
SAGARPA: Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
SEM: Microscopia electrónica de barrido
SIAP: Sistema de información de agentes promotores
SIAVI: Sistema de Información Comercial Vía Internet
SPMs: Microscopías de barrido de sonda
STM Microscopía de barrido de efecto túnel
T2: Toxina T2

TBS: Escirpentriol
TFA: Trifluoroacetilo
TLC: Cromatografía en capa fina
TMAC: Tasa Media Anual de Crecimiento
TMS: Trimetilsililo
UE: Unión Europea
UFC: Unidades formadores de colonias
US: Estados Unidos
USDA: Departamento de agricultura de los Estados Unidos
UV: Ultravioleta
VER: Verrucarol
WGA: Aglutinina del germen de trigo
ZEA: Zearalenona

1. Introducción

La presente tesis se compone de 7 capítulos, los cuales estructuran el cuerpo principal de la tesis.

El *Capítulo 2* presenta una revisión bibliográfica respectiva a la importancia económica y social del café a nivel mundial y nacional, destacando los principales países productores y consumidores de café y la derrama económica aunada al comercio de este producto, así mismo se exponen las características fisiológicas del fruto de café y las condiciones óptimas para su cultivo. Seguidamente se abordan los dos procesos de beneficiado del grano de café, profundizando de manera particular en el beneficio por vía seca. Por otra parte, se expone la principal problemática a nivel mundial de contaminación de cultivos de café por hongos micotoxigénicos y el impacto negativo que genera en los aspectos de salud, económico y social sobre las personas y países relacionados en el cultivo, procesamiento y comercio de este producto. Posteriormente se hace una revisión de los diversos métodos y técnicas utilizadas para la prevención y tratamiento de la contaminación por micotoxinas, entre las cuales destacan el uso de tratamientos pre-cosecha como herramientas para la seguridad alimentaria y pos-cosecha como tratamientos físicos, químicos y biotecnológicos, siendo este último el método desarrollado en la tesis con el uso de BAL como agentes de control biológico.

En el *Capítulo 3*, se expone la importancia de realizar un estudio que permita una comprensión más profunda de los mecanismos físicos, químicos y ecológicos llevados a cabo por BAL en particular *Lactobacillus plantarum* en el biocontrol del hongo micotoxigénico *A. carbonarius* considerado como el mayor productor de OTA. Con la finalidad de hacer recomendaciones sobre cómo prevenir, controlar o eliminar la ocratoxina A de las plantaciones de café.

En el *Capítulo 4*, se plantea la hipótesis de trabajo y que es utilizada como base para proporcionar soluciones alternativas al problema de contaminación de café por micotoxinas.

En el *Capítulo 5*, se presentan los objetivos de trabajo los cuales nos permiten dirigir todos los esfuerzos de investigación hacia una misma dirección.

En el *Capítulo 6*, se enfoca en determinar la capacidad, el grado y el tipo de biocontrol llevado a cabo por la BAL *L. plantarum* contra el hongo micotoxigénico *A. carbonarius*, además se estudia mediante HPLC los productos de fermentación de trehalosa por *L. plantarum* que pueden fungir como biomoléculas para el biocontrol del hongo.

En el *Capítulo 7*, se estudian los cambios morfológicos sobre la superficie del hongo *A. carbonarius*, como consecuencia de la interacción directa en co-cultivo con *L. plantarum*, para lo cual con ayuda de microscopía electrónica de barrido (MEB) se busca identificar cambios morfológicos o daño superficial que relacionen al antagonismo directo (adhesión BAL/HONGO) como mecanismo de biocontrol llevado a cabo por *L. plantarum*. Para tal propósito se analiza la morfología del hongo de manera cualitativa y cuantitativa pre-interacción y post-interacción con BAL. Así mismo en este capítulo se estudia la capacidad de adsorción de OTA sobre la superficie de *L. plantarum* como mecanismo que coadyuva a limitar la disponibilidad de la toxina en el café.

El *Capítulo 8* se enfoca en estudiar los mecanismos físico-químicos de la superficie bacteriana y fúngica responsables de la adhesión presentada, se hace uso de técnicas biofísicas superficiales como potencial Zeta de bacterias y esporas fúngicas para evaluar la relación de atracciones electrostáticas que pudiesen estar implicadas en la adhesión observada, asimismo mediante el uso de microscopía de fuerza atómica, se estudió la influencia de la rugosidad superficial de ambos microorganismos como factor condicionante de adhesión. Por otra parte, mediante el uso de microscopía de barrido laser confocal y espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier, se estudian cambios en enlaces químicos que pudiesen corresponderse con biomoléculas superficiales como proteínas, lípidos, polisacáridos que pueden ser responsables de la adhesión entre ambos microorganismos realizando como paso último un estudio estadístico de análisis de componentes principales para el análisis de los espectros obtenidos en FTIR.

El *Capítulo 9* presenta la conclusión general, la cual expone de manera puntual las conclusiones de los principales resultados mostrados en cada capítulo.

Finalmente, los *Capítulos 10-16* presentan la sección de anexos correspondiente a información detallada del café y su importancia económica y social, preparación de medios de cultivo, datos sin procesar utilizados en la realización de tablas, gráficas, figuras y estudios

estadísticos mostrados en el cuerpo de la tesis, además se muestra información detallada de teoría y funcionamiento de las técnicas avanzadas en microscopia y espectroscopia. Finalmente, se muestran los trabajos presentados en congresos durante el desarrollo del trabajo de investigación.

2. Revisión bibliográfica

2.1. Panorama mundial

El producto tropical más comercializado en el mercado internacional es el café. La producción de café a nivel mundial en 2017 registro un volumen de 150 millones de sacos de 60kg, el cual representa un monto aproximado en divisas de 25 000 millones de dólares. Debido a la gran importancia económica del café, en 1963 se creó la Organización Internacional del Café (OIC) la cual se integra por 77 países miembros (45 exportadores de café y 32 importadores).

El café es un producto que funciona como fuente de divisas, más del 90% de la producción de café tiene lugar en los países en desarrollo, en su mayoría de América del Sur, mientras que el consumo se produce principalmente en las economías industrializadas.

El sector cafetero ha empleado alrededor de 26 millones de personas en 56 países productores y en más de 100 países exportadores en todo el mundo (Ponte y Stefano, 2002). Brasil produce casi un tercio de todo el café del mundo, más de 5 millones de personas están empleadas en el cultivo y cosecha (FAO 2007). En Colombia la producción de café genera alrededor de 800 000 empleos directos en el sector rural (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, MADR), 32% de empleo generado por actividades agrícolas, además, de los empleos generados a lo largo de la cadena de valor (comercialización, trilla, transporte, industrialización y exportación) lo que se traduce en aproximadamente 1.6 millones de empleos indirectos (MADR 2013) (FAO 2007). En México, el café proporciona trabajo a 510 mil 544 productores en 14 estados, 480 municipios, (AMECAFÉ-SIAP), de los cuales el 41% de los hombres y el 24% de las mujeres dedicadas a la producción de café se concentran en el estado de Chiapas, entidad con mayor producción de café en el país. Además Chiapas es el principal productor mundial de café orgánico, 18 millones de toneladas anuales son producidas por más de 60 mil productores una tercera parte son mujeres indígenas (Mariscal, 2011).

2.1.1. Consumo mundial de café

El consumo mundial de café en el ciclo 2016-2017 se ubicó en 155.1 millones de sacos de 60 Kg (Figura 2.2).

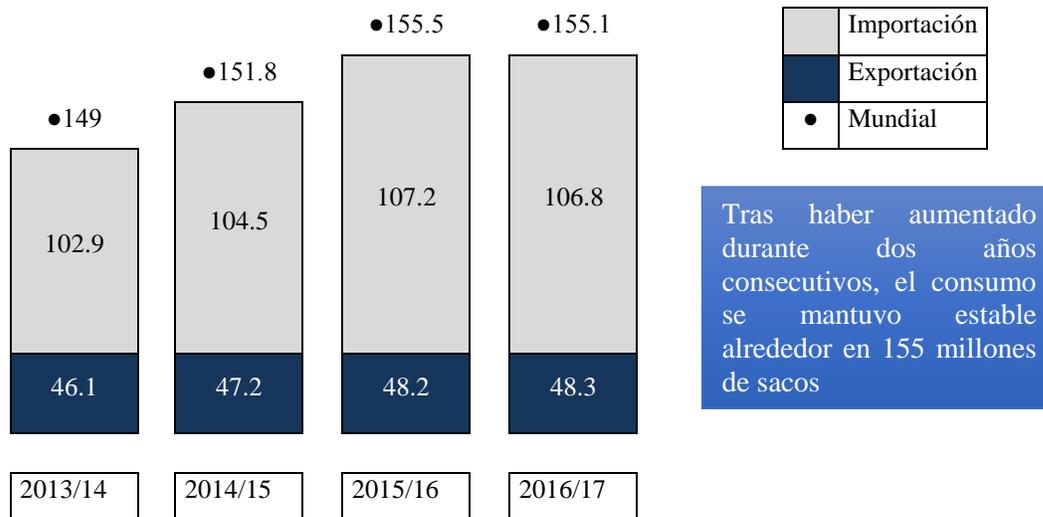


Figura 2.1 Consumo mundial de café. Fuente: © 2017 International Coffee Organization (www.ico.org).

Dentro de los 16 principales países consumidores de café en el mundo. Alemania ocupa el primer lugar, consumiendo 6.5 kg por persona, seguido de Brasil con un consumo de 5.9 kg por persona, en tercera posición se encuentra Italia con 5.6 kg. Mientras que México se ubica en décimo primer lugar en consumo de café a nivel mundial con consumo per cápita anual de 1.4 kilogramos.

2.1.2. Producción mundial de café

La producción mundial de café en el ciclo 2017/18 estimado por la OIC es de 158.56 millones de sacos, un 0.3% menor que el año pasado. La producción de *Arábica* se estima en 6.6% menor, correspondiente a 97.16 millones de sacos, mientras que la producción de *Robusta* se estima en 61.4 millones de sacos, 11.5% más que en 2016/17. La OIC estima que la producción ha crecido en todas las regiones, excepto en Sudamérica, que es 8.2% menor, con 70.57 millones de sacos. Brasil es el mayor productor de café del mundo y su producción se estimó en 51 millones de sacos en 2017/18; un 10.2% menor que en 2016/17. Sin embargo, se espera que su cosecha 2018/19 aumente como consecuencia de condiciones climáticas

favorables. La producción de Colombia, el segundo productor más grande de la región y el tercero del mundo, se estimó en 14 millones de sacos, un 43% menor que en la temporada 2016/17.

2.1.3. Principales países productores.

La Figura 2.3 muestra los principales países productores de café en el mundo. Se estima que el 74 por ciento de la producción mundial de café en 2017/18 se concentró en cinco países: Brasil (32.16 %), Vietnam (18.6 %), Colombia (8.8 %), Indonesia (6.87 %) y Honduras (5.25 %). México se ubicó en la décima posición, con una participación del 2 % de la producción mundial.

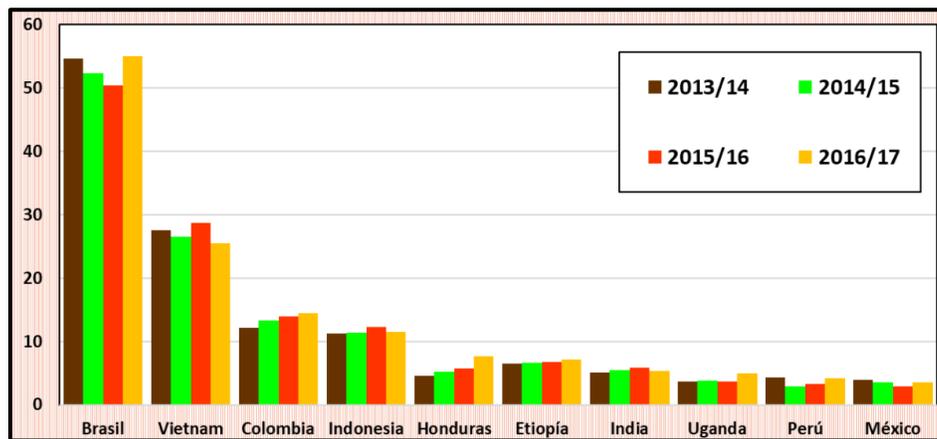


Figura 2.2 Principales países productores de café. Fuente: © 2018 International Coffee Organization (www.ico.org)

Así mismo, la principal variedad de café (Tabla 2.1) producida en el mundo es *Arábica* con una producción de 97.16 millones de sacos de 60 Kg, representando el 61.27% de la producción mundial. Por otra parte, la variedad *Robusta* se produce cerca de 61.4 millones de sacos de 60 Kg aportando un 38.72% de la producción mundial. El Anexo A presenta más información relacionada al comercio internacional del café y su importancia social y económica.

2.2. Panorama nacional

El café es un cultivo de gran importancia en México. El café representa el 0.66% del PIB nacional, este producto emplea a más de 500 000 productores de 14 entidades federativas y 480 municipios, este producto se consume a razón de 1.4 kg *per cápita* a nivel nacional. Sin embargo, México ha dejado de ser el productor principal de café orgánico del mundo en los últimos diez años desplazándose al quinto lugar, utilizando aproximadamente el 3.24% de la superficie cultivada del total de este producto para esta variedad (SIAP 2017). Siendo honduras el principal productor de café orgánico en el mundo.

El café (*Coffea arabica* L.) es originario de Etiopía, su introducción en México fue alrededor de 1790 (Medina et al., 2016), se cultiva en altitudes sobre el nivel del mar que oscilan entre 900 y 1 500 m (Ojien et al.2010). Existen más de 500 000 cafeticultores localizados en 12 estados del país, minifundistas la mayoría, dado que cerca 90% de ellos poseen superficies menores a cinco hectáreas (Flores, 2015). Se cultivan 700 000 ha, siendo Chiapas, Veracruz, Puebla y Oaxaca (Figura 2.5), los principales estados productores que en conjunto aportan cerca de 90% de la producción (SIAP, 2016).

La mayor parte de la producción de café se genera en el trópico mexicano, esta región presenta condiciones agroecológicas apropiadas para el desarrollo de cultivos perennes como el café, a pesar de esto, la producción de café ha venido disminuyendo (Figura 2.4) en los últimos años al pasar de 1 836 882.5 t en el 2000 a 1 166 025.8 t en 2014, que representa una caída cercana a 3.7% promedio anual (SIAP, 2016), datos que muestran la crisis de la producción de café en México. De acuerdo con Ortega (2013) y Temis et al. (2011) las causas de esta crisis son la presencia del hongo de la roya y la plaga de la broca, el envejecimiento de los cafetales, la falta de programas y de políticas públicas efectivas, así como los bajos precios internacionales del café. Ortega, (2013) argumenta que esta problemática induce a los productores de café a abandonar esta actividad agrícola y migrar a otras actividades económicas. A pesar de esta problemática las perspectivas para este cultivo son alentadoras, dado que los productores se enfrentan a una ventana de oportunidad ante el crecimiento del consumo del café a nivel mundial, de acuerdo con cifras de OIC (2016), el consumo *per cápita* de café en México creció a una tasa promedio anual de 0.6% durante el periodo de 2012 a 2015.

La Figura 2.6 resume los principales indicadores del comercio y la situación productiva del café en el país.

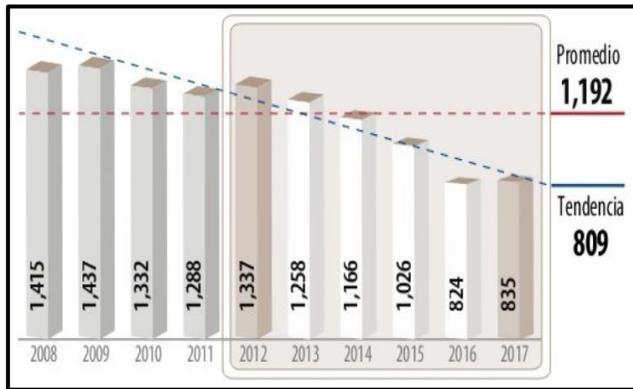


Figura 2.3 Volumen de producción nacional 2012-2017 (Miles de toneladas). Fuente: SAGARPA 2017

Rank	Entidad federativa	Volumen (toneladas)		Variación (%) 2012-2017
		2012	2017	
Total nacional		1,336,882	835,380	-37.5
1	Chiapas	532,583	339,361	-36.3
2	Veracruz	369,455	194,433	-47.4
3	Puebla	202,947	128,995	-36.4
4	Oaxaca	117,440	66,089	-43.7
5	Guerrero	48,447	41,582	-14.2
6	Hidalgo	32,880	33,891	3.1
7	Nayarit	10,785	14,054	30.3
8	San Luis Potosí	11,830	8,694	-26.5
9	Jalisco	5,311	4,506	-15.2
10	Colima	2,044	2,929	43.3
	Resto	3,159	846	-73.2

Figura 2.4 principales 10 entidades productoras. Fuente: SAGARPA 2017



Figura 2.5 Indicadores 2012-2017. Fuente: SIAP, SIAVI 2017

Variaciones %	Superficie			Volumen	Valor	Rendimiento	Precio Medio Rural
	Sembrada	Siniestrada	Cosechada	Miles de toneladas	Millones de pesos	Toneladas / hectárea	Pesos / tonelada
	Miles de hectáreas						
	722	NA	639	835	4,906	1.3	5,872
Anual 2016-2017	-1.0	NA	-1.1	1.4	8.4	2.5	7.0
TMAC 2012-2017	-0.7	NA	-1.7	-9.0	-10.7	-7.4	-1.9

2.3. El fruto, procesamiento y su contaminación

Café cereza, nombre científico *Coffea arabica L.* Se llama café o cafeto a un género de árboles de la familia de las rubiáceas. Hay más de treinta especies, pero destacan tres: la *arabica*, la *canephora* y la *iberica*. El arbusto mide entre 4 y 6 m de altura. En la madurez tiene hojas aovadas, lustrosas, verdes. Sus flores son blancas, y permanecen abiertas pocos días. Seis o siete meses después de que aparece la flor, se desarrolla el fruto, el proceso de formación y maduración de fruto se ejemplifica en la Figura 2.7, en el cual se aprecia el

cambio de color de verde claro cuando el fruto es recién formado a color rojo cuando el fruto se encuentra maduro.



Figura 2.6 Proceso de maduración, cerezas de café.

Fuente:

https://deskgram.net/p/1951556893189132820_8232362306

El siguiente esquema representa la clasificación para el Reino Plantae hasta el género *Coffea* L.

Reino plantae– Plantas

Contiene 6 especies y 3 taxones aceptados en general.

Especies *Coffea arábica* L. – Café árabe

Especies *Coffea benghalensis* Heyne ex Schult. – café de bengala

Especies *Coffea canephora* Pierre ex Froehner – café robusta

Especies *Coffea congensis* Froehner– café congo

Especies *Coffea liberica* W. Bull ex Hiern. – Café liberiano

Especies *Coffea stenophylla* G. Don – café

Fuente: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA).

Al fruto se le dice cereza, y está recubierto por una cascarilla llamada pergamino.

La planta requiere un clima cálido, pero con alto nivel de humedad; su altitud debe ser entre los 1,000 a 1,300 msnm (USDA). Dentro de sus requerimientos nutricionales, necesita un suelo rico y húmedo que absorba bien el agua y drene con rapidez el exceso de precipitación. Se cultiva en regiones frías, con temperaturas de crecimiento entre 13 y 26 °C.

2.4. Procesamiento o transformación.

Una vez realizada la cosecha del fruto del café, es sometido a un proceso o beneficiado por una de las dos vías existentes: el método húmedo y el método seco (Figura 2.8). El primero, también llamado café lavado es el más costoso y complejo. Este método emplea a los cafés arábicas de alta calidad, con la finalidad de conservar todas sus propiedades, por tal razón son los cafés más caros o mejor pagados (FAO, 2012).

De los dos procedimientos de transformación del café: a) La vía húmeda, incluye las etapas de beneficiado húmedo y seco para la obtención de café pergamino y verde; b) en el caso de la vía seca, se obtiene el café oro natural (SAGARPA, 2005). Hacia el año 2002, existían cerca de 2 mil unidades de beneficio húmedo y más de 440 unidades para el beneficio seco. En Chiapas y Veracruz se encuentran el 70.0% de beneficios húmedos y el 53.0% de beneficios secos nacionales (AMECAFÉ, 2012).

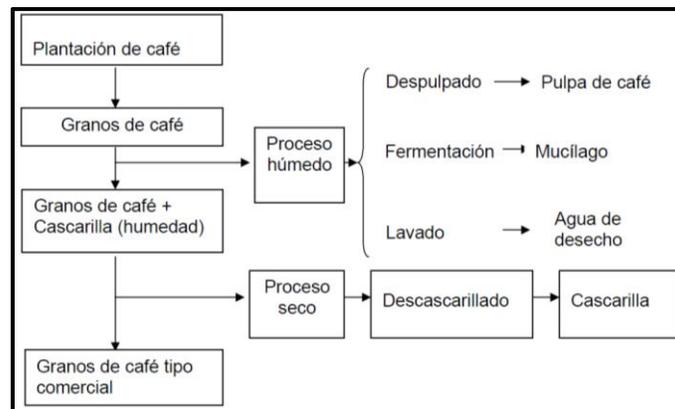


Figura 2.7 Diagrama de procesamiento del grano de café y sus subproductos

Fuente: Cadena agroalimentaria del café 2013.

Por otra parte, México se ha caracterizado por la exportación de cafés denominados suaves o lavados, por lo que cerca del 90 % de la producción nacional se beneficia a través de la vía húmeda (AMECAFÉ, 2012). No obstante el interés principal de este proyecto de investigación se centra en el beneficio del café por vía seca, por lo que no se profundizará en el beneficio por vía húmeda.

2.4.1. *Método por vía seca*

Este proceso es el más antiguo y simple, consta de las siguientes etapas: la cosecha de las cerezas, el secado (comúnmente al sol), el morteadado, la clasificación y el ensacado.

Los Estados que procesan el café por vía seca son: Guerrero, Puebla, Veracruz, Chiapas, Nayarit y San Luis Potosí; sobresaliendo Guerrero con más del 20 % de la producción total nacional (SAGARPA, 2005). Además, gracias a la optimización de este proceso se han mejorado las condiciones de venta, sobre todo al exportarse tanto a EE.UU. como a Europa, particularmente a Holanda y Alemania (SAGARPA, 2005). El beneficio seco se distingue del beneficio húmedo por la eliminación de actividades como el despulpado y lavado. Para su obtención de manera tradicional, la cereza cosechada se deshidrata hasta un valor de 12.5 % de humedad, mediante la exposición al sol en patios de cemento o similares, acomodando el grano en capas de 2 a 5 cm de grosor durante 10 a 15 días, dependiendo de la madurez del fruto y las condiciones climáticas. De este proceso se obtiene el café conocido como bola o capulín. Posteriormente con el objetivo de obtener el café verde u oro natural de calidad, se lleva al cabo un beneficio seco (Fundación PRODUCE, Chiapas, A.C. y Tecnológico de Monterrey, 2003).

Aproximadamente el 90% del café Arábica producido en Brasil se procesa por la vía seca, de igual manera para la mayoría del café de Etiopía, Haití y Paraguay y también para algunos cafés Arábicas de la India y Ecuador. Sin embargo este método no es práctico en zonas muy lluviosas, en las que la humedad atmosférica es demasiado elevada o en las que llueve con frecuencia durante la cosecha (International Coffee Organization).

2.5. Contaminación del café

Algunos hongos que crecen en el cultivo o en post-cosecha de cerezas, tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios conocidos como micotoxinas. Bennett (1987) definió las micotoxinas como “compuestos naturales de bajo peso molecular producidos por hongos que presentan toxicidad en humanos y animales”. Dependiendo de su grado de toxicidad y la cantidad ingerida, pueden producir, distintas respuestas físicas que van desde un simple malestar hasta la muerte de humanos o animales.

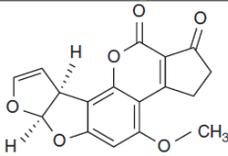
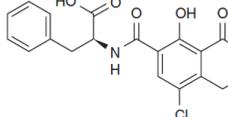
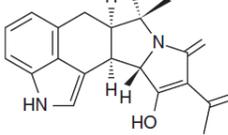
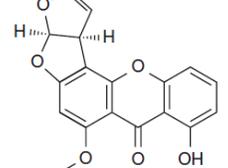
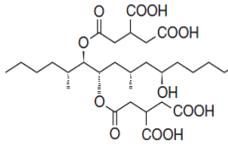
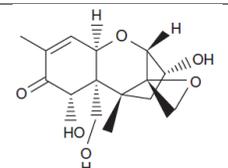
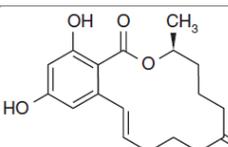
La Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) estima que el 25% de los cultivos en el mundo son afectados por micotoxinas. Los principales productores son hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Teniendo en cuenta que son toxinas naturales y que se ha demostrado complejidad para eliminarlas por completo, se acepta cierto grado de contaminación apto para el consumo humano, pero las concentraciones máximas permitidas varían según el país; por ejemplo la legislación europea ha establecido un nivel máximo de OTA en café tostado de 5 mg / kg y en café instantáneo de 10 mg / kg (Comisión Europea, 2006). Lo que implica una limitante en el comercio internacional para los países exportadores de granos. En Europa pueden llegar a existir normas hasta diez veces más exigentes que las que se existen en América.

El impacto correspondiente a la presencia de micotoxinas en alimentos incluye la pérdida de vidas humanas y animales, pérdidas económicas aunadas a la pérdida de producción agrícola, entre otros (Wu et al.2014). Por lo que se ha puesto especial atención en métodos para controlar y salvaguardar la salud pública en todo el mundo (Wu et al.2014).

A modo de ejemplo podemos señalar que en el año 2013, las pérdidas asociadas a micotoxinas en los mercados de forrajes y piensos en los Estados Unidos y Canadá se estimaron alrededor de 5500 millones de euros (Training and Reference Centre FAO / IAEA, Rome).

Actualmente, más de 400 toxinas producidas por 350 especies de hongos han sido aisladas y caracterizadas. La Tabla 2.2 muestra las principales micotoxinas presentes en alimentos y los hongos responsables de su producción, de éstas, las investigaciones se han enfocado en aquellas que causan daños significativos a humanos y animales (Brase et al. 2009). La Tabla 2.3 muestra los principales efectos en la salud causados por micotoxinas, infiriendo que las enfermedades más comunes por micotoxinas se centran en hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, teratogenicidad y posible carcinogénico.

Tabla 2.1 Lista de las micotoxinas más frecuentes encontradas y los hongos responsables de su producción.

Micotoxinas	Estructura química	Hongo productor	Sustratos
Aflatoxina B1		<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus ombycis</i> , <i>Aspergillus ochraceocephalus</i> , <i>Aspergillus nomius</i> , <i>Aspergillus pseudotamarii</i>	Cereales, cacahuets y semilla de algodón, pastel de almendra de palma y girasol, semillas de salvado de arroz, soya, gluten y germen harina de maíz pescado
Ocratoxina A		<i>Penicillium verrucosum</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus carbonarius</i>	Maíz, avena, trigo, cebada, torta del corazón de palma, salvado de arroz, guisantes y frijoles secos
Acido αciclopiazónico (CPA)		<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Penicillium griseofulvum</i> , <i>Penicillium camemberti</i> , <i>Penicillium urticae</i>	Cereales, productos cárnicos, queso
Esterigmatocistina (STG)		<i>A. versicolor</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. flavus</i>	Cereales, maíz, pan, queso, soya, ensilaje
Fumonicina (FB1)		<i>Fusarium verticilloides</i> , <i>Fusarium proliferum</i> , <i>Fusarium nygamai</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>P. camemberti</i> , <i>P. urticae</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium nalgiovense</i> , <i>Penicillium crustosum</i> , <i>Penicillium hirsutum</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Aspergillus tamarii</i>	Principalmente maíz
Deoxynivalenol (DON)		<i>Fusarium</i> spp. (<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium crookwellense</i> , <i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>Fusarium poae</i> , <i>Fusarium tricinctum</i> , <i>Fusarium acuminatum</i> , <i>Fusarium langsethiae</i>) <i>Myrothecium</i> spp., <i>Phomopsis</i> spp., <i>Stachybotrys</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp., <i>Memnoniella</i> spp.	Avena, cebada, trigo, maíz.
Zearalenona		<i>F. graminearum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Penicillium puberrelum</i> , <i>P. crustosum</i>	Maíz, trigo, avena, productos de soya, ensilaje hierba, heno, paja

Caruso D, Talamond P, Moragua Y, 2013. Micotoxinas y piscicultura: ¿un riesgo olvidado? Cah Agric 22: 165-73. doi : 10.1684/agr.2013.0627

Tabla 2.2 Especies fúngicas productoras de micotoxinas de importancia biológica y económica en humanos, animales y agricultura.

Micotoxina	Efecto	Especie
Aflatoxinas	Carcinogénico y teratogénico	<i>Aspergillus</i> spp.
Tricotecenos	Hepatotóxico, inhibición de síntesis de proteínas	<i>Fusarium</i> spp.
Fumonicinas	Hepatotóxico y nefrotóxico	<i>Fusarium</i> spp.
Ocratoxina	Nefrotóxico, Hepatotóxico, Carcinogénico	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Petromyces alliaceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i>
Zearalenona	Estrogénico	<i>Fusarium</i> spp.
Beauvericina	Citotóxico	<i>Fusarium</i> spp.
Patulina	Citotóxico	<i>Penicillium expansum</i>
Ácido tenuazonico	Hematotóxico	<i>Alternaria</i> spp.
Fomopsina	Hepatotóxico	<i>Phomopsis</i> <i>Leptostromiformis</i>
Citrinina	Nefrotóxico	<i>Monascus ruber</i>

El particular interés de este estudio se centra en la OTA producida por *Aspergillus carbonarius*, por lo que es importante describir los problemas asociados a esta toxina. Investigadores como Wu et al. (2014) han asociado la presencia de esta toxina con problemas renales. Aunque el riñón es el órgano principalmente afectado por las ocratoxinas, otros efectos adversos han sido observados en hámsteres. Estudios realizados por Hagelberg et al. (1989) han reportado anomalías cardíacas y hepáticas, así como lesiones del tracto gastrointestinal y de tejido linfoide.

Por otra parte, estas micotoxinas pueden cruzar la placenta y acumularse en el tejido fetal, induciendo malformaciones del feto conocido como teratogénesis (Wu et al.2014). Debido a la evidencia en estudios con animales, las ocratoxinas están consideradas como un grupo 2B de posibles carcinógenos para humanos (Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer por sus siglas en inglés-WHO-IARC, 1993).

Según datos de la FAO-OMS, los alimentos que más contribuyen a la ingesta humana de OTA en Europa son los cereales, el vino y el café: 50%, 13% y 10%, respectivamente. Además de las consecuencias para la salud, los granos contaminados ocasionan importantes pérdidas económicas para el sector agrícola.

Por otra parte, profundizando aún más en el entendimiento de la contaminación del café se ha optado por estudiar la ecología de la relación planta-hongo para conocer el problema de raíz. Se cree que los residuos de cultivos anteriores son la principal fuente de inóculo ya que el hongo puede sobrevivir saprofiticamente en forma de micelio y en condiciones desfavorables producirá conidios (asexuales) o ascosporas (sexuales); que posteriormente serán las fuentes de inóculo para los cultivos en proceso (Champeil et al.2004a)

El modo de propagación de las esporas puede ocurrir por el viento, las salpicaduras y el contacto entre las hojas (Figura 2.9). La etapa de la antesis (periodo de floración de las plantas) se reconoce como particularmente sensible para la colonización (Champeil et al.2004a).

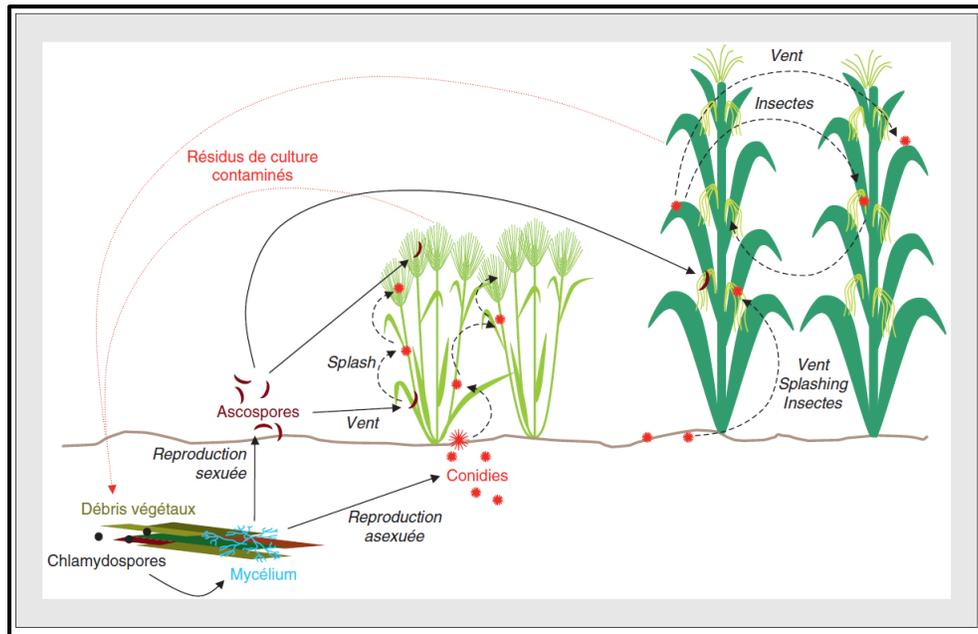


Figura 2.8 Ciclo de vida de los hongos Fito patógenos de *Fusarium*. Abbas et al. (2009).

Por otra parte, se considera que los artrópodos pueden fungir como otra forma de propagación de esporas sobre los cultivos, siendo críticos en la contaminación de los brotes de maíz. La contaminación por hongos del genero *Aspergillus*, son los llamados patógenos oportunistas, que no son muy agresivos en plantas sanas y fuertes. Pitt (1992) señala que pueden desarrollarse en plantas bajo estrés, especialmente de calor o agua. Estos hongos pueden tener

un estilo de vida saprófito sobre residuos vegetales (Horn et al.2005). Se cree que la fuente primaria de contaminación parece ser el suelo. Ya que las estructuras de supervivencia invernal compuestas de micelio compacto, germinan de forma micelial o esporogénica en la superficie del suelo, produciendo esporas que se propagan por el viento (Figura 2.10).

De igual manera, las lesiones producidas por insectos a los cultivos está asociada con la presencia de hongos y micotoxinas (Dowd et al.2003). Estas heridas permiten la entrada del inóculo fúngico transmitido por el viento y por otro lado, los insectos pueden incluso portar el inóculo fúngico sobre su superficie, los cuales al entrar en contacto con el cultivo depositan los inóculos sobre las plantas (Kabak et al.2006).

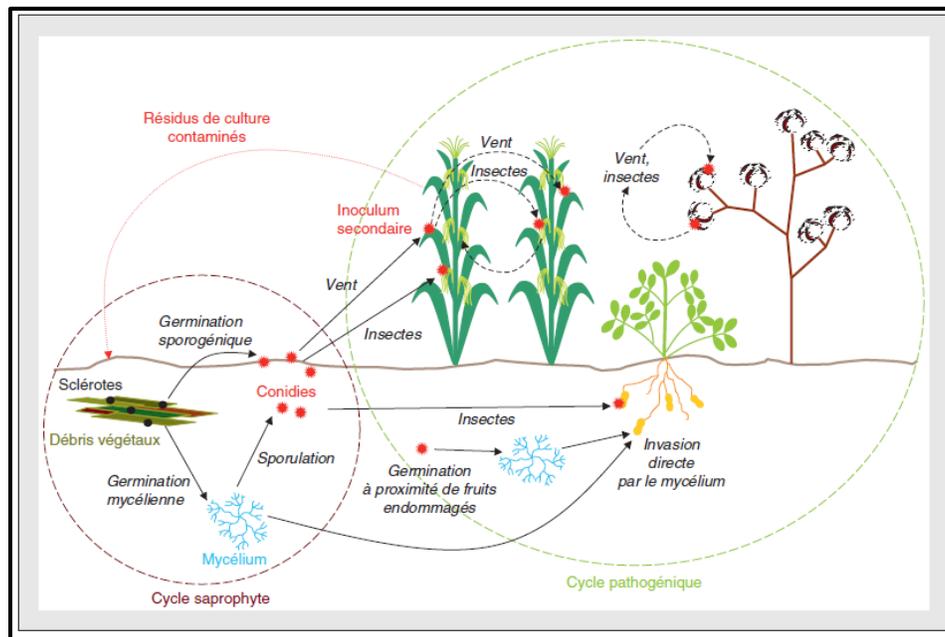


Figura 2.9 Ciclo de vida de los hongos Fito patógenos del tipo *Aspergillus*.

Abbas et al. (2009).

2.6. Prevención y tratamiento de la contaminación por micotoxinas.

Prevenir los riesgos de micotoxicosis incluye la implementación de estrategias antes y después de la cosecha. Estos últimos suelen ser clasificados como físicos, químicos y biológicos. Jouany (2007) hace una revisión exhaustiva. Estas estrategias de pre-cosecha se basan principalmente en la aplicación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y Buenas

Prácticas de manufactura (GMP). Sin embargo, se considera que el mejor tratamiento es el que se logra evitando o reduciendo la contaminación de la planta por hongos. Además la aplicación de GMP y un plan adecuado de Punto de Control Crítico de Análisis de Riesgos (HACCP) desde la recolección hasta el transporte, el secado y el almacenamiento es esencial para evitar la contaminación posterior a la cosecha, se recomienda que este plan debe cubrir todas las etapas del proceso productivo (FAO, 2001, Binder, 2007).

Mitigación de la contaminación en los cultivos

En vista del mayor riesgo causado por heridas relacionadas con insectos, la estrategia de mitigación se basa en una reducción notable de los ataques de insectos que alcanzan órganos de interés, como el insecto perforador del maíz, *Ostrinia nubilalis*, o el gorgojo del maíz, *Sitophilus zeamais* (Dowd et al. 2005). Para tal propósito se ha optado por el uso de insecticidas. Sin embargo, esta no es una tarea fácil ya que los insecticidas también pueden tener influencia sobre la producción de micotoxinas. Estudios de las décadas de 1970, 1980 y 1990 reportan estimulaciones en la producción de toxinas por el uso de varios insecticidas (D'Mello et al.1998), por lo que este campo aún se encuentra en investigación.

Control químico-biotecnológico

Principalmente como control químico se hace uso de fungicidas para el control de hongos Fito patógenos, los cuales aportan resultados significativos en la enfermedad, algunos fungicidas que son utilizados para controlar la proliferación de hongos productores de micotoxinas pueden ser triazoles, metconazol y tebuconazol, ya que han demostrado ser efectivos para el control de *Fusarium* en trigo (Edwards, 2004). Sin embargo, los efectos de la aplicación de fungicidas en la producción de micotoxinas son contradictorias y en ocasiones irregulares, además bajo ciertas condiciones, algunos fungicidas pueden incluso estimular la producción de micotoxinas (D'Mello et al.1998). Kabak et al. (2006) sugiere usar con precaución los fungicidas utilizados contra las enfermedades fúngicas, ya que también inhiben la proliferación de microorganismos benéficos, permitiendo un mejor establecimiento de los microorganismos toxígenos.

El inconveniente de los métodos químicos o sintéticos es que se le han asociado problemas de contaminación ambiental y el desarrollo de la resistencia de hongos y otros patógenos importantes, además se ha observado que los productos químicos tienen propiedades acumulativas y residuales, tales propiedades son perjudiciales para la vida humana (Zhang, Wang, Zheng, & Dong, 2007).

Por otra parte, los métodos físicos como el uso de materiales adsorbentes, han sido los métodos más utilizados en la industria de piensos con la finalidad de mitigar el problema de micotoxinas, incluso se ha empezado a utilizar bacterias capaces de reducir la biodisponibilidad de las micotoxinas de forma más o menos selectiva debido a sus propiedades físicas superficiales (Leibetseder, 2005). Algunos compuestos como los filosilicatos hidratados, como el aluminosilicato de calcio y sodio (HSCAS), bentonita o sepiolita también son utilizados para adsorber las micotoxinas. Las propiedades inherentes del material como su estructura porosa y su carga eléctrica positiva, favorecen la adsorción de micotoxinas, y como consecuencia se reduce así su biodisponibilidad. A través del tiempo se han registrado patentes cuyo fundamento se basa en el uso de materiales adsorbentes, como por ejemplo la patente ES 2 080 338, se basa en un método para identificar arcillas de montmorillonita brutas que exhibirían una elevada afinidad para la adsorción *in vitro* de aflatoxina B1. Así mismo la patente USA 6.376.001 se basa en el uso de café bajo condiciones de temperatura y humedad controlada para conseguir una porosidad y permeabilidad que permita la adsorción de micotoxinas, entre otras patentes que persiguen el mismo objetivo. Sin embargo la principal problemática del uso de materiales adsorbentes se debe a que podrían reducir atributos sensoriales tales como color, sabor, aroma y otras propiedades deseables (Grazioli et al.2006).

Por lo que el único método prometedor y seguro para controlar la OTA y a otros patógenos sin efectos nocivos para el medio ambiente y humano consiste en emplear métodos biológicos o a través de “Agentes de Control Biológico (ACB)”, estos métodos se basan en el uso e investigación de microorganismos como levaduras, bacterias y hongos no tóxicos por su capacidad antagónica contra otros microorganismos.

En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, finalmente esta propiedad natural puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos que infestan cultivos alimenticios.

Los agentes de control biológico (ACB) han demostrado ser exitosos en el control de hongos productores de OTA, entre los cuales las levaduras antagonistas desempeñan el papel principal (Chalutz y Droby 1998; Spadaro y Droby 2016). Sin embargo, estudios como los de Dickinson (1986) sugieren que para que la aplicación pre-cosecha de ACB sea exitosa, el microorganismo antagonista seleccionado debe poseer la capacidad de anclar o unirse a la superficie del fruto, ya que la adherencia persistente por el antagonista ofrece una mejor colonización y evita que las condiciones climáticas como el viento o la lluvia desalojen al microorganismo limitando su efectividad. Bajo esta condición se ha ampliado el uso e investigación de cepas bacterianas del género *Lactobacillus*, ya que son considerados microorganismos por excelencia capaces de colonizar superficies, haciendo uso de diversos mecanismos que los ayudan a anclarse a superficies de interés. Además de esto, las BAL poseen características que evocan a que sean consideradas como excelentes agentes de control biológico, por ejemplo las BAL son generalmente reconocidas como seguros (GRAS) según la FDA. Por lo cual que han recibido atención significativa como un enfoque novedoso para el control de patógenos en alimentos, así mismo se ha probado su eficacia y altos grados de bio-control, ubicándose por encima del 90% de biocontrol de hongos (Valerio et al. 2009). Se cree que la capacidad de las BAL para producir una amplia variedad de compuestos antimicrobianos coadyuvan al biocontrol de microorganismos patógenos, p.e., los productos de fermentación reductores de pH (ácidos orgánicos) como ácido láctico, acético, bacteriocinas entre otras biomoléculas (Lindgren y Dobrogosz, 1990). Estas propiedades confieren a las BAL no solo la capacidad de mitigar el problema de colonización y desarrollo de hongos micotoxigénicos, sino que también tienen la capacidad limitar la biodisponibilidad de las micotoxinas, mediante la unión o la degradación a límites aceptables por la legislación (Bleve, Grieco, Cozzi, Logrieco y Visconti, 2006). Se cree que esta característica de degradación biológica reside en la composición de los polisacáridos de membrana de estos microorganismos, que modulan la capacidad selectiva de la absorción de micotoxinas. Esta propiedad ha sido demostrada principalmente en *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces*

cerevisiae; incluso se ha demostrado que esta capacidad se mantiene después de la muerte de estos microorganismos Shetty et al. (2006).

Es importante para este estudio conocer además los diferentes mecanismos de acción que pueden llevar a cabo las BAL para mitigar el problema de contaminación de hongos micotoxigénicos en particular de *A. carbonarius* ya que el modo de acción y la variedad de estos es una característica importante para la selección de cepas como agentes de control biológico.

En otras palabras, si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno.

En la actualidad se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos, los principales y más comunes son antibiosis, competencia por nutrientes o espacio, interacciones directas (antagonismo directo) con el patógeno (parasitismo y enzimas líticas). Sin embargo, el mecanismo preciso de la acción antimicrobiana es difícil de dilucidar debido a las interacciones complejas y comúnmente sinérgicas entre diferentes compuestos (Corsetti, Gobbetti, Rossi y Daminani, 1998; Niku-Paavola, Laitila, Mattila-Sandholm y Haikara, 1999). Las investigaciones se han dirigido principalmente hacia la identificación de diferentes sustancias antimicrobianas, en sistemas simples *in vitro*, pero se sabe poco acerca de los mecanismos generales de los sistemas de preservación complejos en alimentos (Earnshaw, 1992). Hasta ahora, muy pocos estudios han reportado la caracterización de compuestos o mecanismos de biocontrol, por lo que este proyecto de investigación se enfoca no solo en probar la actividad antagónica de la cepa *Lactobacillus plantarum* en contra del hongo micotoxigénico *Aspergillus carbonarius* sino que también es de sumo interés estudiar los mecanismos antagónicos implicados en esta interacción bacteria-hongo. Los métodos más comunes utilizados para evaluar las propiedades interactivas de bacterias son mediante análisis microscópicos (Caldwell y Germida, 1985; Evans-Hurrell et al. 1993). Como el uso de microscopía electrónica (Knutton, 1995), y microscopía láser confocal (Manning, 1995) y en los últimos años se ha hecho uso de microscopía de fuerzas atómicas.

Por último, es importante mencionar que en esta sección no se profundizará más en los estudios antagónicos de BAL, mecanismos antagónicos y herramientas de microscopía

avanzada utilizadas para desarrollar el proyecto de investigación, por lo cual en cada capítulo de esta tesis se hará una descripción bibliográfica de cada etapa de investigación que coadyuvara a un entendimiento más completo y particular de cada sección.

2.7. Métodos analíticos de determinación de micotoxinas

El diagnóstico temprano y oportuno es un punto crucial para la prevención. Los métodos más rápidos, simples y económicos de detección de micotoxinas son realizados mediante inmunoensayos enzimáticos (ELISA). Sin embargo a veces es necesario utilizar métodos más precisos y oficiales, como la cromatografía en capa fina (TLC) o la cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas (LC-MS), estos métodos permiten una mejor identificación y cuantificación de las micotoxinas.

Los métodos de cromatografía de gases que utilizan detector de ionización de llama (FID), detector de captura de electrones (ECD) y la espectrometría de masas (EM) son los métodos que más se utilizan cuando se busca una detección simultánea de varias micotoxinas (Huybrechts et al.2013).

Hoy en día, la cromatografía de líquidos acoplada a detectores de ultravioleta (UV), arreglo de diodos (PDA) o de fluorescencia (FD) y HPLC acoplado a un espectrómetro de masas (LC-MS y especialmente LC-MS/MS) se utiliza cada vez más para cuantificar varias micotoxinas o metabolitos porque permite la detección simultánea de varias moléculas contenidas en una muestra (Razzazi-Fazeli et al.2002).

2.8. Referencias

- Abbas, H.K., Wilkinson, J.R., Zablutowicz, R.M, Accinelli, C., Abel, C.A., Bruns, H.A., et al., (2009). Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Review*, 28,142-53. doi: 10.1080/15569540903081590.
- Bennett, J. W. (1987). Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathologia. *Mycopathologia*. 100(1): 3-5.
- Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., Visconti, A. (2006). Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *Int J Food Microbiol.*;108(2): 204-9.
- Binder, E.M., (2007). Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Sci Technol*, 133,149-166.
- Brase, S., Encinas, A., Keck, J. y Nising, C. F. (2009). Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chemical Reviews*. 109(9), 3903-3990.
- Caldwell, D.E. and Germida, J.J., (1985). Evaluation of difference imagery for visualizing and quantitating microbial growth. *Can. J. Microbiol.*, 31: 35-44.
- Caruso D, Talamond P, Moragua Y, 2013. Micotoxinas y piscicultura: ¿un riesgo olvidado? *Cah Agric* 22: 165-73. doi: 10.1684 / agr.2013.0627
- Champeil, A.; Fourbet, J.F.; Doré, T.; Rossignol, L. *Influence of cropping system on Fusarium head blight and mycotoxin levels in winter wheat. Crop Protection*, v.23, p.531 - 537, 2004. DOI: 10.1016/j.cropro.2003.10.011.
- Chalutz, E. Droby, S. (1998). *Biological control of postharvest disease. In: Boland GJ, Kuykendall LJ (eds) Plant- Microbial interaction and biological control. Deker, New York, PP 157-170*
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J., Damiani, P. (1998). Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1998 Aug;50(2):253-6.
- Dickinson, C., (1986). Adaptations of micro-organisms to climatic conditions affecting aerial plant surfaces. *Microbiology of the phyllosphere*
- D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., Postel, D., Dijksma, W.T.P., Dujardin, A., Placinta, C.M., (1998). Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 741-51. doi: 10.1023/A:1008621505708.
- Dowd, P. (2003) insect Management to facilitate preharvest mycotoxins management. *Toxin reviews*. 22: 327-50
- Evans-Hurrell, J.A., Adler, J., Denyer, S., Rogers, T.G., y Williams, P. (1993). A method for the enumeration of bacterial adhesion to epithelial cells using image analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 107; 77-82
- Flores, V. F. 2015. La producción de café en México: ventana de oportunidad para el sector agrícola de Chiapas. *Espacio, Innovación más Desarrollo*. (7):175-193.
- Horn B.W., (2005). Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. *Journal of Toxicology Toxin reviews*: 22. 351-379
- Huybrechts B, Tangni EK, Debongnie P, Geys J, Callebaut A, 2013. Méthodes analytiques de détermination des mycotoxines dans les produits agricoles : une revue. *Cah Agric* 22: 202-15. doi: 10.1684/agr.2013.0616
- Jouany, J.P., (2007). Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 342-362.
- Kabak, B., Dobson, A.D.W., Var, I., (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 593-619. doi: 10.1080/10408390500436185
- Knutton, S., (1995). Electron microscopical methods in adhesion. *Enzymology*. 253; 145-158

- Leibetseder J, (2005). Decontamination and detoxification of mycotoxins. *Biology of growing animals*, series 4.
- Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J. (1990) Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews* 8: 149-164.
- Mariscal, A. (2011). El café orgánico de Chiapas crece a contracorriente y sin incentivo. CNN México. <http://www.ico.org/documents/cy2014-15/icc-114-5e-overview-coffee-sector-africa.pdf>--- icc-114-5e-overview-coffee-sector-africa
- Medina, M., Ruiz, N., Gómez, C., Sánchez, Y., Gómez, A., Pinto, M., (2016). Estudio del sistema de producción de café (*Coffea arabica* L.) en la región Frailesca, Chiapas. *Ciencia UAT*, 10(2), 33-43.
- Niku-Paavola, ML., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T., Haikara, A. (1999). New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *J Appl Microbiol*: 86(1):29-35.
- Ojien, V. M.; Dauzat J.; Harmand, J. M.; Lawson, G. and Vaast, P. 2010. Coffee agroforestry system in Central America: II. Development of a simple process-based model and preliminary result. *Agroforestry System*. 80:661-378.
- Ortega, H. A. y Ramírez, V. B. 2013. Crisis de la cafecultura y migración en el contexto de pobreza y marginación. El caso de los productores indígenas de Huehuetla, Puebla. *Ra Ximhai* 9(1):173-186.
- Pitt, J.I., (1992). Toxigenic *Aspergillus* and *Penicillium* species. In: Semple RL, Frio AS, Hicks PA, LozareJV, eds. *Mycotoxin prevention and control in foodgrains. Rome: Food and Agriculture Organization*
- Razzazi-Fazeli, E., Rabus, B., Cecon, B., Bohm, J., (2002). Simultaneous quantification of A-trichothecene mycotoxins in grains using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 968, 129-142. doi: 10.1016/S0021-9673(02)00957-3.
- Shetty, P.H., Jespersen, L., (2006). *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxins decontaminating agents. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 48-55.
- Temis, P. A. L.; López, M. A.; Vigil, M. E. y Sosa, M. M. E. 2011. Producción de café (*Coffea arabica* L.): cultivo, beneficio, plagas y enfermedades. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 5(2):54-74.
- Wu, F., Groopman, J. D. y Pestka, J. J. (2014). Public health impacts of foodborne mycotoxins. *Annual Review of Food Science and Technology*. 5, 351-372.
- Zhang, H., Wang, L., Zheng, X., Dong, Y., (2007). Effect of yeast antagonist in combination with heat treatment on postharvest blue mold decay and *Rhizopus* decay of peaches. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 53-58

3. Justificación.

En la actualidad el sector cafetero emplea alrededor de 26 millones de personas en 56 países productores y en más de 100 países exportadores en todo el mundo, el café es uno de los principales productos que aporta divisas, con una suma que asciende a 25000 millones de dólares, a los países relacionados con su cultivo, procesamiento y comercio. Por lo que el café es considerado un producto de gran importancia social y económica a nivel mundial.

Sin embargo, desde hace más de 50 años se han detectado la presencia de micotoxinas producidas por microorganismos del género *Aspergillus*, que contaminan, diversos alimentos, no solo el café. La Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) estima que el 25% de los cultivos en el mundo son afectados por micotoxinas, el impacto económico debido a la pérdida de producción agrícola desmesurado. A modo de ejemplo podemos señalar que las pérdidas debidas a micotoxinas en los mercados de forrajes y piensos en los Estados Unidos y Canadá se estimaban ya en 2013 en 5500 millones de euros (Training and Reference Centre FAO / IAEA, Rome).

El problema se agrava en el procesamiento del café por vía seca. Además, estas micotoxinas están asociadas a diversos trastornos de tipo neurotóxico, genotóxico, teratogénico, nefrotóxico, entre otras, por lo que, es considerado un problema de salud pública.

Por lo anterior se vuelve imprescindible realizar un estudio que brinde una comprensión más profunda de los mecanismos físicos, químicos y ecológicos de inhibición realizada por las bacterias ácido lácticas, generalmente reconocidos como seguros (GRAS), contra los hongos productores de ocratoxina A y que contribuya a generar una solución tecnológica.

Esto permitirá hacer recomendaciones sobre cómo prevenir, controlar o eliminar la ocratoxina A de las plantaciones de café.

4. Hipótesis.

Mediante el uso de técnicas biofísicas de superficies celulares y técnicas avanzadas en microscopia será posible determinar los mecanismos fisicoquímicos y ecológicos involucrados en la inhibición del crecimiento, esporulación y producción de OTA por hongos micotoxigénicos en presencia de bacterias ácido lácticas (BAL).

5. Objectivos.

5.1. Objetivo General:

Determinar las interacciones fisicoquímicas y ecológicas involucradas en los mecanismos de antagonismo de hongos ocratoxigénicos en presencia de bacterias ácido lácticas.

5.2. Objetivos específicos:

- a) Determinar la capacidad, el grado y el tipo de biocontrol llevado a cabo por la BAL *Lactobacillus plantarum* contra el hongo micotoxigénico *Aspergillus carbonarius*.
- b) Especificar la interacción predominante al coexistir ambos microorganismos en un mismo hábitat.
- c) Definir los mecanismos fisicoquímicos responsables de esa interacción.
- d) Identificar las biomoléculas membranales involucradas en esa interacción.
- e) Determinar los mecanismos antagónicos involucradas en la inhibición del crecimiento, esporulación y producción de OTA en presencia de la BAL.

6. Ensayos de Antagonismo entre *Lactobacillus plantarum* y hongo micotoxigénico *Aspergillus carbonarius*

6.1. Resumen

En los últimos años la creciente atención sobre el uso de BAL como microorganismos de control de patógenos se debe en parte a que las BAL son microorganismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS). Así mismo se ha probado su eficacia y altos grados de bio-control, ubicándose por encima del 90%. Hasta ahora, muy pocos estudios han informado sobre los mecanismos de biocontrol llevados por las BAL. La mayoría solo describe la actividad inhibitoria de BAL por acción de sus bioproductos. Sin embargo, el mecanismo preciso de acción es difícil de dilucidar, debido a los mecanismos complejos y sinérgicos que puede presentar. **Objetivo.** El objetivo de esta sección consiste en determinar la capacidad, el grado y el tipo de biocontrol llevado a cabo por *L. plantarum* contra el hongo micotoxigénico *A. carbonarius* considerado como uno de los mayores productores de (OTA) en alimentos. Ambos microorganismos endémicos de café (Djossou et al. 2011). **Métodos.** Para ello se evaluó el efecto de 5 concentraciones de bacterias lácticas sobre la capacidad inhibitoria del hongo *Aspergillus carbonarius* en medio sólido, cuya variable respuesta se reportó en inhibición del crecimiento radial del hongo (%). Así mismo se evaluó la capacidad inhibitoria de la germinación de esporas en medio líquido, por último se realizó una caracterización por HPLC de productos de fermentación de *L. plantarum*. **Resultados.** Los resultados obtenidos en esta sección aluden a biocontrol por parte de *L. plantarum* de tipo fungistático en medio sólido, manteniendo inhibición por encima del 50% durante 5-6 días. La máxima inhibición (84%) se alcanza al cuarto día, utilizando inóculo bacteriano de 5×10^4 cel/mL. respecto a los ensayos antagónicos en medio líquido se determinó biocontrol en la germinación de esporas fúngicas al menos hasta 72 h, comparados con su control (Sin BAL, condiciones óptimas nutrimentales y ambientales) cuyo inicio del proceso germinativo se determinó alrededor de 5h. Por otra parte se realizó una caracterización por HPLC de productos de fermentación de bacterias lácticas, se demostró que el uso de trehalosa como fuente de carbono propició la producción de ácidos orgánicos como ácido L- láctico, ácido D- láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico y etanol, las cuales de acuerdo a reportes bibliográficos coadyuvan al biocontrol de *A. carbonarius*.

Finalmente, lo encontrado en esta sección permiten aludir el uso eficaz de *L. plantarum* para alcanzar un alto grado de biocontrol de *A. carbonarius* como una estrategia biotecnológica novedosa y segura para mitigar el problema de contaminación por ocratoxina A en alimentos.

6.2. Introducción

En los últimos años se ha incrementado considerablemente el número de investigaciones respectivas al control de hongos micotoxigénicos en alimentos y la erradicación de micotoxinas como la ocratoxina A (OTA) en alimentos. Para tal propósito se han utilizado métodos químicos (Bellí et al.2006), físicos (Var et al.2008) y microbiológicos (Peteri et al.2007). Sin embargo, el inconveniente de los métodos químicos o sintéticos es que se le han asociado problemas de residualidad lo cual es considerado perjudicial para los seres vivos, además de inducir resistencia de hongos y otros patógenos importantes, incluso presentar problemas de contaminación ambiental, por lo que no es considerado una alternativa del todo viable (Zhang, Wang, Zheng, y Dong, 2007). De igual manera, los métodos físicos comúnmente utilizados (filtración o adsorción) para reducir la biodisponibilidad de micotoxinas por sus propiedades porosas, están asociados a problemáticas como la reducción de los atributos sensoriales del alimento, tales como color, sabor, aroma y otras propiedades deseables (Grazioli et al.2006). Por lo que el único método prometedor y seguro para controlar la OTA y a otros patógenos vegetales sin efectos nocivos para el medio ambiente y humano consiste en emplear métodos biológicos o como actualmente se conoce “Agentes de Control Biológico” (BCA, por sus siglas en inglés), lo que lleva a realizar investigaciones sobre microorganismos con capacidades antagónicas contra hongos micotoxigénicos para mitigar la problemática de contaminación (Bleve et al. 2006).

En los últimos años la creciente atención sobre el uso de BAL como microorganismos de control de patógenos se debe en parte a que las BAL se han incluido en la lista QPS (Presunción de seguridad calificada) para uso autorizado en la cadena de alimentos y piensos dentro de la Unión Europea (EFSA, 2012; EC, 2008). Además, en los E.U. Se les otorga el estado de generalmente reconocidas como seguras (GRAS) por parte de la Administración de Drogas y Alimentos de USA. Lo cual ha llevado a que las BAL reciban atención significativa como una alternativa novedosa para el control de patógenos en sistemas

alimenticios. Así mismo, se ha probado su eficacia y altos grados de bio-control de patógenos, ubicándose por encima del 90% (Valerio et al. 2009), se cree que la capacidad de las BAL para producir una amplia variedad de compuestos antimicrobianos coadyuvan al biocontrol de microorganismos patógenos. Sin embargo, el mecanismo preciso de la acción antimicrobiana es difícil de dilucidar, debido a las interacciones complejas y sinérgicas que presentan diferentes compuestos (Corsetti et al, 1998; Niku-Paavola et al. 1999).

Las investigaciones en su mayoría se enfocan en los efectos asociados entre los antagonistas bacterianos contra los patógenos fúngicos como principal interacción ecológica utilizada para el biocontrol. Por ejemplo varios estudios han demostrado el efecto antagónico de diversas cepas bacterianas contra hongos patógenos, por citar algunas investigaciones relacionadas al biocontrol mediante antagonismo, Blakeman et al. (1971) ha demostrado el efecto antagónico de una comunidad bacteriana contra la inhibición de la germinación de esporas del hongo Fito patógeno *Botrytis*, por otra parte Krechel et al. (2002) y Tariq et al. (2009) reportan que aislados bacterianos de los géneros *Pseudomonas* y *Streptomyces* demuestran antagonismo contra cepas de *V. dahliae*, *M. incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Macrophomina phaseolina*, *R. solani*., *Fusarium solani* y *F. oxysporum*. Por lo que teniendo en cuenta el amplio espectro de antagonistas microbianos reportados en las últimas décadas, y las ventajas que presenta la formulación y aplicación de nuevos productos biotecnológicos contra el control de hongos contaminantes, las investigaciones se han centrado en el descubrimiento de nuevas interacciones ecológicas que propicien un buen control contra hongos contaminantes en los cultivos.

Las investigaciones en los últimos años se han dirigido principalmente hacia la identificación de diferentes sustancias antimicrobianas en sistemas simples *in vitro*. Los estudios enfocados a moléculas antifúngicas sigue siendo bajo y la mayoría solo describe la actividad inhibitoria de BAL por acción de sus bioproductos. Hasta ahora, muy pocos estudios han informado sobre la caracterización de compuestos o mecanismos de biocontrol, algunos de ellos se encuentran resumidos en la Tabla 6.1, en su mayoría atribuyen el bio-control a compuestos bioquímicos.

Tabla 6.1 Publicaciones sobre actividad anti-fúngica de BAL

BAL	Microorganismo(s) blanco	Compuestos	Referencias
<i>Lactococcus lactis</i> C10	<i>Aspergillus parasiticus</i>	ND	Wiseman and Marth (1981)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CHD 28.3	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>Fusarium</i> spp.	Probablemente proteico	Roy et al. (1996)
<i>L. casei</i>	<i>Penicillium</i> spp.	Probablemente proteico	Gourama (1997)
<i>L. plantarum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ND	Makanjuola, Thymon, and Springham (1992)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>diacetyllactis</i> DRC1	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i>	Probablemente proteico	Batish et al. (1989)
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> CBI	<i>Fusarium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Monilia</i> spp.	Ácido caproico, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico	Corsetti et al. (1998)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> R	<i>Aspergillus fumigatus</i>		Batish, Lal, and Grover (1990)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Probablemente proteico	Vandenbergh and Kanka (1989)
<i>L. plantarum</i> VTT E78076	<i>Fusarium avenaceum</i>	Ácido benzoico, metilhidantoína, mevalonolactona ciclo (Gly-L-Leu),	Niku-Paavola et al. (1999)
<i>L. rhamnosus</i>	<i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i>	Acetato de sodio ^b	Stiles et al. (2002)
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Candida albicans</i>	Pentocin TV35b	Okkers et al. (1999)
<i>L. plantarum</i> MiLAB 393	Amplio espectro	Ácido 3-feniláctico, ciclo (Phe-Pro), ciclo (Phe-OH-Pro)	Strom et al. (2002)
<i>L. plantarum</i>	Amplio espectro	Ácido feniláctico, ácido 4-hidroxifeniláctico	Lavermicocca et al. (2000)
<i>Lactobacillus casei</i> subsp.	<i>Aspergillus flavus</i>	Probablemente proteico < 1kDa	Gourama and Bullerman (1995, 1997)
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Si3	Amplio espectro	Péptido, ácido feniláctico, ciclo (Phe-Pro), ciclo (Phe-OH-Pro), reuterin	Magnusson (2003), Magnusson and Schnurer (2001), Magnusson et al. (2003)
<i>L. plantarum</i> MiLAB14	Amplio espectro	ácidos grasos, ácido feniláctico, ciclo (Phe-Pro), ciclo (Phe-OH-Pro),	Magnusson et al. (2003), Sjogren et al. (2003), resultados no publicados
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> M3	<i>Candida</i> spp., <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Proteínico	Atanassova et al. (2003)

ND: no determinado. Fuente: Schnurer, J., Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology* 16: 70–78

Por otra parte, es importante tener presente que los mecanismos descritos en la tabla anterior (basado en compuestos bioactivos), no son exclusivos y únicos, ya que las BAL tienen la capacidad de utilizar mecanismos de acción diversos para controlar el desarrollo de patógenos. Algunos de estos son, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (mico parasitismo y lisis enzimática), antibiosis e inducción de resistencia (Orieta y Larrea 2001).

Por lo que el objetivo principal de este capítulo se basa en evaluar la capacidad, el grado y el tipo de antagonismo llevado a cabo por *Lactobacillus plantarum* para inhibir el desarrollo del hongo micotoxigénico *Aspergillus carbonarius*.

6.3. Materiales y métodos

6.3.1. Microorganismos y condiciones de cultivo.

Las cepas utilizadas fueron:

Aspergillus carbonarius. Aislada de cerezas de café

Lactobacillus plantarum. Aislada de ensilado de pulpa de café de Costa de marfil, por Djossou et al. (2011)

La cepa de BAL *Lactobacillus plantarum* se activó de la siguiente manera. Se inocularon 9 mL de medio MRS (Man Rogosa Sharpe, Anexo B), en condiciones estériles con 50 µL del conservado de la cepa BAL en medio crioprotector, posteriormente se incubó durante 24 h a 30 °C. Seguidamente, se inoculó a 9 mL de medio MRS estéril con 1 mL del cultivo del medio de activación de BAL de 24 h; cultivo que se denominó primera resiembra, se incubó por 24 h a 30 °C. Por último, se repitió el subcultivo en las mismas condiciones y se denominó segunda resiembra. Después de finalizado esto, el cultivo de BAL se utilizó para las pruebas experimentales. La concentración celular dependió de cada estudio en cuestión.

Para los cultivos fúngicos (*Aspergillus carbonarius*), se inoculó 1 matraz de 250 mL con 50 mL de PDA (Potato Dextrose Agar-Anexo B) con 50 µL de suspensión de esporas de *A. carbonarius* del medio crioprotector de activación, se incubó durante 7 días a 30 °C. Posteriormente, se agregaron 10 mL de Tween 80 0.01% estéril a un matraz con un cultivo de hongos de 7 días en PDA. Las esporas se resuspendieron con la ayuda de un agitador

magnético durante 5 min. Se utilizaron 500 μL de esta suspensión de esporas para inocular un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de PDA (resiembr) y se incubó durante 7 días a 30 °C, una vez transcurrido este tiempo, las esporas fueron utilizadas para los ensayos experimentales. La concentración celular dependió de cada estudio en cuestión.

6.3.2. Pruebas de antagonismo en medio sólido a nivel macroscópico

Se agregó agar PDA en tubos de vidrio y se esterilizaron a 120°C durante 15 min. Se prepararon suspensiones bacterianas (de los cultivos descritos en la sección anterior), en tubos con 30 mL de agar previo a gelificar a concentraciones de 5×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 4×10^7 BAL/mL. Se homogenizó cada tubo con ayuda de un vortex durante 1 min. Posteriormente se vaciaron 30 mL de cada concentración en cajas Petri por triplicado. Después de gelificar, con ayuda de un molde se formaron pozos en forma cónica en el agar con un volumen máximo de 50 μL ; cada pozo se inoculó con 35 μL de suspensión de esporas [1×10^5 esp/mL]. Posteriormente, se incubó a 30 °C y se evaluó la inhibición cada 24h durante 8 días. Los tratamientos se presentan en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2 Tratamientos experimentales.

TRATAMIENTO	BAL (cel/mL)	HONGO (esp/mL)
T1		1×10^5
T2	5×10^4	1×10^5
T3	1×10^5	1×10^5
T4	1×10^6	1×10^5
T5	1×10^7	1×10^5
T6	4×10^7	1×10^5

6.3.3. Cuantificación de la inhibición (%).

Con ayuda del programa de procesamiento de imagen digital (ImageJ versión 1.49 desarrollado por Institutos Nacionales de la Salud U.S), se estimó el área de crecimiento radial del hongo en cada tratamiento y se comparó contra el control (hongo sin bacterias).

Posteriormente, se determinó la inhibición (%) con la siguiente ecuación: $\text{Inhibición (\%)} = [1 - (a/b)] \times 100$ en cada tiempo, todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Dónde: a= Crecimiento radial de colonia fúngica en medio con BAL

b=Crecimiento radial de colonia fúngica en medio sin BAL

6.3.4. *Caracterización de productos de fermentación por HPLC*

Los cultivos de BAL de la segunda resiembra se incubaron durante 4 días a 30 °C en condiciones anaerobias en medio MRS y PDA, utilizando trehalosa como fuente de carbono; después de transcurrido este tiempo se realizó ruptura celular de bacterias mediante perlas de vidrio y agitación con ayuda de vórtex durante 10 min. La biomasa fue separada por sedimentación y el sobrenadante se concentró en un Sistema Rotavapor® R-100 B.U.C.H.I, acoplado a recirculador Chiller F-105, bomba de vacío V-100 con Interface I-100 bajo una presión de 150 mbar a 60°C. El extracto concentrado se filtró en membranas de nitrocelulosa de 0.2µm y se analizó en HPLC.

6.3.5. *Tratamiento de muestras y métodos analíticos*

Métodos analíticos para HPLC.

El análisis se realizó en un sistema HPLC Shimadzu Prominence (Shimadzu Corp. Kyoto, Japón) equipado con un horno CTO-20^a, una bomba LC-20AT, una unidad desgasificadora DGU 20AS, y un automuestreador SIL-20A HT.

Se utilizó una columna Aminex HPX-87H (300x7.8mm) + Bio-Rad con pre-columna con micro Cartucho Cación H Guardia, la temperatura de la columna fue 60°C, la fase móvil utilizada fue agua ultra pura acidificada con H₂SO₄ 5 mM, se filtró en membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm y se trabajó con un flujo de 0.6 mL min⁻¹ en modo isocrático; se usó un detector de arreglo de diodos a $\lambda=210\text{nm}$, Detectores: DAD detector de índice de refracción de la serie 1200; en modo positivo durante 25 min de tiempo de análisis. El análisis de datos se realizó utilizando el software de análisis: LabSolutions Shimadzu versión 5.71 SP1.

El estudio de ácidos orgánicos (ácido L- láctico, ácido D- láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico y etanol.) se realizó como primer paso mediante un análisis

cualitativo y semi cuantitativo con ayuda de la técnica de normalización por área

(<http://www.chromatography->

[online.org/quant/Quantitative%20Analytical%20Methods%20for%20GC%20and%20LC/Quantitative%20Analysis%20Using%20Reference%20Standards/The%20Normalization%20Method.php](http://www.chromatography-online.org/quant/Quantitative%20Analytical%20Methods%20for%20GC%20and%20LC/Quantitative%20Analysis%20Using%20Reference%20Standards/The%20Normalization%20Method.php)).

Tratamiento de muestras para microscopía óptica (campo claro).

Se colocaron 40 μ L de suspensión en portaobjetos doble cóncavo de 25.4 x 76.2mm, se colocó cubreobjetos con las mismas dimensiones y se sellaron los bordes con barniz transparente para evitar derrames.

Métodos analíticos para microscopía óptica.

Se utilizó un microscopio OLYMPUS modelo BX40F4, Cabezal trinocular para la fijación de una cámara. Oculares 10x / 22mm. Lentes objetivos acromáticos 4x, 10x, 20x, 40x, y 100x (aceite de inmersión).

Programa de procesamiento de imagen digital ImageJ versión 1.49 desarrollado por Institutos Nacionales de la Salud U.S.

6.3.6. *Pruebas de antagonismo a nivel microscópico*

El tratamiento control de hongo, se preparó medio CYA como se describe en el anexo B, el cual se contó con una solución de esporas 1×10^6 esp/mL de *A. carbonarius*. Posteriormente se realizó la preparación de muestras como se describe en la sección 6.3.5. Para su visualización en microscopía en campo claro se utilizó un microscopio OLYMPUS modelo BX40F4 descrito en la sección 6.3.5, se tomaron micrografías a un aumento de 20X al tiempo cero, 5 y 10 h.

Para el co-cultivo BAL-Hongo se colocó 90% v/v de suspensión de esporas con 1×10^6 esp/mL y 10% v/v de BAL obtenidas del punto 6.3.1. Para la preparación de las muestras en el portaobjetos cóncavo y su visualización en el microscopio se siguió el procedimiento ya descrito en la sección 6.3.5.

Se tomaron micrografías a un aumento de 40X al tiempo 3, 15 y 72 horas.

Por último, para el co-cultivo BAL-Hongo, se realizó un análisis de partículas por cuadro de enfoque con ayuda del programa de procesamiento de imagen digital ImageJ versión 1.49

6.4. Resultados y discusión

6.4.1. Pruebas de antagonismo en medio sólido a nivel macroscópico

El uso de bacterias ácido lácticas (BAL) que generalmente se reconocen como seguras (GRAS), ha recibido una atención significativa como alternativa novedosa para el control de patógenos en los sistemas alimenticios.

Los resultados de la Figura 6.1 y 6.2, muestran la inhibición del crecimiento de *Aspergillus carbonarius* causado por *L. plantarum* a diferentes concentraciones. Del análisis de los tratamientos B, C, D correspondientes a 10^4 , 10^5 y 10^6 cel/mL de BAL, respectivamente; se deduce que existe control del crecimiento y de la formación de micelio, de igual manera se logra inhibir parcialmente la esporulación en comparación con el control. La concentración de BAL que más inhibe la formación de esporas es el tratamiento B (10^5 cel/mL) ya que hasta el día 6, se aprecia un menor número de esporas comparado con los demás tratamientos. La concentración de BAL que menos inhibe la formación de esporas es D (10^6 cel/mL) ya que desde el día 2, se aprecia la producción de esporas, que los demás tratamientos no presentan en ese tiempo.

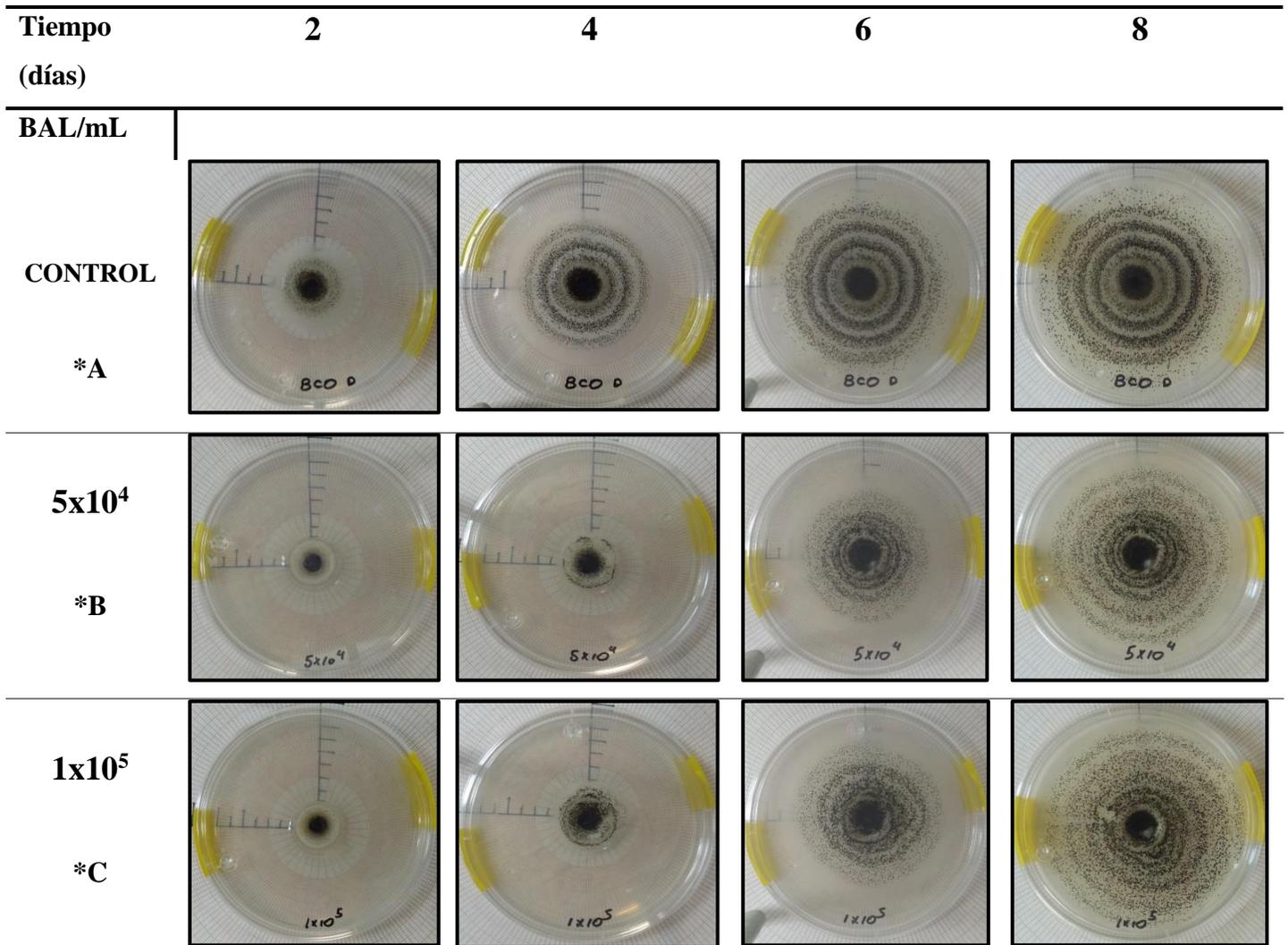


Figura 6.1 Imagen *A, crecimiento radial de *Aspergillus carbonarius* sin BAL; Imagen *B, Inhibición del crecimiento de *A. carbonarius* en co-cultivo con bacteria ácido láctica BAL [4×10^4 cel/mL]; Imagen *C, Inhibición del crecimiento de *A. carbonarius* en co-cultivo con bacteria ácido láctica BAL [1×10^5 cel/mL].

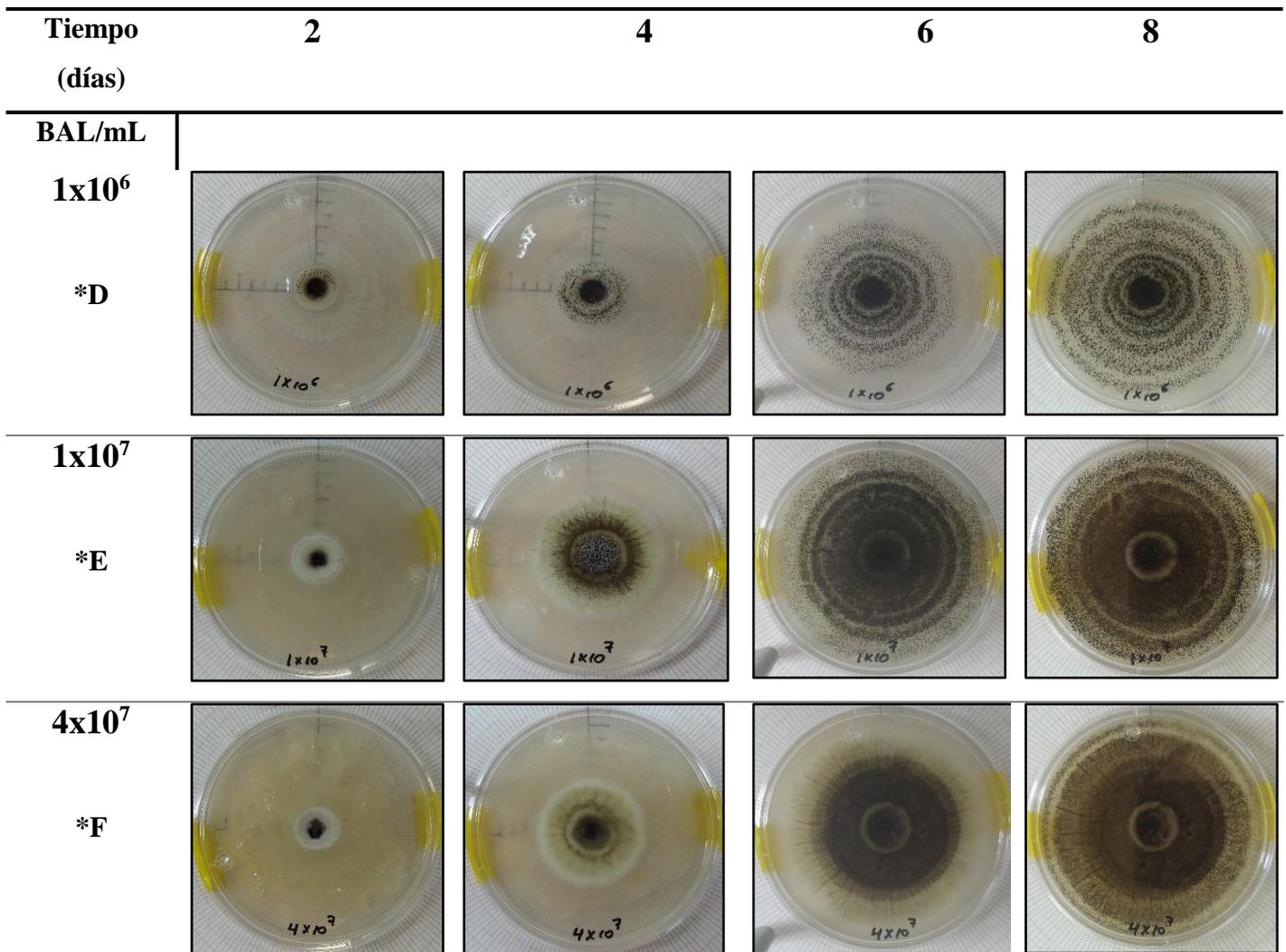


Figura 6.2 Imagen *D, co-cultivo *L. plantarum* BAL [1×10^6 cel/mL] y *A. carbonarius*; Imagen *E, co-cultivo *L. plantarum* BAL [1×10^7 cel/mL] y *A. carbonarius*; Imagen *F, co-cultivo *L. plantarum* BAL [4×10^7 cel/mL] y *A. carbonarius*.

Respecto a los tratamientos E, F (1×10^7 , 4×10^7 ce/mL), se aprecia una mayor densidad de micelio desde el día 2 con una tonalidad blanca y algodonosa; además se presenta crecimiento acelerado y repentino respecto al control, la Figura 6.3 muestra un análisis de la producción de esporas por día de *A. carbonarius* sin BAL (Control) y la producción de esporas en presencia de BAL (1×10^7 cel/ml).

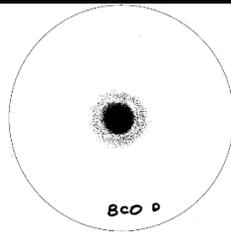
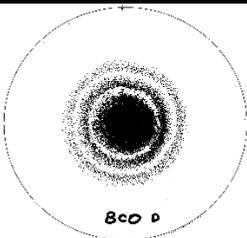
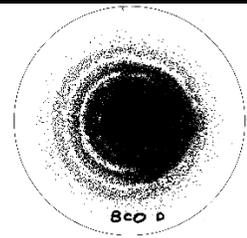
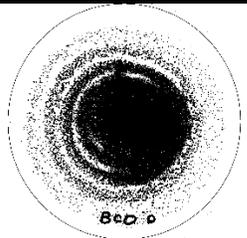
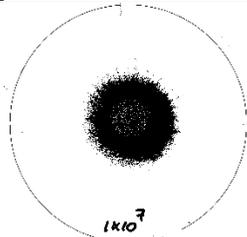
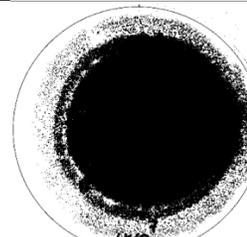
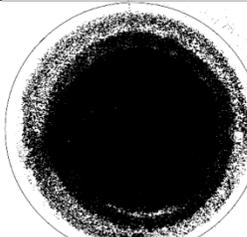
	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
CONTROL *A				
Nº esporas	1604	3716	4365	4418
4×10^7 BAL/mL *E				
Nº esporas	1	1306	4246	5304

Figura 6.3 Producción de esporas de *A. carbonarius* en ausencia y presencia de BAL. *Imágenes experimentales convertidas a sistema binario, y cuantificación de esporas en software de procesamiento digital Image J.

La Tabla 6.3 muestra el número de esporas producidas por día de *A. carbonarius* y el aumento relativo (%) respectivo a cada día. Se determinó que el aumento en la producción de esporas del día 2 al día 4 fue mayor en presencia de BAL respecto al control, de manera similar el aumento en la producción de esporas del día 4 al día 6 fue mayor en presencia de bacterias, lo que implica que la presencia de bacterias induce a que el hongo aumente su crecimiento y la producción de esporas.

Tabla 6.3 Producción de esporas en presencia y ausencia de BAL y aumento (%) por día.

Producción de esporas en ausencia de BAL			Producción de esporas en presencia de BAL		
Día	No esporas	Incremento por día (%)	Día	No. esporas	Incremento por día (%)
2	1604		2	Al menos 1	
4	3716	56.8	4	1306	99.9
6	4365	14.8	6	4246	69.2
8	4418	1.1	8	5304	19.9

Cabe mencionar que el número de esporas cuantificado mediante análisis de partículas en Image J para este sistema no es preciso, sin embargo, nos proporciona una representación del comportamiento en la producción de esporas, el cual corresponde con lo observado de manera cualitativa. Por lo que se podría sugerir que el desarrollo micelial y de esporas fue formado de una manera acelerada en presencia de bacterias.

De igual manera se determinó que la interacción bacteria-hongo, propicia la formación irregular de conidios ya que se determinó la ausencia de halos concéntricos en presencia de bacterias (Figura 6.4). Los cuales suelen estar presentes en el desarrollo del hongo bajo condiciones óptimas de desarrollo (sin BAL).

La Figura 6.4. Esquematiza la formación de conidios en ausencia y presencia de BAL.

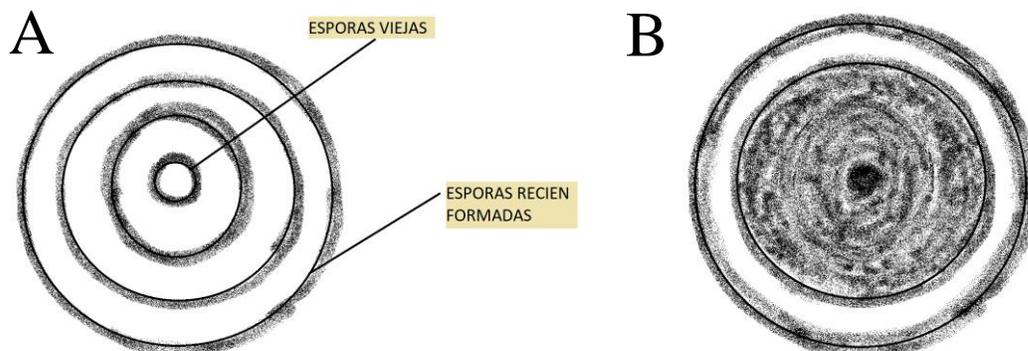


Figura 6.4 La Figura A muestra el crecimiento radial característico de hongos con formación de halos concéntricos de esporas en condiciones ambientales normales. La Figura B muestra la sobre producción de esporas bajo condiciones de estrés.

Este comportamiento de crecimiento acelerado y formación irregular de conidios se puede explicar mediante el fenómeno de competencia interespecífica, que ocurre entre individuos de diferentes especies que comparten un recurso común en la misma área. La competencia interespecífica puede alterar la evolución de las especies involucradas, esto se explica mediante el principio de exclusión competitiva, donde las especies deben adaptarse para competir o de lo contrario mueren (Begon et al. 1996). Por ejemplo, cuando en un nicho ecológico se encuentran dos microorganismos de diferente especie por ejemplo dos plantas

diferentes, estas compiten por luz, por lo cual se deben adaptar para ser las más altas, o por nutrientes lo que implica que deban adaptar el crecimiento de raíces para alcanzar mayores profundidades para obtener nutrientes (Robbins, 1995). Sin embargo, Bastidas y Camacho (1969) han demostrado que, al aumentar el grado de competencia entre plantas, la altura aumenta pero el rendimiento por planta y el número de vainas por planta disminuyen, lo que implica que acelerar el desarrollo con el fin de desplazar al microorganismo competente posiblemente repercute en la maduración fisiológica adecuada. Esto pudo ocurrir con los tratamientos E y F (1×10^7 y 4×10^7 BAL/mL), por la ausencia de halos concéntricos de esporas y por la coloración verde-café que presentaron las esporas comparado con el color negro característico del género *Aspergillus* y que se observan en el control; posiblemente estas esporas cafés no alcanzaron un estado de madurez adecuado debido a la presencia de BAL, carencia de nutrientes, entre algunos otros factores. Este comportamiento de crecimiento acelerado pudo presentarse como mecanismo de defensa del hongo para atacar el desarrollo de las bacterias lácticas. Sin embargo, el cambio de color de las esporas de negro a verde-café, puede ser una manifestación a la presencia de las bacterias para inhibir al hongo. Se sabe que la melanina es la molécula responsable de la coloración oscura de las esporas de hongos, y además esta molécula tiene la capacidad de conferir resistencia contra la luz UV, agentes oxidantes y ambientes adversos (Rosa et al. 2010; Zalar et al. 2011).

La disminución o ausencia de melanina en esporas y micelio implica debilidad y exposición de las esporas fúngicas al ser atacadas por compuestos proteicos bacterianos; esto fue estudiado por Bloomfield y Alexander (1967), quienes describieron que al retirar las espículas que contenían melanina de la superficie de esporas de *Aspergillus phoenicis*, enzimas bacterianas como quitinasas y glucanasas digirieron parcialmente los componentes estructurales superficiales. Mientras que las esporas que conservaban melanina no fueron capaces de ser dañadas fácilmente. Sin embargo, se seguirá estudiando los posibles mecanismos implicados en esta interacción. Cabe señalar que los tratamientos E y F (1×10^7 y 4×10^7 BAL/mL) analizados de manera cualitativa no se consideran adecuados para el biocontrol del hongo. Sin embargo, se hace un estudio de inhibición cuantitativo más exhaustivo para establecer cuál es el mejor tratamiento para alcanzar la máxima inhibición. La Figura 6.5 muestra las pruebas cuantitativas que evaluaron el efecto de la densidad bacteriana inoculada sobre la capacidad inhibitoria (%). Se muestra la concentración

bacteriana que obtuvo mejor inhibición (5×10^4 cel/mL) alcanzando un máximo de inhibición de 84% del hongo y la segunda mejor concentración de BAL fue de 1×10^5 cel/mL inhibiendo un 79%.

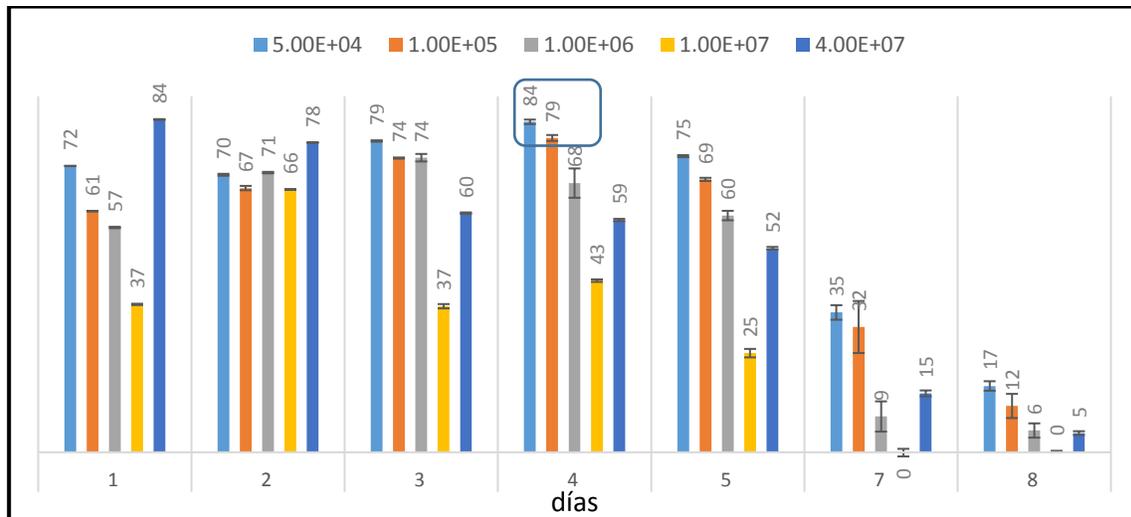


Figura 6.5 Inhibición (%) del crecimiento radial de *Aspergillus carbonarius* a diferentes concentraciones de BAL (cel/mL). Los datos utilizados para construir la gráfica se pueden consultar en el Anexo C

De igual manera, se estudió el comportamiento del efecto antagonista de la BAL a través del tiempo, como se muestra en la Figura 6.6, se determinó que el máximo nivel de inhibición se alcanzó al cuarto día, con una inhibición del 84%; a partir del quinto día se observó una disminución en el efecto antagónico, esto se puede deber a muerte celular de las bacterias y a la pérdida de actividad (labilidad) de compuestos químicos producidos por las BAL. Esto permite que el hongo se desarrolle a partir del sexto día, por lo que se concluye que *L. plantarum* presenta bio-control de tipo fungistático por encima del 50% durante los primeros 5 días de contacto.

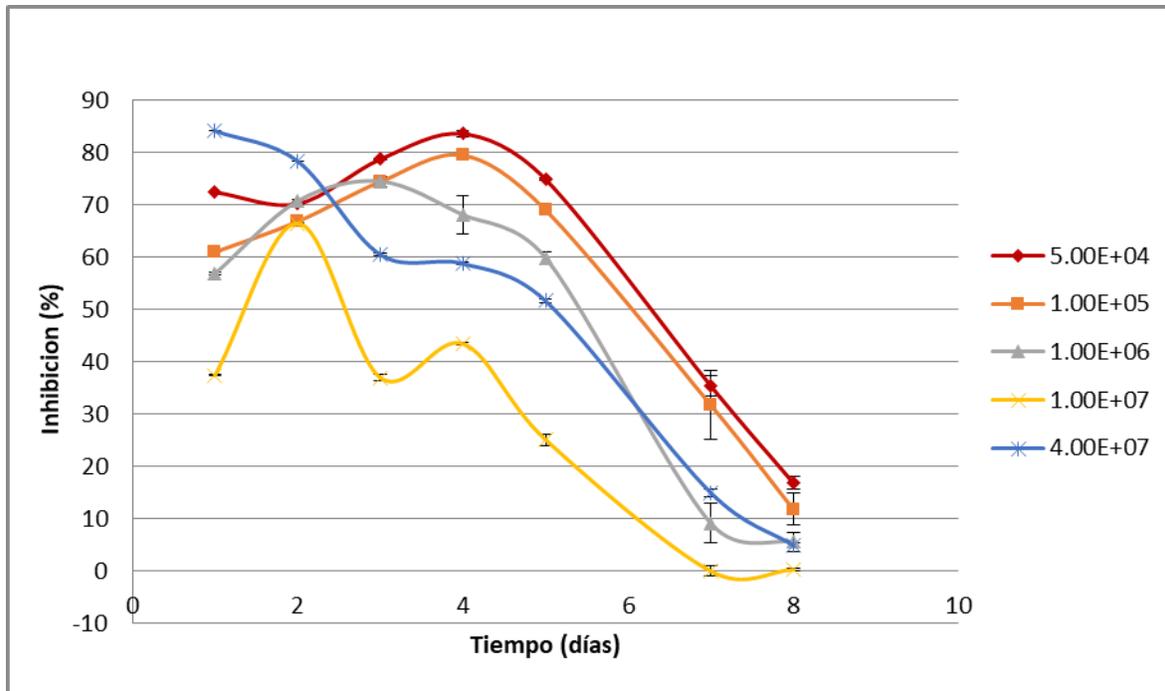


Figura 6.6 Cinética de inhibición (%) en función del tiempo. Evaluando 5 diferentes concentraciones bacterianas.

Estos resultados contrastan con lo reportado por diversos autores como Saladino et al. (2016), ellos reportan el efecto inhibitorio de 3 cepas de bifidobacterias y 13 BAL, mostrando biocontrol sobre especies de hongos micotoxigénicos como *Aspergillus* y *Penicillium*. Saladino et al. (2016) determinó que la cepa *L. plantarum* CECT 749 presentó mayor capacidad de inhibición, estos resultados concuerdan con lo reportado en este estudio sobre mecanismo de biocontrol del tipo fungistático, estos autores evalúan la aparición de micelio de los hongos estudiados, en el tiempo, usando pan como sustrato, en presencia y ausencia de BAL. El desarrollo de micelio se ve retrasado 3 y 4 días por la presencia de las bacterias *L. bulgaricus* y *L. plantarum* respectivamente, posterior a esos días el hongo se desarrolla sobre el sustrato. Así mismo, Matei et al. (2015), reportaron la inhibición (%) de *A. ochraceus* para 6 cepas de BAL, con biocontrol máximo de 85 y 84 % en contra del desarrollo de este hongo; por otra parte, también estudiaron la evolución de la inhibición de *A. ochraceus* a través del tiempo. Se determinó que el biocontrol pierde actividad después de los 5 días.

Aunado a todo esto, los resultados obtenidos por Belkacem-Hanfi et al. (2014), apoyan el uso eficaz de BAL para el bio-control de hongos micotoxigénicos como *Aspergillus*,

Penicillium, *Fusarium* entre otros, reportando una inhibición de 60% empleando *Lactobacillus plantarum*.

Por último, se han estudiado una gran cantidad de BAL por diversos autores, por ejemplo Valerio et al. (2009), concluyen que *Lactobacillus citreum*, *Lactobacillus mesenteroides*, *L. plantarum* y *Lactobacillus rossiae*, son cepas que inhiben más del 90% del crecimiento de hongos y de levaduras como *Endomyces fibuliger*; por lo que es creciente la atención que se ha puesto al uso de BAL como agentes de control biológico por su eficacia y alto grado de bio-control.

6.4.2. Caracterización por HPLC de productos de fermentación de BAL.

Los productos de fermentación producidos por la bacteria láctica *Lactobacillus plantarum*, fueron caracterizados utilizando dos medios de cultivos diferentes. La Figura 6.7 y 6.8 se muestran los cromatogramas obtenidos con medio MRS y CYA utilizando trehalosa como fuente de carbono (20 g/L)

Para este estudio, se planeó utilizar trehalosa por su amplia distribución en la naturaleza. Se tiene evidencia de su presencia en angiospermas como tabaco, arroz entre otros, lo cual implica que se encuentra en todas las plantas superiores y que podría ser aprovechada mediante procesos biotecnológicos, permitiendo formular un medio de crecimiento económico y sustentable para BAL.

Por otra parte, la trehalosa es fermentada por las bacterias, para producir ácidos orgánicos como ácido L- láctico, ácido D- láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico y etanol (Figura 6.7), productos que fueron detectados de la fermentación de medio MRS, además se presenta aparentemente una mayor producción de ácido fórmico, como se muestra en la Tabla 6.4, la cual muestra la proporción de área (%) correspondiente a cada compuesto, se determinó que el compuesto con mayor proporción en área (%) es el ácido fórmico, con un poco más del 50 % del total de áreas de los compuestos detectados.

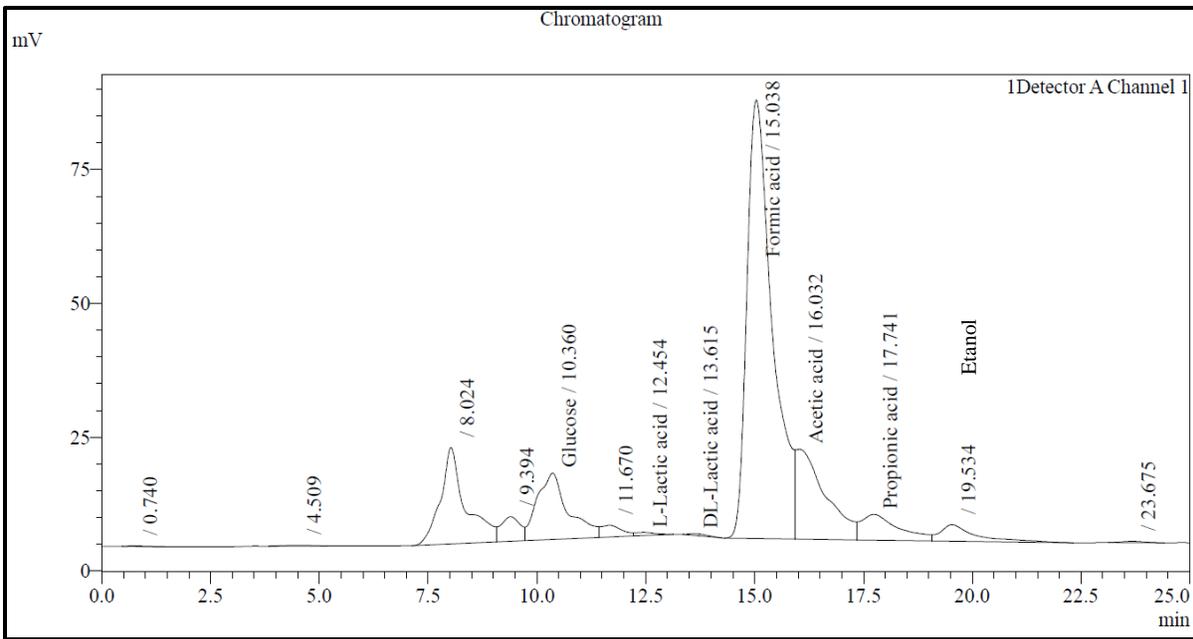


Figura 6.7 Cromatograma de productos de fermentación por *L. plantarum* en medio MRS.

Tabla 6.4 Área (%) representativa de cada producto de fermentación del medio MRS

Compuesto	Tiempo. Retención (min)	Área	Área (%)
ND	0.74	2580	0.04
ND	4.509	8792	0.13
ND	8.024	796102	11.58
ND	9.394	157632	2.29
Glucosa	10.36	689177	10.02
ND	11.67	80813	1.18
Ácido L- láctico	12.454	21702	0.32
Ácido D- láctico	13.615	11335	0.16
Ácido fórmico	15.038	3711982	53.98
Ácido acético	16.032	872848	12.69
Ácido propiónico	17.741	321922	4.68
Etanol	19.534	192223	2.80
ND	23.675	9766	0.14
Total		6876873	

ND: compuesto no determinado

Por otra parte, los productos de fermentación del medio CYA por *L. plantarum* fueron ácido-D-láctico, ácido propiónico y etanol (Figura 6.8). Favoreciéndose aparentemente la producción de ácido propiónico como se muestra en la Tabla 6.5 la cual muestra la

proporción de área (%) correspondiente a cada compuesto, se determinó que el compuesto con mayor proporción en área (%) es el ácido propiónico (75%).

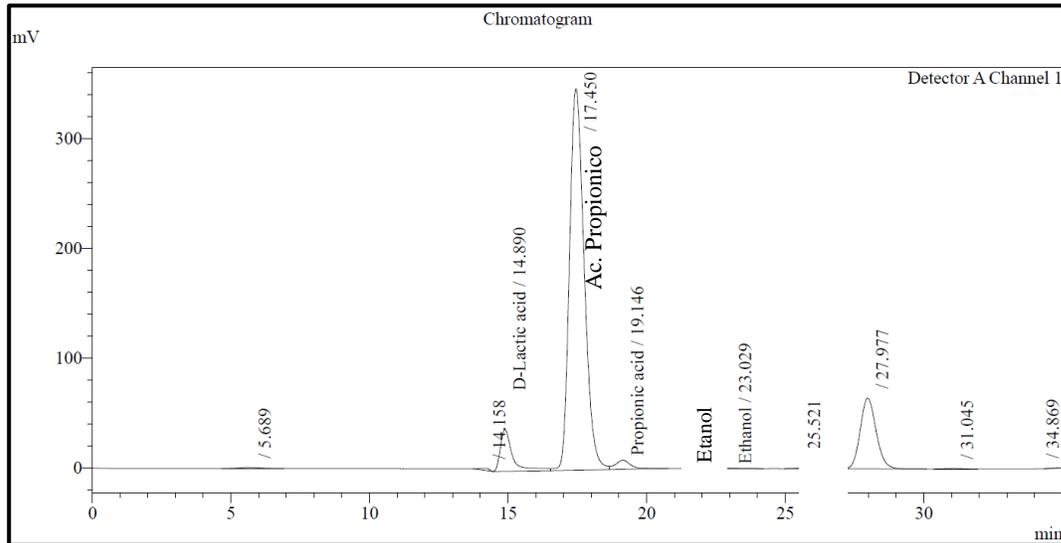


Figura 6.8 Cromatograma de productos de fermentación por *L. plantarum* en medio CYA.

Tabla 6.5 Área representativa (%) de cada compuesto de fermentación del medio CYA

Compuesto	Tiempo retención (min)	Área	Área (%)
ND	5.689	52277	0.31
ND	14.158	44681	0.26
Ácido D- láctico	14.89	1165277	6.84
Ácido propiónico	17.45	12798524	75.12
Ethanol	19.146	333544	1.96
ND	23.029	16772	0.10
ND	25.521	17187	0.10
ND	27.977	2582747	15.16
ND	31.045	22599	0.13
ND	34.869	4855	0.03
Total		17038462	100.00

ND: compuesto no determinado

Sin embargo, se planea comprobar esta premisa como experimentación futura mediante cuantificación de los compuestos por método de patrón externo.

Por otra parte, estos ácidos orgánicos proporcionan un ambiente ácido desfavorable para el crecimiento de muchos microorganismos patógenos (Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2010). De hecho, los ácidos débiles entre ellos la mayoría de los ácidos orgánicos permite que sean liposolubles, lo que les permite atravesar la membrana celular y alcanzar el citoplasma de patógenos (Djadouni y Kihal, 2012; Haller et al.2001). En su forma hidrófoba no disociada permite liberar iones H^+ para reducir el pH citoplásmico y detener las actividades metabólicas (Axelsson, 1990; Piard y Desmazeaud, 1991). Además, se piensa que los ácidos orgánicos neutralizan el potencial electroquímico de la membrana plasmática y aumentan su permeabilidad que conduce a la muerte de organismos susceptibles (Batish et al.1997). Esta propiedad se demostró para los ácidos acético y propiónico (Eklund, 1989) los cuales son producidos por la bacteria estudiada en este trabajo. Sin embargo, se ha reportado que las BAL heterofermentativas producen ácido acético en presencia de aceptores de electrones externos en niveles relativamente altos. Mientras que el ácido propiónico sólo se produce en cantidades traza, pero bajo las condiciones estudiadas en este trabajo se ha demostrado que la producción de ácido propiónico aparentemente se ve favorecida, al igual que la producción de ácido fórmico, sin embargo, es necesario comprobar esta premisa mediante cuantificación de compuestos por el método de patrón externo.

Al ácido propiónico se le atribuye la reducción en el crecimiento de hongos, especialmente a un pH más bajo (Woolford, 1984a), afecta las membranas de hongos a valores de pH por debajo de 4.5 (Hunter y Segel, 1973). El ácido propiónico y el ácido acético también inhiben la absorción de aminoácidos (Eklund, 1989; Freese et al.1973). También es importante mencionar que las sales de los ácidos, como el propionato de sodio y el propionato de amonio, muestran un efecto similar contra la levadura y los mohos filamentosos a valores bajos de pH (Woolford, 1984b).

Se ha tratado de averiguar cuál es la molécula responsable de la inhibición. Sin embargo, es muy difícil de dilucidar, ya que se sabe que los compuestos antifúngicos producidos por las bacterias pueden presentar interacciones químicas entre ellas. Por ejemplo, el ácido láctico producido durante el crecimiento de BAL y el acetato de sodio encontrado en el medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe, 1960), sinérgicamente presentan efecto antifungicos (Cabo et al.2002; Stiles et al. 2002). Así mismo el acetato de sodio en MRS puede actuar en sinergia con compuestos producidos por las BAL (Stiles et al.2002). Incluso Moon, (1983) determinó

que la mezcla de varios ácidos orgánicos (ácido láctico, acético y propiónico) presentan efectos antifúngicos diferentes en la inhibición de levaduras comparado con el efecto antifúngico de los ácidos individuales.

Otros posibles compuestos producidos por las bacterias lácticas estudiadas y que pueden coadyuvar en el biocontrol de hongos micotoxigénicos son las flavoproteínas oxidasas, que son producidos por la mayoría de las BAL, lo que les permite producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en presencia de oxígeno. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se acumula en el medio ambiente ya que las BAL no producen catalasa (Condon, 1987). El efecto antimicrobiano del H_2O_2 está bien documentado (Davidson et al. 1983) y se atribuye a un fuerte efecto oxidante de la célula bacteriana y a la destrucción de las estructuras moleculares básicas de las proteínas celulares. Sin embargo, Rodríguez et al. (1997), sugirieron que el medio MRS debería usarse como sustrato cuando se seleccionan sustancias antimicrobianas distintas del H_2O_2 , ya que encontraron que el H_2O_2 se descompone rápidamente en MRS, probablemente debido a la actividad de la catalasa presente en el extracto de levadura, descomponiéndolo en $2H_2O$ y O_2 . En particular, en este estudio, se propone al medio CYA como mejor medio para alcanzar mejor biocontrol, ya que demostró favorecer la producción de ácido propiónico (con fuertes propiedades antifúngicas), además la literatura sugiere que los compuestos oxidantes producidos por las BAL no se ven afectados por los componentes de este medio lo cual coadyuva a mejorar el biocontrol.

Por último, es importante mencionar que las BAL no solo tienen la capacidad de producir ácidos orgánicos que pueden ser usados como compuestos antifúngicos, también poseen la habilidad de producir biomoléculas con la misma capacidad inhibitoria. Estas biomoléculas pueden ser ácidos grasos de cadena larga (Rao y Reddy, 1984; Woolford, 1975; Baird-Parker, 1980) y compuestos proteicos los cuales son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente a los cuales se les ha asociado como causantes del principal efecto de biocontrol. Autores como Batish et al. (1989); Roy et al. (1996) y Gourama, (1997) han reportado que la actividad antifúngica se pierde después del tratamiento con enzimas proteolíticas por lo que sugirieron que la sustancia antifúngica producida por las BAL es de naturaleza proteica.

6.4.3. Pruebas de antagonismo en medio líquido a nivel microscópico

Las micrografías A de la Figura 6.9, muestran la evolución temporal del proceso germinativo de las esporas de *A. carbonarius* bajo condiciones ambientales y nutricionales favorables en medio líquido. Estas fueron observadas en microscopia óptica a 20X, después de 5 horas el proceso germinativo se inició y posteriormente a las 10 horas se vuelve evidente la formación de células vegetativas. Estos tiempos característicos, son comparables con lo reportado por Schmit y Brody, (1976) y Novodvorska et al. (2013), Quienes estudiaron el proceso germinativo de *A. niger*, reportaron que la síntesis y el procesamiento de ARN es un evento temprano en la germinación que se inicia en la primera hora, posteriormente la mitosis ocurre más tarde entre las 2 y 4 h (Osharov et al.2001, Novodvorska et al.2013), antes de la aparición del tubo germinal que ocurre alrededor de las 6 h en condiciones típicas de *Aspergillus spp.* De igual manera Hayer, (2014) estudiaron el proceso de hinchamiento de esporas a través del tiempo asociado al proceso germinativo, determinaron que el área máxima de las esporas durante la germinación, es de $39.99 \pm 9.57 \mu\text{m}^2$ cuando el tubo germinativo está presente, lo que corresponde a un diámetro aproximado de 8-9 μm .

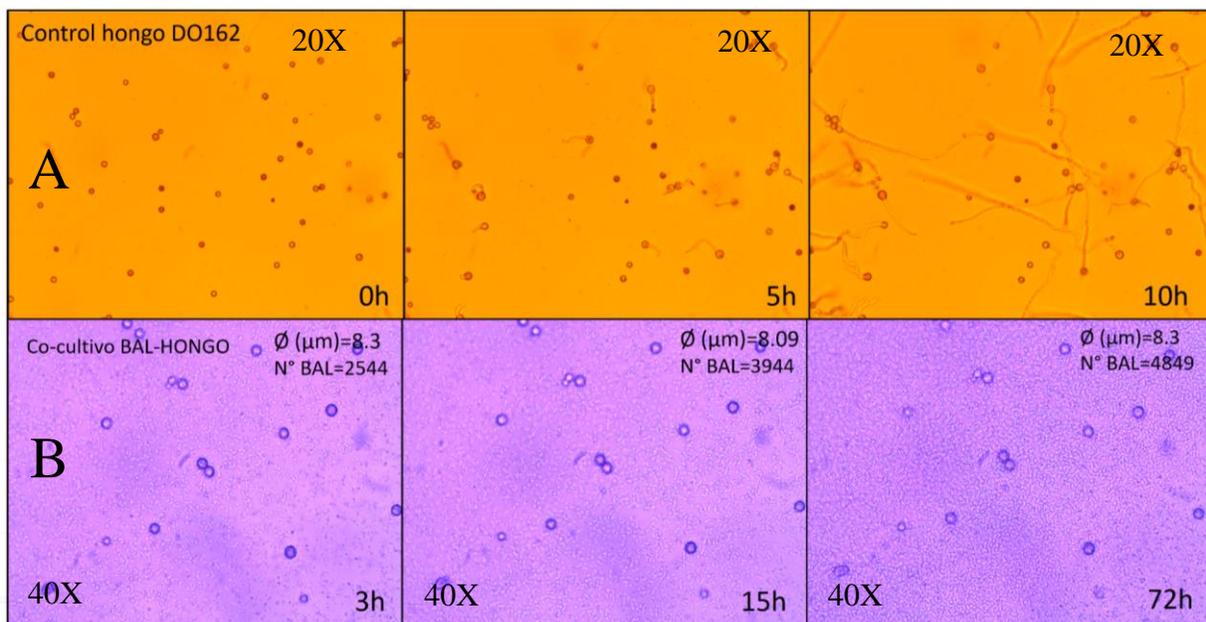
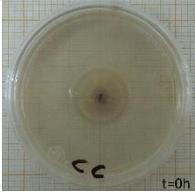
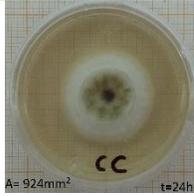
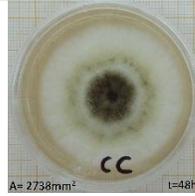
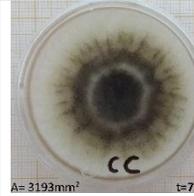
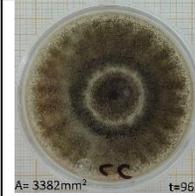
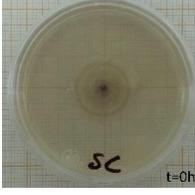
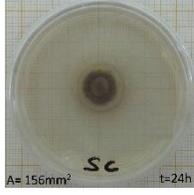
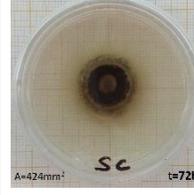
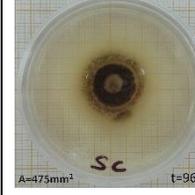


Figura 6.9 Micrografía A, serie de tiempo del proceso germinativo de esporas de *Aspergillus carbonarius* bajo condiciones nutrimentales y ambientales favorables. Micrografías B, co-cultivo (cc) de esporas de *Aspergillus carbonarius* y BAL. *El conteo bacteriano y la determinación del diámetro de esporas se describen en el Anexo D

Por otra parte, las micrografías B de la Figura 6.9, muestran el co-cultivo BAL-esporas fúngicas y su interacción a través del tiempo. Se observó en microscopia óptica a 40X y se monitoreo el crecimiento bacteriano a través del tiempo con ayuda del software de procesamiento de imagen digital (Image J) realizándose conteo celular bacteriano en cada campo de observación. Por otra parte, se monitoreo el incremento en el diámetro de esporas, que está relacionado con el inicio de los procesos bioquímicos relacionados con la germinación de esporas fúngicas. Los resultados de este experimento, muestran evidencia de efectos antagónicos de las bacterias en contra de la germinación de esporas fúngicas en medio líquido; el diámetro de las esporas se mantuvo constante alrededor de 8 μm durante 72h; mientras que en ausencia de bacterias las esporas inician su proceso germinativo a las 5h. Cabe mencionar, que las bacterias no se ven afectadas por la presencia de las esporas, ya que el número de bacterias incrementó de 2544 a 4849 en función del tiempo, lo que implica que su desarrollo no se ve afectado. El estado de dormancia que presentan las esporas fúngicas en presencia de BAL se presenta como mecanismo ante un ambiente que puede ser no óptimo o incluso dañino. En principio, se podría pensar que una de las causas de inhibición se debe al fenómeno de competencia por nutrientes, que ocurre cuando dos microorganismos coexisten en un mismo hábitat.

Sin embargo, se ha demostrado que algunos hongos inician su proceso germinativo bajo condiciones nutrimentales adversas, por ejemplo *A. niger* puede comenzar a germinar en agua, sin presencia de nutrientes, aunque no se logrará un crecimiento adecuado. Para el crecimiento se requiere δ -glucosa, δ -manosa o δ -xilosa (Hayer, Stratford y Archer, 2013). En el caso particular del hongo estudiado, *Aspergillus carbonarius*, se ha demostrado experimentalmente en este estudio la capacidad de germinar bajo limitaciones nutrimentales incluso en ausencia de fuentes de carbono (Tabla 6.6).

Tabla 6.6 Capacidad germinativa de *A. carbonarius* en presencia y ausencia de fuente de carbono.

	t=0 h	t=24 h	t=48 h	t=72 h	t=96 h
Con fuente de carbono (glucosa 20g/L)	 t=0h	 A= 924mm ² t=24h	 A= 2738mm ² t=48h	 A= 3193mm ² t=72h	 A= 3382mm ² t=96h
Sin fuente de carbono	 t=0h	 A= 156mm ² t=24h	 A= 258mm ² t=48h	 A= 424mm ² t=72h	 A= 475mm ² t=96h

Por último cabe mencionar que los estudios respectivos a los mecanismos de biocontrol llevados a cabo por *L. plantarum* y que fueron demostrados en este capítulo serán discutidos en el Capítulo 7.

6.5. Conclusiones y perspectivas

En este capítulo se evaluó la capacidad antagónica de BAL del género *Lactobacillus plantarum*, en contra del hongo micotoxigénico *Aspergillus carbonarius*, se determinó que la concentración de *L. plantarum* en medio sólido para alcanzar el máximo biocontrol (84%) es de 5×10^4 cel/mL, el mayor efecto inhibitorio es alcanzado en el cuarto día, y la segunda mejor concentración bacteriana es de 1×10^5 cel/mL inhibiendo un 79% en el quinto día. *L. plantarum* tienen la capacidad de inhibir el desarrollo fúngico por encima del 50% durante 5-6 días, posterior a ello el biocontrol disminuye, el hongo crece, por lo que se determinó que el biocontrol llevado a cabo por las bacterias es del tipo fungistático.

Por otra parte, las pruebas de antagonismo a nivel microscópico en medio líquido, muestran evidencia de que la presencia de BAL propicia que las esporas de *A. carbonarius* se mantengan en estado de dormancia al menos durante 72h. Lo que implica que las bacterias llevan a cabo biocontrol de la germinación de esporas del hongo micotoxigénico.

Las BAL estudiadas demostraron capacidad para fermentar trehalosa como fuente de carbono en los medios MRS y CYA, producen mayoritariamente ácido fórmico y ácido propiónico, respectivamente, que podrían estar implicados en el biocontrol observado.

Perspectivas.

En trabajos futuros se podría diseñar una estrategia que consista en usar la concentración óptima bacteriana a inocular y la adición de un extracto libre de células concentrado como factores para formular un bioproducto bacteriano, eficaz para el control biológico de *A. carbonarius* y la producción de ocratoxina.

Así mismo es relevante estudiar la cinética de producción de OTA y biomasa fúngica en función del tiempo, con la finalidad de encontrar mediante un diseño factorial cuales son las combinaciones de variables que propicien el mayor biocontrol.

De igual manera, una vez demostrada la capacidad de las bacterias para fermentar la trehalosa como fuente de carbono para la producción de ácidos orgánicos, sería interesante formular un medio de cultivo a base de sustratos como tabaco, arroz entre otros, que han demostrado la presencia de trehalosa, con la finalidad de contar con un medio económico y sustentable. Finalmente es de interés ampliar el estudio de inhibición y de mecanismos antagónicos a un número mayor de cepas de bacterias lácticas con diferentes grados de inhibición, aisladas de

ensilaje de pulpa de café antes y durante el proceso de secado. Con la finalidad de determinar similitudes y diferencias en los mecanismos de acción y los niveles de biocontrol de cada cepa.

6.6. Referencias

- Axelsson, L. (1990). *Lactobacillus reuteri* a Member of the Gut Bacterial Flora (Ph.D. thesis). Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Baird-Parker, A. C. (1980). Organic acids. In J. H. Silliker (Ed.), *Microbial ecology of foods* (pp. 126–135). New York: Academic press.
- Bastidas y Camacho (1969). Competencia entre plantas y su efecto en el rendimiento y otras características del frijol variedad caraota. *Acta Agronomica* 19: 69-88.
- Batish, V.K., Roy, U., Lal, R., Grover, S. (1997). Antifungal attributes of lactic acid bacteria a review. *Critical Reviews in Biotechnology* 17: 2009–2225.
- Begon, M., Harper, J. L., Townsend, C. R. (1996) *Ecology: Individuals, populations and communities*. Blackwell Science.
- Belkacem-Hanfi, N., Fhoula, I., Semmar, N., Guesmi, A., Perraud-Gaime, I., Hadda-Imen Ouzari, Boudabous, A., Roussos, S. (2014). Lactic acid bacteria against post-harvest moulds and ochratoxin A isolated from stored wheat. *Biological Control* 76, 52–59
- Bellí, N., Marín, S., Sanchis, V., y Ramos, A. J. (2006). Impact of fungicides on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on synthetic grape-like medium and on grapes. *Food Additives and Contaminants*, 23: 1021-1029.
- Blakeman, J.P. y Fraser, A. K. (1971). Inhibition of *Botrytis cinerea* spores by bacteria on the surface of chrysanthemum leaves. *Physiological Plant Pathology*, 1: 45-54
- Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., y Visconti, A. (2006). Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 204-209.
- Bloomfield, B.J y Alexander, M. (1967) Melanins and Resistance of Fungi to Lysis. ; 93 (4): 1276-1280.)
- Cabo, M. L., Braber, A. F., y Koenraad, P. M. (2002). Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. *Journal of Food Protection*, 65: 1309–1316.
- Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Reviews*, 46: 269–280.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J., y Damiani, P. (1998). Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50: 253–256.
- Davidson, M. P. (2001). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, y T. J. Montville (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*. (pp. 593–627). Washington: ASM press.
- Djadouni, F., y Kihal, M. (2012). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and then spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55: 435-443.
- Eklund, T. (1989). Organic acid and esters. In: Gould, G.W. (Ed.), *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedure*. Elsevier, New York, 161–200.
- Eklund, T., (1989). *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedure. Organic acid and esters*. 161–200.
- Freese, E., Sheu, C. W., y Galliers, E. (1973). Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*, 241: 321–325.
- Gourama, H. (1997). Inhibition of growth and mycotoxin production of *Penicillium* by *Lactobacillus* species. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 30: 279–283.
- Gourama, H., y Bullerman, L. B. (1997). Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. *International Journal of Food Microbiology*, 34, 131–143.
- Grazioli, B., Fumi, M. D., y Silva, A. (2006). The role of processing on ochratoxin A content in Italian must and wine: a study on naturally contaminated grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 93-96.
- Haller, D., Colbus, H., Ganzle, M. G., Scherenbacher, P., Bode, C., y Hammes, W. P. (2001). Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastrointestinal ecosystem: A comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Systematic and Applied Microbiology*, 24: 218-226.

- Hayer K., Stratford M., Archer D.B. (2013). Structural features of sugars that trigger or support conidial germination in the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*. 79:6924–6931.
- Hayer K., Stratford M., Archer D.B. (2014). Germination of *Aspergillus niger* conidia is triggered by nitrogen compounds related to l-amino acids. *Applied and Environmental Microbiology*. 80:6046–6053.
- Hunter, D. R., y Segel, I. H. (1973). Effect of weak acids on amino acid transport by *Penicillium chrysogenum*: evidence for a proton or charge gradient as the driving force. *Journal of Bacteriology*, 113: 1184–1192.
- Krechel A., Faupel, A., Hallmann, J., Ulrich, A., Berg, G. (2002). Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Canadian Journal of Microbiology*. 48(9):772-86.
- Matei, Cornea, Rodino, Iordache y Butu, (2015). Assessment of Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Strains Against Bread Spoilage Fungus *Aspergillus ochraceus*. *Food Science and Technology* 72(2)
- Moon, N. J. (1983). Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate, and their synergistic mixtures. *Journal of Applied Bacteriology*, 55: 453–460.
- Niku-Paavola, M. L., A. Laitila, T. Mattila-Sandholm, y A. Haikara. (1999). New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*. 86:29–35.
- Novodvorska M., Hayer K., Pullan S.T., Wilson R., Blythe M.J., Stam H., Stratford M., Archer D.B. (2013). Transcriptional landscape of *Aspergillus niger* at breaking of conidial dormancy revealed by RNA-sequencing. *BMC Genom.* 14:246. on the surface of chrysanthemum leaves. *Physiological Plant Pathology*, 1: 45-54.
- Orietta, F. y Larrea, V. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 62: 96-100.
- Osherov N., May G.S. (2001). The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiology Letters*. 199:153–160.
- Peteri, Z., Teren, J., Vagvolgyi, C., y Varga, J. (2007). Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiology*, 24: 205-210.
- Piard, J.C., Desmazeaud, M. (1991). Inhibition factors produced by lactic acid bacteria: oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* 71: 525–541.
- Rao, D. R., y Reddy, J. C. (1984). Effects of lactic fermentation of milk on milk lipids. *Journal of Food Science*, 49: 748–750.
- Rattanachaiakunsoon, P., y Phumkhachorn, P. (2010). Lactic acid bacteria: Their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of Biological Research*, 1: 218-228.
- Rodríguez, J.M., Martínez, M.I., Suárez, A.M., Martínez, J.M., y Hernández, P.E. (1997). Research note: unsuitability of the MRS medium for the screening of hydrogen peroxide-producing lactic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. 25: 73–74. doi: 10.1046/j.1472-765X.1997.00177.x
- Rosa, de Almeida, Santiago, Rosa. (2010). Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*) in Antarctica. *FEMS Microbiology Letters*. 73:178–189. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00872.x>
- Roy, U., Batish, V. K., Grover, S., y Neelakantan, S. (1996). Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD-28.3. *International Journal of Food Microbiology*, 32: 27–34
- Saladino, Luz, Manyes, Fernandez-Franzon, y Meca, (2016). *In vitro* antifungal activity of lactic acid bacteria against mycotoxigenic fungi and their application in loaf bread shelf life improvement. *Food Control* 67. 273-277
- Schmit, J.C., y Brody, S. (1976). Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. *Bacteriological Reviews*. 40: 1-41.
- Schnürer, J., Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science y Technology*: 16: 70-78
- Stiles, J., Penkar, S., Plockova, N., Chumchalova, J., y Bullerman, L. B. (2002). Antifungal activity of sodium acetate and *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Food Protection*, 65: 1188–1191.
- Tariq, S., Khan, R., Sultana V., Ara, J., y Ehteshamul-haque, S. (2009). Utilization of endo-root fluorescent pseudomonas of chilli for the management of root diseases of chilli. *Pakistan Journal of Botany*, 41(6): 3191-3198
- Valerio, F., Favilla, M., De Bellis, P., Sisto, A., de Candia, S. y Lavermicocca, P. (2009) Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*,

- Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. *Systematic and Applied Microbiology*, 32: 438–448.
- Var, I., Kabak, B., y Erginkaya, Z. (2008). Reduction in ochratoxin A levels in white wine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite. *Food Control*, 19: 592-598.
- Woolford, M. K. (1975). Microbiological screening of the straight chain fatty acids (C1–C12) as potential silage additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26:219–228.
- Woolford, M. K. (1984a). The antimicrobial spectra of organic compounds with respect to their potential as hay preservatives. *Grass and Forage Science*, 39: 75–79.
- Zalar P, Novak M, de Hoog GS, Gunde-Cimerman N. (2011). A man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biology*. 115:997–1007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2011.04.007>.
- Zhang, H., Wang, L., Zheng, X., y Dong, Y. (2007). Effect of yeast antagonist in combination with heat treatment on postharvest blue mold decay and *Rhizopus* decay of peaches. *International Journal of Food Microbiology*, 115: 53-58.

7. Estudio de cambios morfológicos de *A. carbonarius* en la interacción con *L. plantarum* asociados al biocontrol y evaluación de la capacidad de adsorción de OTA por BAL.

7.1. Resumen

Se sabe que las bacterias lácticas representan un grupo importante de agentes de control biológico y en la actualidad se ha utilizado las diversas interacciones ecológicas bacteria-hongo con un enfoque agronómico para controlar plagas y patógenos, estas interacciones pueden ir desde el antagonismo hasta el mutualismo. Por lo tanto estas complejas interacciones comienzan a tomar relevancia para diseñar nuevas estrategias para mejorar el crecimiento y la salud de los cultivos. Sin embargo hoy en día los estudios sobre mecanismos de acción llevados por las BAL para controlar el desarrollo de patógenos y las interacciones ecológicas que pueden presentar en co-cultivo siguen siendo bajos. **Objetivo.** Con este antecedente el objetivo de esta sección se basa en estudiar los mecanismos antagónicos y las interacciones ecológicas involucrados en la interacción *L. plantarum* - *A. carbonarius*. **Métodos.** Para esto se utilizó microscopia electrónica de barrido lo cual nos permitió visualizar a escala micrométrica los mecanismos antagónicos implicados en la interacción de ambos microorganismos. **Resultados.** Los resultados de esta sección permitieron determinar la morfología de *A. carbonarius* pre y post interacción con *L. plantarum*. El estudio morfológico pre interacción permitió determinar el ciclo reproductivo asexual del hongo, desde la formación de una hifa aérea hasta la formación de conidióforo maduro con respectivas estimaciones cuantitativas de estructuras reproductivas. Así mismo se documentó el proceso de maduración de esporas fúngicas hasta la formación de hifas. Respecto al estudio morfológico post interacción, se determinó la adhesión bacteriana sobre esporas fúngicas como principal mecanismo de biocontrol en la interacción (co-cultivo) bacteria-hongo, cuya interacción ecológica observada es reportado en bibliografía como antagonismo tipo directo. Aunado a este mecanismo antagónico, se determinó posible daño sobre la superficie de esporas fúngicas por la presencia de poros membranales de aproximadamente 140 ± 22.3 nm, que podrían estar relacionadas con el biocontrol del hongo micotoxigénico. Así mismo se hace un análisis de los mecanismos llevados a cabo por parte de las BAL para explicar la formación de esos poros membranales y los mecanismos que podrían ser responsables del

biocontrol presentado. Finalmente se determinó la capacidad de adsorción de OTA sobre la superficie de *L. plantarum*, lo cual podría contribuir a disminuir el problema de contaminación de micotoxinas en alimentos.

7.2. Introducción

Cualquiera que sea el entorno en el que se encuentren las bacterias y los hongos, éstos pueden producir una amplia gama de interacciones ecológicas, que pueden ir desde el antagonismo hasta el mutualismo, y es bien sabido que estas interacciones influyen en gran medida en el comportamiento biológico y ecológico de ambos microorganismos, es decir, se ve afectado el crecimiento, la reproducción, el movimiento, la nutrición, el estrés, incluso pueden tener una influencia considerable en la patogenicidad de los hongos, Por lo tanto, las interacciones entre bacterias y hongos son de importancia central para numerosas cuestiones biológicas en agricultura, silvicultura, ciencias ambientales, producción de alimentos, medicina etc. (Figura 7.1)

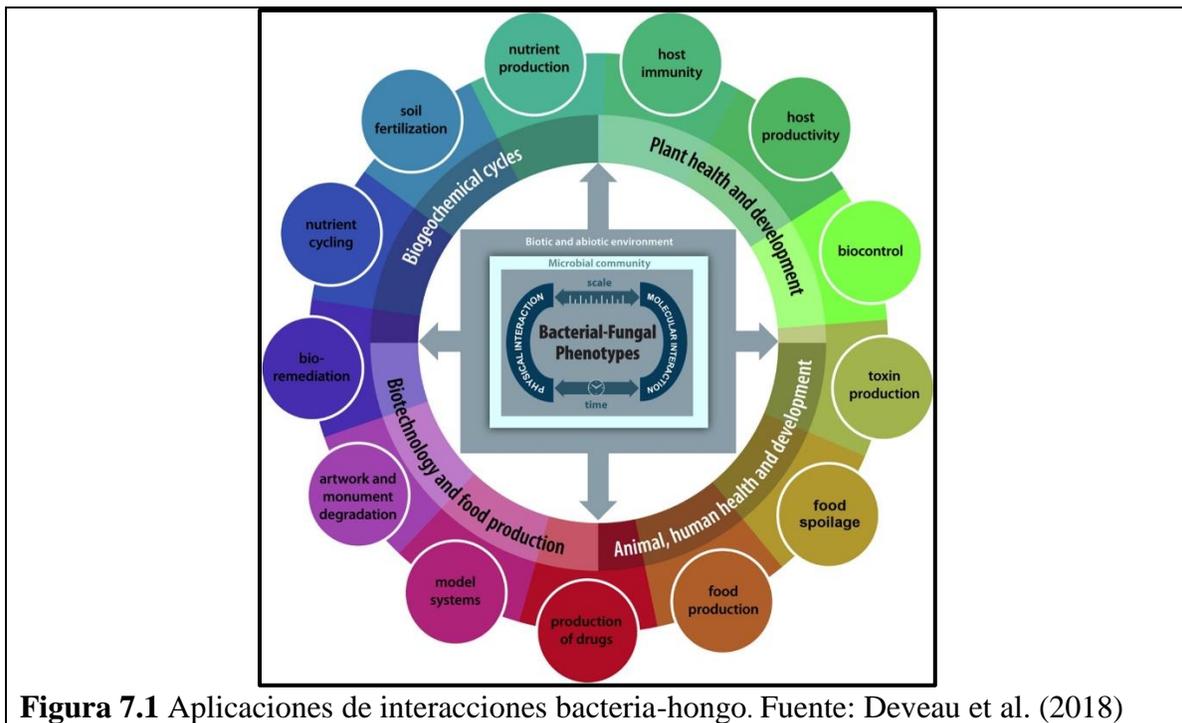


Figura 7.1 Aplicaciones de interacciones bacteria-hongo. Fuente: Deveau et al. (2018)

Por otra parte se sabe que las bacterias representan un grupo importante de agentes de control biológico y en la actualidad se ha utilizado esta propiedad con un enfoque agronómico para controlar plagas y patógenos, lo que ha llevado a la formulación de varios productos

comerciales a base de microorganismos para mitigar la contaminación de plantas susceptibles a patógenos.

Estas complejas interacciones comienzan a tomar relevancia para diseñar nuevas estrategias para mejorar el crecimiento y la salud de los cultivos (Panke-Buisse et al. 2015; Poudel et al. 2016).

De igual manera en este trabajo se ha demostrado el efecto antagónico que presentan bacterias del genero *Lactobacillus plantarum* contra el hongo micotoxigénico *Aspergillus carbonarius*. Por lo que es de interés particular en este trabajo estudiar los mecanismos antagónicos involucrados entre estos microorganismos. Algunos de estos son antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, parasitismo, patogénesis, interacciones directas con el patógeno (parasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia (Orietta, 200; Schäfer et al.2007; Sikora et al.2013).

Las BAL en particular tienen la capacidad de desplazar patógenos mediante la competencia por nutrientes, en particular, la competencia por micronutrientes debido a los diversos mecanismos que limitan la disponibilidad de estos micronutrientes como puede ser:

- Bioacumulación. El metal se transporta al interior de la célula mediante un gasto de energía y puede ser secuestrado por proteínas o almacenado en organelos (Lovley, 2000);
- Biomineralización. Se refiere a la precipitación del metal
- Biotransformación. Involucra un cambio de tipo químico como por ejemplo en el estado de oxidación, metilación, etc. (Lovley, 2000; Srinath, 2002)
- Quimiosorción. Mediada por microorganismos, en este caso primero se lleva a cabo una biomineralización formándose un depósito primario el cual funciona como núcleo de cristalización para capturar el metal de interés (Lovley, 2000)
- Biosorción. Es la adhesión superficial del metal en la superficie bacteriana, entre otros mecanismos, que las bacterias lácticas son capaces de llevar a cabo con el fin de competir y sobrevivir frente a otros microorganismos (Bréant, 2002; Lebeau, 2002).

Estos mecanismos son importantes para considerarse como mecanismos de biocontrol y reducción de micotoxinas, si bien porque a pesar de que al limitar la biodisponibilidad de micronutrientes, muy en particular metales como hierro y zinc por parte de las BAL, ayuda al biocontrol fúngico ya que se ha reportado que son los elementos más importantes para un

desarrollo fúngico, además se considera que estos y otros elementos, pueden ser utilizados para la síntesis de micotoxinas.

Se ha reportado que las concentraciones óptimas de ciertos microelementos para la producción de ocratoxina A por *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 se estima en 0.055–2.2 mg/L de zinc; 0.004-0.04 mg/L de cobre; 1.2-2.4 mg/L de hierro (Gimeno, 2002) (<https://www.engormix.com/micotoxinas/articulos/principales-factores-condicionantes-desarrollo-t26065.htm>). Además cuando disminuyen las concentraciones de zinc y cobre la producción de OTA tiende a ser nula. Por lo que sugiere que la falta de esos microelementos provoca deficiencia en el crecimiento fúngico y la producción de ocratoxina A se ve disminuida. En el caso de *Aspergillus flavus* para la producción de aflatoxina es necesario el uso de sustratos ricos en zinc y ciertos aminoácidos.

Deveau et al. (2018) han propuesto una clasificación de los principales mecanismos fisicoquímicos de control biológico que ocurren a nivel ecológico. Dichos mecanismos son divididos en cuatro clases, es decir,

- I Antibiosis que implica intercambio de metabolitos
- II Señalización y quimiotaxis con detección y conversión de metabolitos
- III Cambios fisicoquímicos después de la adhesión y
- IV Secreción de proteínas.

Sin embargo, probablemente la categoría de biocontrol más ampliamente estudiada y encontrada en la naturaleza serían las clases I y III correspondiente a antagonismo de tipo mixto y antagonismo tipo directo. El antagonismo mixto se basa en la antibiosis, una guerra química que se caracteriza por la difusión de moléculas químicamente complejas de un microorganismo a otro por ejemplo antibióticos, enzimas líticas, productos de desecho no regulados entre otros. Schnurer et al. (2005) realiza una extensa revisión sobre el efecto de bioproductos bacterianos para el control de patógenos.

Por otra parte el antagonismo directo definido por Neufeld y Kuhn, (1934) citado en Wynne y Norman (1953) se basa en el contacto físico o directo entre microorganismos, lo que implica interacciones que conllevan a hiperparasitismo/depredación entre individuos (Lecuona, 1996), incluso el fenómeno de quimiotaxis está inmerso en este tipo de antagonismo.

Si bien las moléculas difusibles (antibiosis) desempeñan un papel importante en muchas interacciones bacteria-hongo, la migración (quimiotaxis) y el contacto físico entre microorganismos también son procesos importantes en el establecimiento de biocontrol.

Nikawa (2001) han reportado que el contacto célula-célula entre hongos y bacterias puede resultar en cambios importantes en su fisiología e interacciones, incluso pueden tener una influencia considerable en la patogenicidad de los hongos. Sin embargo la naturaleza molecular del contacto bacteriano-fúngico ha sido examinada en solo unos pocos sistemas desde el punto de vista de formación de biopelículas.

La finalidad de estudiar los mecanismos de biocontrol causado por esta BAL, ampliaría las posibilidades y oportunidades para generar nuevas alternativas biotecnológicas en contra de los hongos contaminantes de cultivos y sus micotoxinas.

En las últimas dos décadas gran parte de los estudios realizados para la descripción de biopelículas y los procesos de contacto célula-célula se han realizado con la ayuda de la microscopía electrónica de barrido. Recientemente, tres grandes avances han incrementado substancialmente la comprensión de las interacciones célula-célula:

- a) La utilización del microscopio de barrido láser confocal, que ha permitido caracterizar la ultraestructura de las biopelículas
- b) La investigación de los genes involucrados en la adhesión celular y la formación de biopelícula
- c) Estudios de microscopía electrónica de barrido, el cual ha permitido estudiar las interacciones microscopias de varios microorganismos que interaccionan como biopelículas obteniendo observaciones a muy alta resolución respecto a otros microscopios

En el anexo F, se realiza una descripción más detallada y amplia del funcionamiento de los equipos de microscopía y espectroscopia avanzada utilizados en el desarrollo de la tesis.

Finalmente, el objetivo de este capítulo consiste en determinar mediante técnicas en microscopía avanzada los mecanismos antagónicos llevados a cabo por *Lactobacillus plantarum* en el biocontrol de *Aspergillus carbonarius*. Esto nos permitirá mejorar la comprensión de su modo de acción y ayudará a generar alternativas biotecnológicas para mejorar la efectividad de estrategias de control biológico.

7.3. Materiales y métodos

7.3.1. *Microorganismos y condiciones de cultivo*

Los microorganismos y las condiciones de crecimiento se realizaron como se describe en la sección 6.3.1.

7.3.2. *Análisis de la interacción física como mecanismo antagónico determinado en microscopia laser confocal modo campo claro*

Se utilizó 90% v/v de una suspensión de esporas (1×10^6 esp/mL) y 10% v/v de BAL obtenidas del punto 6.3.1. Se preparó un co-cultivo de ambos microorganismos a las concentraciones mencionadas en un portaobjetos doble cóncavo de 25.4x76.2mm, se cubrió con cubreobjetos y se selló por los bordes con barniz transparente para evitar derrames.

7.3.2.1. *Métodos analíticos para Microscopia de Barrido Laser Confocal*

El estudio en microscopia laser confocal se realizó en un equipo Carl Zeiss LSM780 NLO, Detector confocal: R/FL (32 GaAsp), Objetivos: EC Plan-Neofluar 10x/0.30 WD=5.2; Plan-Apochromat 20x/0.8 WD=0.55; LD SC PApo 20x/1.0 Corr WD=5.6; LD C-Apochromat 40x/1.1 W Corr UV-VI-IR; C-Apochromat 40x/1.2 W Korr. FCS; Plan-Apo 40x/1.0 DIC VIS-IR WD=2.5; Plan-Apo 63x/1.0 VIS-IR WD=2. El software utilizado para análisis y obtención de micrografías Fue ZEN2012 versiones black y blue.

7.3.3. *Análisis de la interacción física como mecanismo antagónico determinado en Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)*

7.3.3.1. *Tratamiento de muestras para análisis MEB*

Preparación de muestras para estructuras fúngicas de *A. carbonarius*.

Se utilizó una suspensión de esporas (1×10^6 esp/mL) de *A. carbonarius* obtenidas como se describe en el punto 6.3.1

La suspensión de esporas fue colocada en tubos Eppendorf de 2mL, fueron fijadas con glutaraldehído 2% v/v durante 24 h a 4°C posteriormente se realizaron lavados sucesivos x3 veces con buffer de fosfatos (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4) 0.1M pH 7.4, el sobrenadante libre de

células de cada lavado fue eliminado mediante decantación. Posteriormente se adicionó tetraóxido de osmio durante 2h como fijador complementario, el tetraóxido de osmio fue retirado mediante decantación. Las células fueron deshidratadas usando soluciones crecientes de etanol, las concentraciones de (30-70%v/v) de etanol fueron realizadas a 4°C, las concentraciones (80-100 %v/v) se realizaron a temperatura ambiente, cada concentración de alcohol se adicionó a las células en dos ocasiones de 15 min c/u. Posteriormente las células deshidratadas se colocaron en cápsulas microporosas con tapa, las cuales contenían en su interior papel filtro con tamaño de poro de 0.45 μm , para retención de muestra, seguidamente las muestras fueron sumergidas en etanol absoluto, para su posterior secado con CO_2 al punto crítico en un secador Tousimis modelo Samdri780B. Una vez secas las esporas con ayuda de cinta doble carbón fueron adheridas al porta muestras de 25mm tipo PIN. Por último se recubrió con oro 60s x 4 tiempos (Dentron Vacum Desk III). Finalmente las muestras fueron analizadas en MEB JEOL JSM-5900LV a 15 kV.

Preparación de muestras para células bacterianas de *Lactobacillus plantarum*

Se utilizó una suspensión de bacterias (1×10^6 cel/mL) de *Lactobacillus plantarum* obtenidas como se describe en el punto 6.3.1.

Posteriormente se prosiguió con la preparación de muestras de manera similar como se describió en la sección 7.3.3.1 para *A. carbonarius*.

Preparación de muestras para co-cultivo bacteria-espora.

Para el co-cultivo BAL-Hongo se colocó 90% v/v de suspensión de esporas [1×10^6 esp/mL] y 10% v/v de BAL obtenidas del punto 6.3.1, 1mL de la suspensión fue colocada en tubos Eppendorf de 2mL y se dejó en contacto ambos microorganismos durante 8h, seguidamente la preparación de muestras se llevó a cabo como se describe en la sección 7.3.3.1

Preparación de muestras para adsorción de OTA sobre BAL.

Para la evaluación de no autofluorescencia de *L. plantarum*, se utilizó una suspensión de BAL descrito en secciones anteriores, se eliminó el sobrenadante (medio MRS) con ayuda de centrifugación (centrífuga Allegra X-12R Beckman coulter) a 5000 rpm durante 5min, posteriormente se resuspendieron las células en solución isotónica 0.9%, se colocó una

alícuota de 200ul en un portaobjetos doble cóncavo de 25.4x76.2mm, finalmente fueron evaluados en microscopia confocal a las longitudes de onda excitación/ emisión 405/450, el equipo utilizado se describió en la sección 7.3.2.1

Para la evaluación de adsorción de OTA sobre BAL, se utilizó una suspensión de *A. carbonarius* en medio líquido, se realizó una sedimentación celular con ayuda de centrifugación (centrífuga Allegra X-12R Beckman coulter) a 5000 rpm durante 15min, se separó el sobrenadante libre de células por decantación y se colocó en un tubo eppendorf de 2mL, posteriormente las células bacterianas fueron adicionadas al sobrenadante fúngico (1×10^6 BAL/mL), dejándose interaccionar durante 5 horas a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron las células (centrífuga Allegra X-12R Beckman coulter) a 5000 rpm durante 15min, eliminándose el sobrenadante y resuspendiendo las células bacterianas en solución isotónica 15M, se colocó una alícuota de 50ul en un portaobjetos doble cóncavo de 25.4x76.2 mm, finalmente fueron evaluados en microscopia confocal a las longitudes de onda excitación/ emisión 405/450, el equipo utilizado se describió en la sección 7.3.2.1

7.4. Resultados y discusión

7.4.1. *Análisis de la interacción física como mecanismo antagónico determinado en microscopia de barrido laser confocal modo campo claro*

La Figura 7.2, muestra una micrografía característica tomada de un video captado en microscopia láser confocal del co-cultivo bacterias-esporas en medio líquido, en este resultado se aprecia la posible adhesión bacteriana sobre la superficie de esporas fúngicas, este resultado preliminar podría relacionar la adhesión bacteriana como posible mecanismo de biocontrol, ya que la formación de biopelículas bacterianas representa una conocida estrategia de supervivencia procariótica frente a otros microorganismos. Se ha reportado en un estudio reciente que tales asociaciones bacteria-hongo pueden ser muy comunes (Hoffman y Arnold, 2010). Además, las interacciones bacteria-hongo se pueden presentar en condiciones diversas (Frey-Klett et al.2011; Tarkka et al.2009).

Por lo que en este estudio se pone especial atención en las interacciones físicas que pueden presentar las bacterias lácticas, ya que se sabe que las interacciones bacteria-hongo pueden alterar la estructura general de la comunidad (Mowat et al.2010), la morfología celular fúngica (Jarosz et al.2009; Joyner et al.2010; Morales et al.2013), la motilidad bacteriana como consecuencia de la interacción (Peters et al.2010) y lo más importante la supervivencia de los microorganismos que interactúan (Hogan y Kolter, 2002), todos estos factores pueden influir notablemente en la patogenicidad.

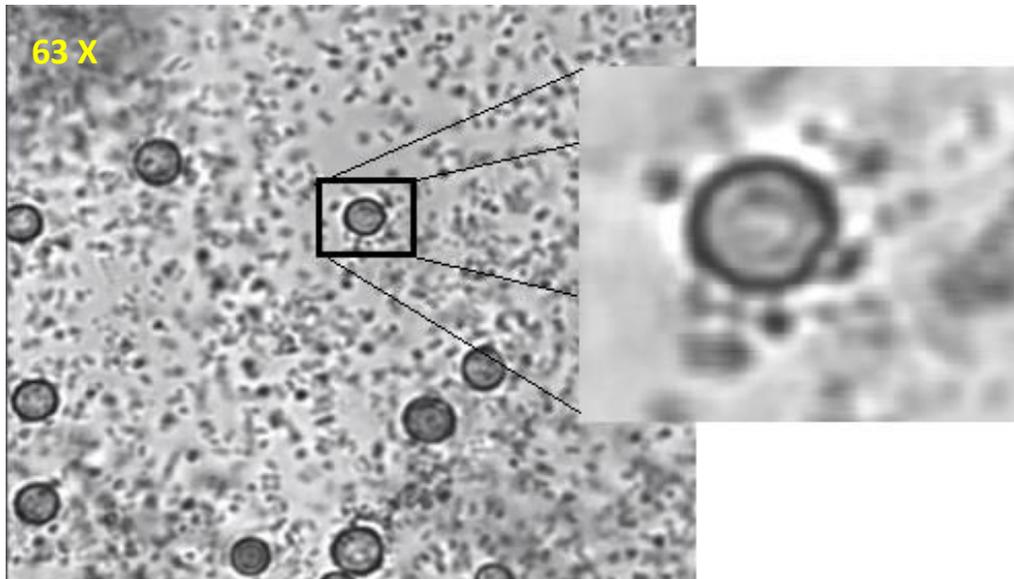
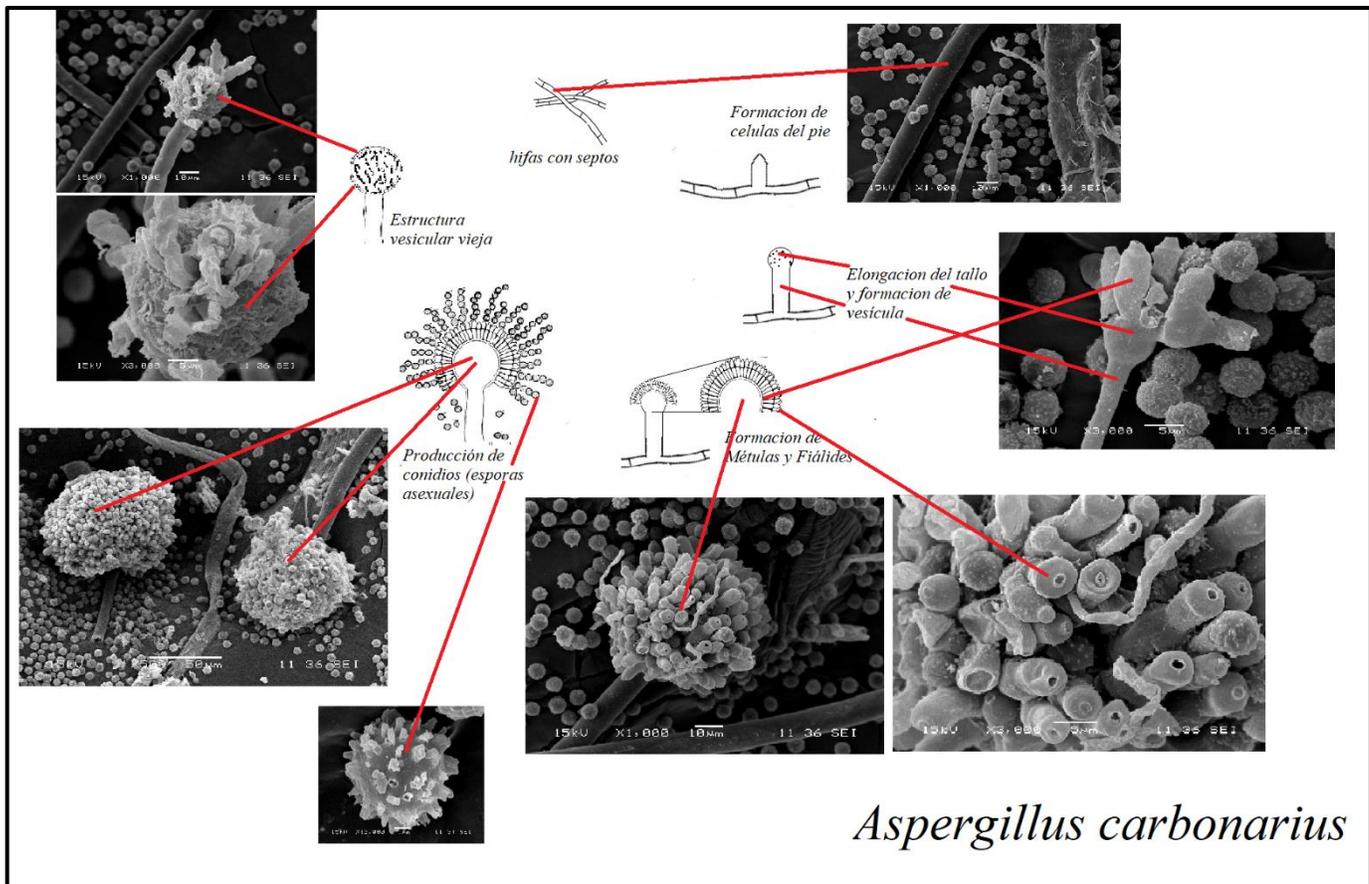


Figura 7.2 Interacción microscópica de bacterias lácticas y esporas de *Aspergillus carbonarius* en medio líquido, micrografía tomadas por microscopia láser confocal.

Sin embargo el resultado obtenido en microscopia laser confocal a 63X carece de detalles visuales suficientes para comprobar una interacción física por lo que el estudio continuará con ayuda de técnicas en microscopia electrónica de barrido, ya que permite obtener imágenes con mayor detalle, resultados que son mostrados en la siguiente sección.

7.4.2. *Análisis de la interacción física como mecanismo antagónico determinado en Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)*

Morfología de *Aspergillus carbonarius* sin tratamiento con bacterias



Aspergillus carbonarius

Figura 7.3 Estructuras morfológicas del ciclo reproductivo asexual (producción de conidios) de *Aspergillus carbonarius*. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (MEB)

En la Figura 7.3, se muestra un esquema de las estructuras morfológicas del ciclo reproductivo asexual de *Aspergillus carbonarius*, analizadas en microscopía electrónica de barrido, cuya técnica nos permite estudiar a detalle la morfología del hongo en condiciones normales de desarrollo con la finalidad de contrastarlas posterior al contacto con *L. plantarum* y así poder estudiar los mecanismos antagónicos implicados en esta interacción.

La descripción del proceso germinativo ejemplificado en la Figura 7.3 comienza con el engrosamiento de la pared en una célula basal dentro de hifas superficiales específicas, dando lugar a la célula pie (Adams et al.1998). El tallo surge de la célula pie como una pseudo-hifa aérea, se ha reportado de 1–2 μm más ancho que las hifas vegetativas para el género *Aspergillus*. Una fase posterior de crecimiento isótropo se produce en la punta del tallo, que resulta aproximadamente 6 h después, en una estructura globular llamada vesícula, que alcanza un diámetro de 27-33 μm como se muestra en la Figura 7.4. A diferencia de las hifas

vegetativas, ni el tallo ni la vesícula desarrollan septos o ramas. Además, los tallos y las vesículas contienen vacuolas grandes que condicionan el posicionamiento nuclear y la distribución intracelular de orgánulos (Etxebeste et al. 2009). A pesar de la ausencia de crecimiento polarizado, Mims et al. (1988), sugiere que la vesícula alberga múltiples divisiones nucleares, la estructura esférica sirve como plataforma para la brotación múltiple de métulas que alcanzan una longitud de 12-17 μm (Figura 7.4) en un patrón que se asemeja a un proceso de germinación multipolar, es decir crecimiento apical en varias direcciones. Las métulas (célula que se encuentra sobre una vesícula y sostiene las fiálides) no se extienden como hifas, sino que se someten a una división especializada. Después de la maduración, estos brotes se convierten en fiálides que miden alrededor de 8 μm de largo y 6 μm de ancho (Figura 7.4), de las cuales brotan cadenas de conidios (Sewall et al.1990), los cuales son estudiados más a detalle de manera individual en la siguiente sección.

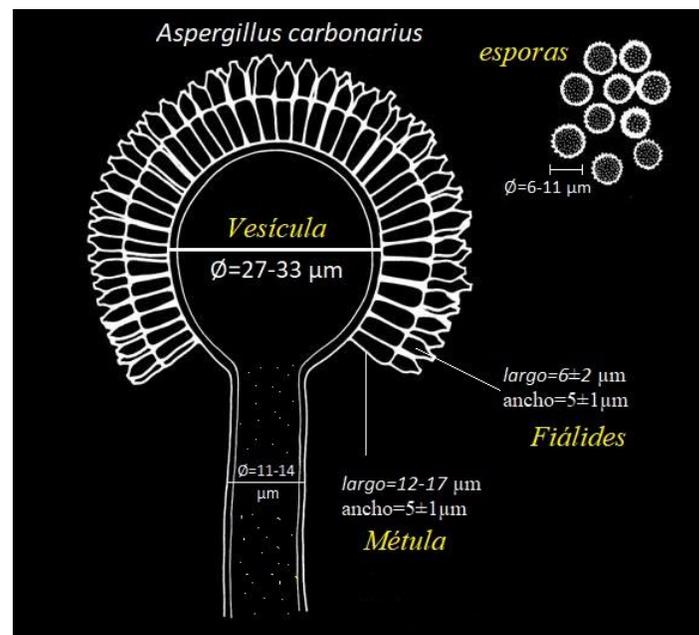


Figura 7.4. Representación esquemática de las dimensiones morfológicas de esporas y conidióforos de *Aspergillus carbonarius*. Elaboración propia con estimaciones de estructuras reproductivas en MEB.

Morfología de esporas sin tratamiento con bacterias

Además de estudiar la morfología de las estructuras reproductivas asexuales (conidióforo) de *A. carbonarius* también es importante conocer la morfología individual de las esporas asexuales bajo condiciones normales de desarrollo, los resultados mostrados en las Figuras 7.5 y 7.6 presenta la morfología de esporas de *A. carbonarius* en microscopía electrónica de barrido en aumento de 3000X y 12000X en la cual se aprecian tamaños diferentes en un rango de 6-11µm de diámetro, además de morfologías diferentes entre sí, es decir se aprecia la presencia de esporas espiculadas y no espiculadas, cuya longitud de las espículas se estima entre 0.7-2 µm. sin embargo estas diferencias morfológicas se consideran normales en la especie y concuerda con lo reportado por Thom y Raper (1916) quienes realizaron la descripción de la especie en ese año en la base de datos Mycobank, y es descrita literalmente como conidios globosos con espinas hialinas, cuyos cuerpos de esporas poseen un diámetro de 5.5 a 12.0 µm con rugos (espículas) que se proyectan hasta 1.5 µm más allá de la pared de la espora.

Una pregunta por resolver, es por qué la presencia de espículas se da solo sobre algunas esporas y no se presenta de manera general y homogénea, sin embargo esta discrepancia se explica en la siguiente sección con los resultados mostrados en la Figura 7.7 en la cual se ordena por tamaño y morfología.

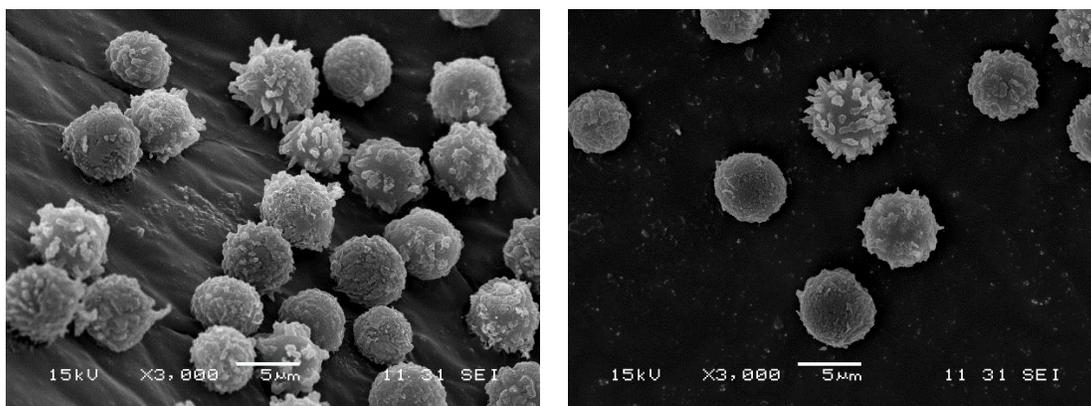


Figura 7.5 Morfología de esporas de *Aspergillus carbonarius* visualizadas en MEB.

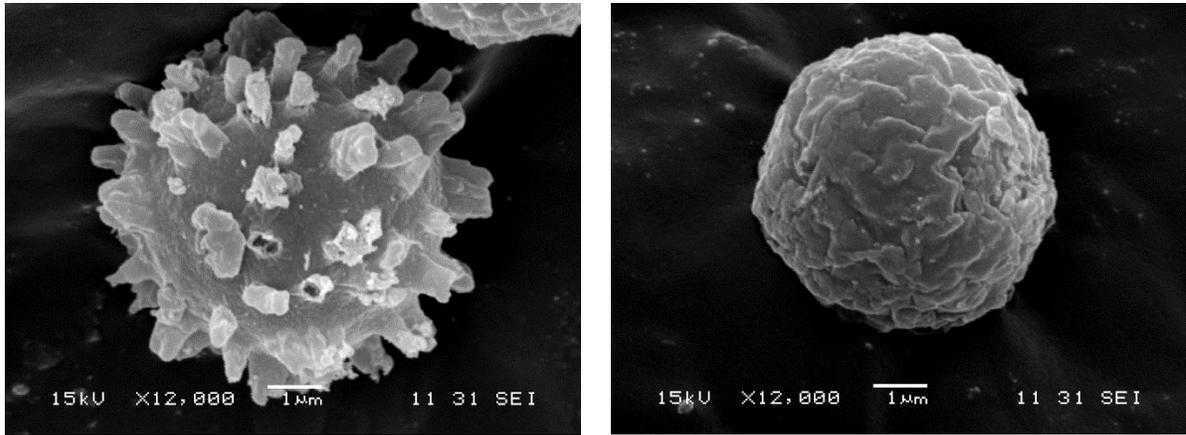


Figura 7.6 Morfología de esporas de *Aspergillus carbonarius* en estado de dormancia (espiculada) y en vías germinativas (sin espículas) visualizadas en MEB.

Sucesión morfológica de diferentes estados de maduración de esporas.

La causa de los cambios morfológicos presentados anteriormente se debe al proceso de germinación. En resumen, los conidios inicialmente se hinchan y luego forman un tubo germinal, definición característica de la germinación de hongos (Weber y Hess, 1976). Las hifas que se producen se separan por septos (Harris, 2010). Dado que el conidio y las hifas en crecimiento polarizado representan morfologías distintas, se pueden distinguir visualmente mediante microscopía (Taubitz et al. 2007).

El cambio más evidente es la diferencia de tamaños en las esporas, el cual es un indicador visual de la germinación, también se conoce como expansión isotrópica (Osharov y May, 2001). La capa hidrófoba externa que rodea a los conidios se pierde (Dague et al. 2008) y los conidios se hinchan y, por lo tanto, aumentan de tamaño como se muestra en los resultados de la Figura 7.7 debido a dos procesos que tienen lugar, la hidratación y la deposición de nuevo material de pared celular alrededor de toda la superficie de los conidios de manera uniforme (Breakspear y Momany, 2007a). La hinchazón de los conidios también se acompaña de un aumento en el número de mitocondrias (Campbell, 1971).

Otro cambio morfológico muy acentuado es la presencia y ausencia de espículas u ornamentas rugosas que presentan la superficie de las esporas, se sugiere que estos cambios se deben al proceso de maduración de las esporas. En la Figura 7.7 se presenta una sucesión de micrografías obtenidas en microscopía electrónica de barrido que son representativas del

proceso de maduración de esporas, en el cual se muestra la morfología de esporas jóvenes cuyas espículas son delgadas y bien definidas, y conforme la espora madura a través del tiempo las espículas se engrosan y la superficie se torna rugosa hasta ser imperceptibles las espículas iniciales. Posterior se inicia el proceso de liberación de tubo germinativo en las esporas, estos resultados concuerdan con lo reportado por Thom y Raper (1916) quienes describen las esporas como globosas con espinas hialinas cuando son jóvenes, y en la madurez, estrecha y muy verrugosa.

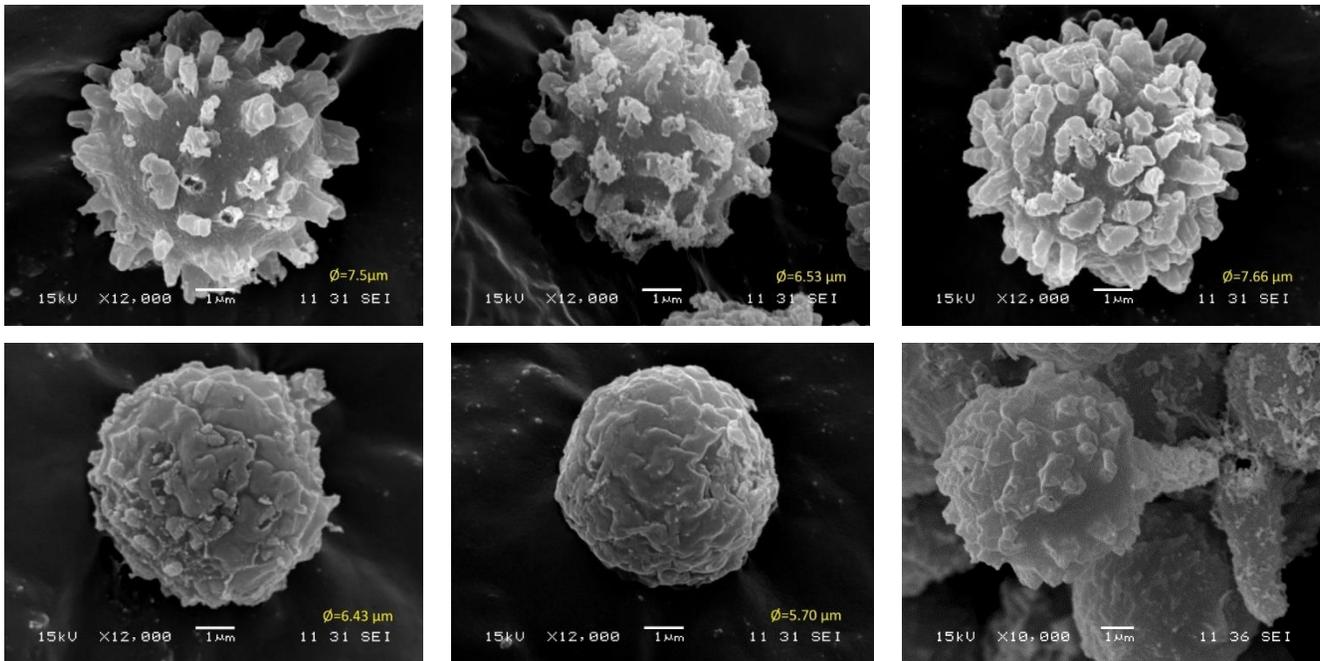


Figura 7.7 Sucesión morfológica de diferentes estados de maduración de esporas de *Aspergillus carbonarius*.

La Figura 7.8, muestra una serie de micrografías capturadas en microscopía óptica en campo claro donde se hace una comparación morfológica de esporas jóvenes en estado de dormancia y esporas maduras en vía de germinación en medio líquido.

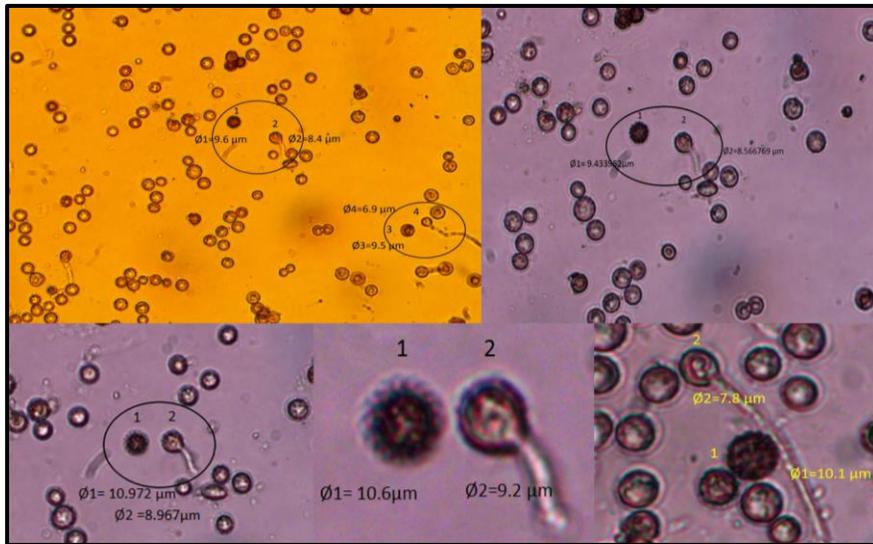


Figura 7.8 Diferencia morfológica entre esporas en estado de dormancia (1) y en vías de germinación (2).

Las esporas en estado de dormancia es una condición que permite que las esporas eviten la germinación en condiciones que pueden no ser óptimas, o incluso podrían ser dañinas, las esporas de todos los hongos pueden entrar en una fase inactiva, durante la cual se ve reducido su metabolismo.

Existen varios tipos de latencia en los hongos; clasificadas como exógenas o endógenas (Feofilova et al. 2012). Si una espora se enfrenta a condiciones desfavorables, como falta de nutrientes, baja temperatura, pH desfavorable o la presencia de un inhibidor o competidor, la espora permanece latente y retrasa la germinación. Las esporas en estas condiciones están inactivas de forma exógena y sólo germinarán cuando las condiciones ambientales sean favorables, bajo este estado de dormancia podemos decir que la morfología de las esporas se mantiene espículada como se muestra en la Figura 7.8.

Por otra parte para que pueda llevarse a cabo la aparición del tubo germinativo se debe de llevar una reacomodación de los polisacáridos de la pared celular de las esporas que comienzan a concentrarse en un punto específico de la superficie conidial, por lo general en un polo de la superficie del conidio, por lo cual se le conoce como establecimiento de polaridad (Breakspear y Momany, 2007a). La aparición del tubo germinal se produce como una extensión de la pared interna a través de la pared conidial existente (Campbell, 1971) y requiere de la degradación enzimática de un área pequeña y localizada en la superficie de la

espora para suavizar la región que implicara el crecimiento de la pared. La presión física ejercida por el protoplasma facilita la aparición del tubo germinal (Campbell, 1971), y como consecuencia de estos cambios la espora presenta modificaciones morfológicas sobre su superficie por lo cual se tornan esporas rugosas, pero sin apreciación definida de espículas, como se observa en la Figura 7.8.

7.4.3. Morfología de *Lactobacillus plantarum* en MEB

Es importante para este estudio conocer la morfología de las bacterias ácido lácticas en condiciones normales de desarrollo. Se procedió a estudiar su morfología con ayuda de MEB, los resultados se muestran en la Figura 7.9 la cepa utilizada fue *Lactobacillus plantarum* la cual presenta forma de bacilos cortos, con extremos redondeados. Se estimó una longitud de aproximadamente 0.9 a 1.2 μm de ancho por 1.0 a 3.0 μm de largo. Puede crecer individualmente o formando cadenas cortas.

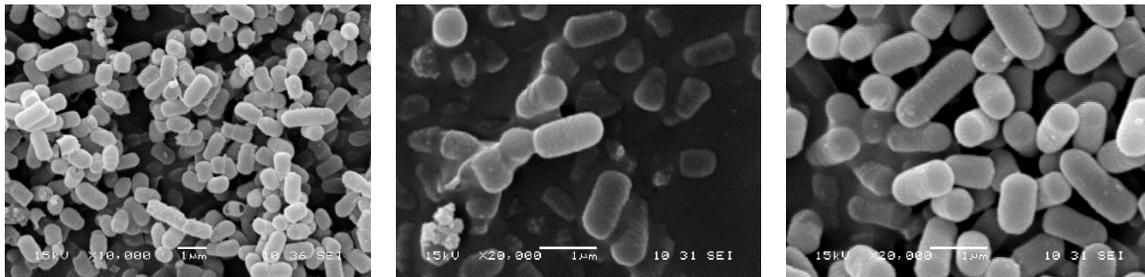


Figura 7.9 Morfología de *L. plantarum*.

Su pared celular tiene un alto contenido de peptidoglicanos y carece de membrana celular externa, esta cepa fue descrita por primera vez por Orla-Jensen en 1919, denominándola *Streptobacterium plantarum*. Posteriormente Pederson (1936) la reubica en el género *Lactobacillus*. Taxonómicamente está ubicada en el *phylum* Firmicutes, clase Bacilli, orden Lactobacillales, y la familia Lactobacillaceae,

Funcionalmente está incluida entre las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) y es Generalmente Reconocida Como Segura (GRAS, por sus siglas en inglés). GRAS es una designación otorgada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos de Norte América.

Hasta este punto se ha estudiado la morfología de ambos microorganismos bacteria y hongo de manera separada, lo cual nos proporciona una visión general de cómo son las estructuras por separado considerándose como control morfológico previo a su interacción, por lo que el siguiente paso consiste en estudiar los cambios implicados en la consecuente interacción de ambos microorganismos en un mismo hábitat, el cual se describe en la siguiente sección.

7.4.4. *Adhesión superficial de bacterias lácticas sobre esporas fúngicas y daño superficial en esporas como mecanismo de biocontrol*

En la Figura 7.10, se muestran micrografías de MEB de la interacción física entre ambos microorganismos en un mismo hábitat, las micrografías comprueban la premisa planteada en la sección 7.4.1, relacionada con el contacto físico entre ambos microorganismos, y que es comprobado en esta sección, apreciándose la adhesión de bacterias sobre la superficie de las esporas fúngicas; se observa que la colonización microbiana sobre la superficie de las esporas en una interfaz sólido / líquido pudo ocurrir por alguno de tres modos diferentes:

- (i) Transporte difusivo. Las bacterias exhiben un grado no despreciable de movimiento browniano (desplazamiento promedio de 40 $\mu\text{m}/\text{h}$,) (Mei, Weerkamp, y Busscher, 1987), que se puede observar bajo el microscopio. Este movimiento podría explicar los contactos aleatorios de las bacterias con superficies en condiciones de reposo como pueden ser las esporas.
- (ii) Transporte por convección. El transporte convectivo es el transporte de células por el flujo de líquido. El transporte por convección puede ser varios órdenes de magnitud más rápido que el transporte difusivo. Dexter (1979) ofrece una amplia descripción del transporte bacteriano por convección.
- (iii) Transporte activo. Una vez que una bacteria se encuentra cerca de una superficie, puede responder de manera quimiotática a cualquier gradiente de concentración de nutrientes que pueda existir en la región interfacial. Dichas respuestas no contribuyen significativamente al transporte en condiciones de flujo turbulento y para células no móviles.

Cabe mencionar que la adhesión de bacterias sobre la superficie de las esporas como premisa inicial dan indicios de tratarse de una adhesión irreversible, ya que si se tratara de una adhesión reversible la deposición de bacterias a una superficie presentaría movimiento

browniano bidimensional y pueden eliminarse de la superficie por los efectos de cizallamiento de una corriente de agua o por la propia movilidad de la bacteria.

Sin embargo, las observaciones realizadas en microscopía óptica y confocal no presentan movimiento browniano al observarse bajo el microscopio y no pueden eliminarse mediante una fuerza de corte moderada (aplicadas durante la preparación de muestras). A menudo este tipo de adhesión implica que estructuras especiales de la superficie celular (biomoléculas) puedan formar una fuerte conexión entre la superficie celular y la superficie sólida evocando en adhesiones irreversibles. Por lo que para corroborar la premisa planteada es necesario realizar un estudio a nivel molecular que relacione directamente la adhesión con biomoléculas del tipo proteico, lipídico, o sacarídica etc. Por ejemplo Busscher et al. (1984) ha señalado a los polisacáridos como biomoléculas esenciales relacionadas en la formación de biopelículas sobre superficies. En particular la adhesión de BAL al epitelio intestinal se ha determinado la presencia de diversas proteínas con características adhesivas (Antikainen et al.2002), y se ha reportado que estas proteínas o adhesinas se localizan sobre las capas superficiales de *Lactobacillus* que es denominada capa S, las cuales representan el 10-15% de la proteína total de la pared celular bacteriana (Antikainen et al.2002; Jakava-Viljanen et al.2002; Avall-Jaaskelainen y Palva, 2005). Se ha reportado que estas proteínas median la adhesión a las células epiteliales intestinales (Hynonen et al.2002; Avall-Jaaskelainen et al.2003; Johnson-Henry et al.2007), membranas celulares (Vidgren et al.1992; Hynonen et al.2002; de Leeuw et al.2006).

Además, se ha reportado que la producción de exopolisacáridos por lactobacilos está relacionado con la adhesión a la mucosa intestinal. Los exopolisacáridos son polisacáridos de cadena larga compuestos de unidades ramificadas repetitivas de azúcares o derivados de azúcar que se adhieren a la superficie celular o se secretan al medio ambiente (Ruas-Madiedo y de los Reyes-Gavilan, 2005). En *L. acidophilus* CRL639, la adhesión a los componentes de la MEC (membrana extra celular) se ha atribuido a la producción de diferentes tipos de exopolisacáridos (Lorca et al.2002) entre otras biomoléculas del tipo lipídicas. Sin embargo más adelante será comprobado mediante técnicas específicas, y que ayuden a comprender de manera específica y particular los mecanismos responsables de que *Lactobacillus plantarum* se adhieran sobre la superficie de las esporas de *Aspergillus carbonarius*.

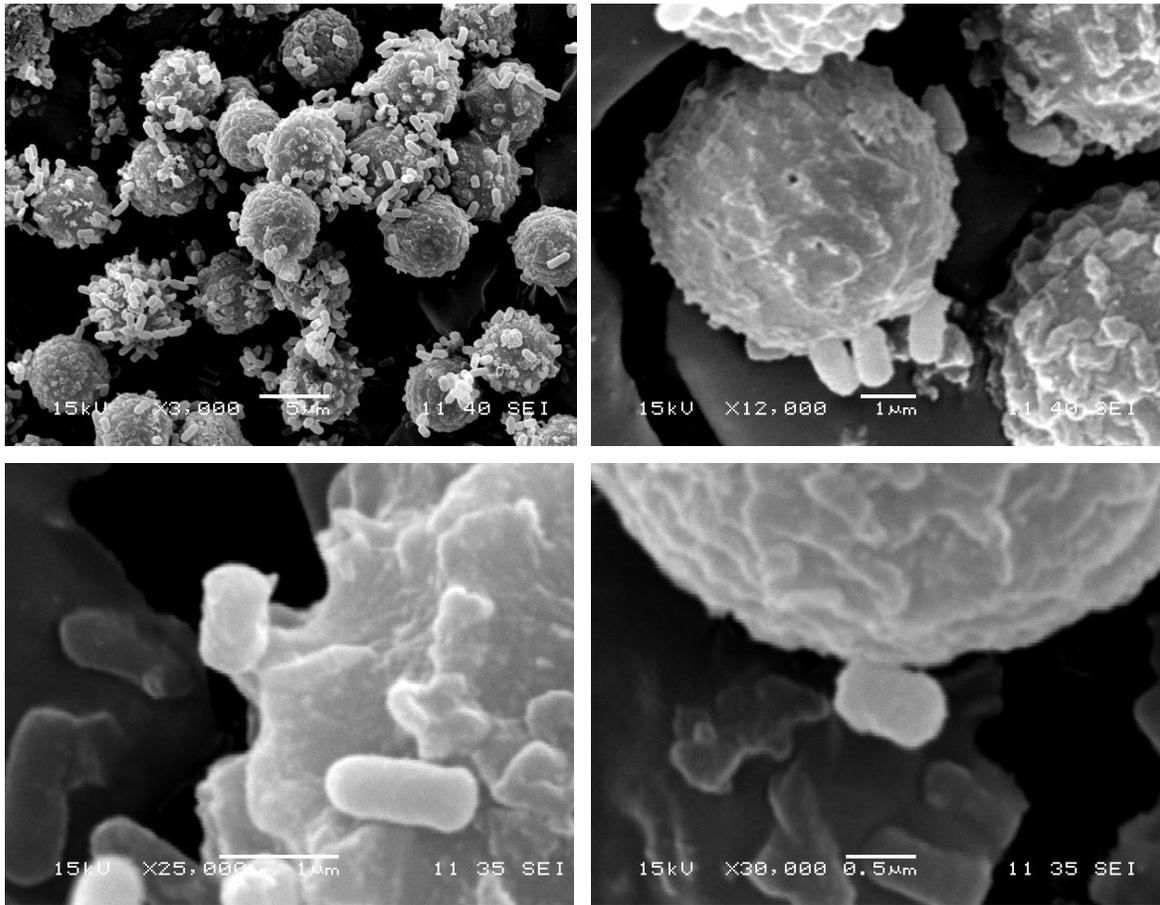


Figura 7.10 Micrografías representativas de la adhesión bacteriana sobre superficie de esporas de *Aspergillus carbonarius*.

Hasta este punto el mecanismo de biocontrol llevado a cabo por *L. plantarum* se considera como antagonismo del tipo directo.

Por otra parte se ha encontrado en bibliografía en la que se atribuye que este tipo de comportamiento de adhesión de bacterias del género *Lactobacillus* sobre superficies como el tracto gastrointestinal entre otros se debe a un comportamiento parasitario del cual las bacterias pueden obtener agua, nutrientes, temperatura, pH adecuados etc, por lo que sería importante realizar un estudio futuro que nos ayude a discernir si *L. plantarum* tiene la capacidad de actuar de manera parasitaria al adherirse sobre la superficie de las esporas de *A. carbonarius*. Se sabe que los conidios inactivos contienen una gran abundancia (~200-700µmol /g de peso seco) de reservas de nutrientes, principalmente D-trehalosa y D-manitol (d'Enfert et al.1999; Ruijter et al.2003). Además la pared celular se compone principalmente

de glucanos, quitina, mánanos y glicoproteínas entre otros (Bowman y Free, 2006), y probablemente pueden ser aprovechados por las bacterias lácticas.

Este comportamiento del tipo antagónico directo que se propone como mecanismo de biocontrol de *L. plantarum* en contra de *A. carbonarius* se ha estudiado en sistemas *in vitro* también para otros microorganismos, uno de los cuales indican que *P. aeruginosa* se adhiere preferentemente a la forma filamentosa del hongo *C. albicans* (Hogan y Kolter, 2002). Se ha reportado que después de la fijación, *P. aeruginosa* puede formar una biopelícula a lo largo de los filamentos de *C. albicans*, y esta interacción provee de nutrientes a *P. aeruginosa* (Hogan y Kolter, 2002), de igual manera reforzando esta idea se ha reportado el fenómeno de quimiotaxis (movimiento dirigido) de bacterias hacia hongos y moléculas derivadas de hongos que pueden funcionar como nutrientes para la bacteria, el cual ha sido demostrado en varios casos; por ejemplo, especies de *Pseudomonas* exhiben taxis hacia exudados miceliales fúngicos (Devagua et al. 2010; Grewal y Rainey, 1991).

Así mismo Hogan y Kolter, (2002) reporta que la asociación física entre *P. aeruginosa* y *C. albicans* resulta en mecanismos parasitarios y que se ha correlacionado con el biocontrol de este hongo.

Por último también se plantea que no sólo la adhesión bacteriana es motivo suficiente para lograr biocontrol total de las esporas fúngicas, ya que el entendimiento de los mecanismos llevados a cabo por las bacterias pueden ser diversos y muchos de ellos sinérgicos para lograr un efecto antagónico frente a microorganismos competentes, la Figura 7.11, muestra otro posible mecanismo que podría aportar al biocontrol de la germinación de las esporas de *A. carbonarius*. Se puede apreciar en la Figura 7.11 la presencia de poros membranales estimando un diámetro de entre 100-150nm, posiblemente las bacterias lácticas generan daño superficial a las esporas y como consecuencia contribuyen a limitar su desarrollo. Es probable que el posible daño superficial encontrado, se atribuya muy en específico a plantaricinas producidas por *L. plantarum*, las cuales son péptidos bioactivos y tienen la capacidad de formar poros en la membrana citoplasmática, cuyo mecanismo corresponde a las bacteriocinas pertenecientes al grupo IIb producidas por *Lactobacillus plantarum* (Sablon, Contreras and Vandame, 2000).

Moll et al. (1999) argumenta que la síntesis de la plantaricina es sumamente compleja, está regulada por la acción de 5 operones con 21 genes diferentes. Y se sabe que los péptidos activos para la formación de poros en la membrana citoplasmática de las células blanco son PlnE y PlnF que conforman la plantaricina E/F y los péptidos PlnJ y PlnK constituyen la plantaricina J/K.

Se ha encontrado que esos 4 péptidos catiónicos poseen de 25 a 34 aminoácidos y tienen actividad antimicrobiana de manera independiente, la cual se potencia cuando interactúan en pares formando los complejos de poración E/F y J/K (Moll et al.1999).

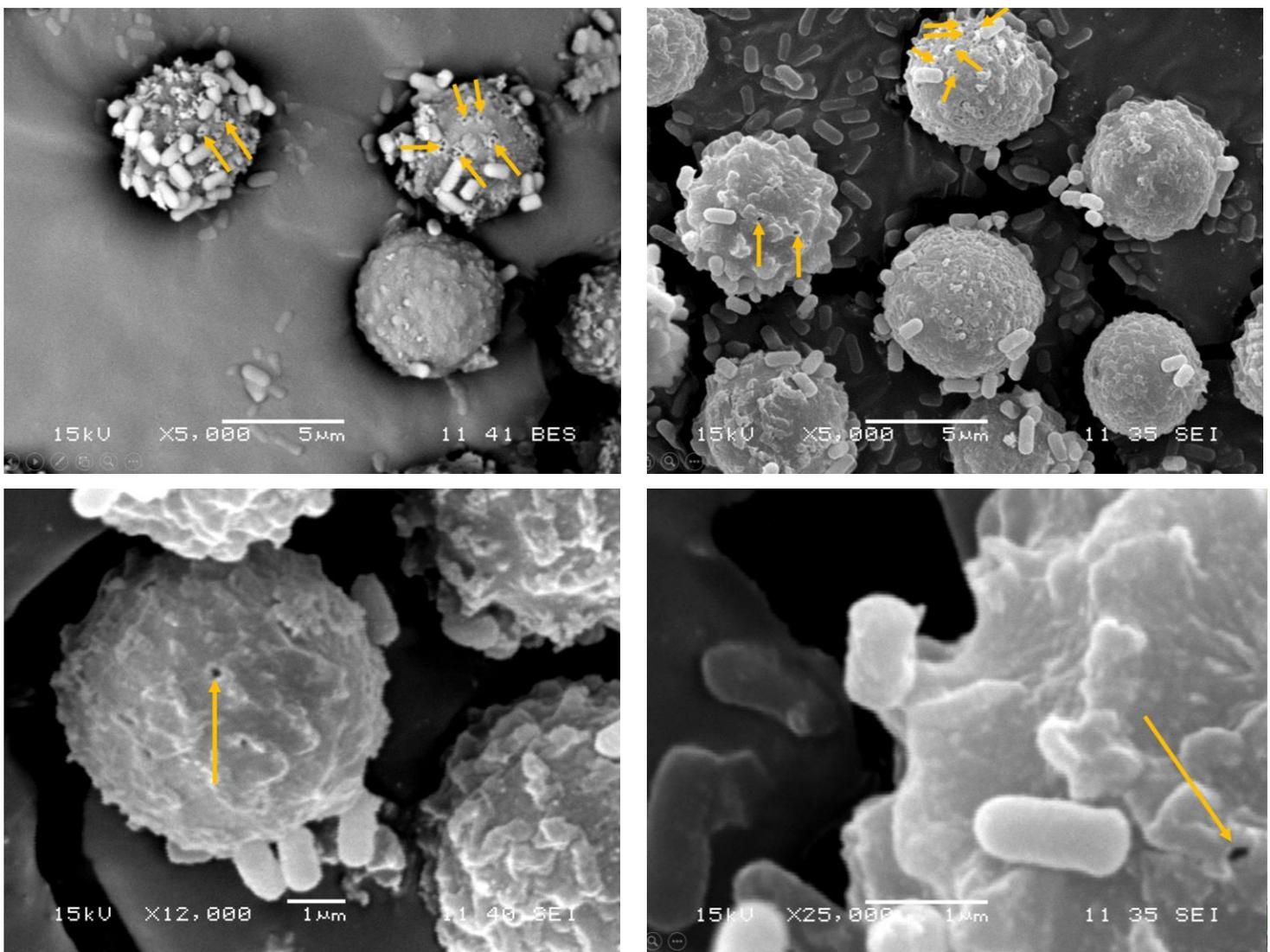


Figura 7.11 Micrográficas que muestra posible daño superficial en esporas fúngicas por presencia de poros membranales.

La formación de poros finalmente podría ocasionar daños a la membrana fúngica y coadyuvar al biocontrol. Algunos de los mecanismos probables a causa de la formación de poros puede ser la filtración de fosfatos inorgánicos y un desequilibrio iónico (Deegan, Cotter, Hill, Ross, 2006), β -galactosidasa y material de ADN y ARN (Todorov y Dicks, 2006; Todorov, Meincken y Dicks, 2006). Además causa la disipación de la fuerza motriz protónica por sus siglas en inglés (PMF), que abarca una disipación completa o parcial del gradiente de pH y el potencial transmembrana (Montville y Chen, 1998). La disipación de la (PMF) por las bacteriocinas de clase IIa puede considerarse su acción principal para ejercer una actividad letal (Jack et al. 1994).

El transporte activo involucrado en la captación de aminoácidos se bloquea. La fuga de aminoácidos pre-acumulados, esta fuga puede deberse a la difusión de aminoácidos a través de los poros, aunado a todo esto se manifiesta el poder antimicrobiano que causa esta bacteriocina y que posiblemente sea un mecanismo de acción que ocurre en el biocontrol de las esporas de *A. carbonarius*.

Por otra parte existe otro mecanismo que explique la formación de los poros y el biocontrol observados en la Figura 7.11, se plantea la apoptosis que es reconocida principalmente por sus funciones de desarrollo en los eucariotas superiores, no se limita a los metazoos: parece ocurrir en la mayoría de los sistemas vivos, incluidas las plantas, los hongos y las bacterias (Golstein et al. 2000; Lu, 2006; Ramsdale, 2006). En general la apoptosis normalmente ocurre durante el desarrollo y se asocia con el mantenimiento de la homeostasis celular, la eliminación de células dañadas, la respuesta a agentes infecciosos, en este caso pueden ser las bacterias lácticas, el envejecimiento y la diferenciación, así como en las respuestas adaptativas de las células al estrés biótico y abiótico (Danial y Korsmeyer, 2004; Green, 2005).

Varias líneas de evidencia conectan la apoptosis con las respuestas al estrés en los hongos. Aunque desencadenadas por diferentes estímulos, las respuestas al estrés están conectadas con el programa genético para el envejecimiento y ambas vías parecen compartir componentes comunes, que eventualmente conducen a la muerte celular apoptótica. De manera similar al envejecimiento, las respuestas al estrés generalmente se inician con una

explosión oxidativa que, según las condiciones, puede llevar a un aumento de la resistencia al estrés o al inicio de la muerte celular apoptótica (Green, 2005).

Las condiciones que inducen la apoptosis fúngica incluyen varios tipos de estrés, como el UV o el estrés oxidativo (peróxido de hidrógeno de BAL), el tratamiento con elementos de amplio espectro como las sales y los ácidos (ácidos orgánicos de BAL), o el desafío con compuestos específicos (bacteriocinas), incluidos los agentes antifúngicos conocidos. Por lo que se plantea que la exposición del hongo a células bacterianas (BAL) y sus bioproductos resultantes de esta interacción propician las causas que desencadenan la apoptosis del hongo. Por lo que se apoya la premisa de inducción apoptótica en esporas de *Aspergillus carbonarius* y que puede explicar el biocontrol observado en la sección 6, para ello se sugiere un mecanismo similar al presentado por moléculas antifúngicas de la familia de los polienos, que son utilizados como moléculas antifúngicas. El modo de acción de estos compuestos se debe a la interacción con el ergosterol en la membrana plasmática del microorganismo objetivo, que causa la formación de poros y la distorsión de la integridad celular (Liao et al.1999), y como consecuencia de este daño celular se induce la muerte celular de tipo apoptótico en hongos, cuyo mecanismo se probó para *Aspergillus fumigatus* por Mousavi y Robson, (2004). Por último mientras que hasta hace poco, incluso la mera existencia de apoptosis en hongos era cuestionable, los ejemplos anteriores muestran claramente que es un proceso general en todas las especies estudiadas, además la abundancia de compuestos producidos por microorganismos que inducen la apoptosis en otros hongos indica que podría ser una estrategia general utilizada por los microorganismos para protegerse de especies patógenas y competidoras como posiblemente este mecanismo es llevado a cabo por las bacterias lácticas estudiadas.

7.5. Adsorción de OTA por BAL

Otro mecanismo que posiblemente no tiene relación directa con el biocontrol del desarrollo del hongo micotoxigénico, pero que sí puede contribuir a mitigar el problema de contaminación por micotoxinas es la capacidad de las BAL para adsorber micotoxinas sobre su superficie, los resultados mostrados en la Figura 7.12 muestran un estudio en microscopia de barrido laser confocal, el cual consistió en sumergir BAL en sobrenadante libre de células de *Aspergillus carbonarius*, asumiéndose que el sobrenadante contiene ocratoxina A

producida por el hongo y con esto determinar la capacidad de *L. plantarum* para adsorber esta OTA. La micrografía A de la Figura 7.12 presenta la fluorescencia emitida alrededor de 450 nm, la cual posiblemente se deba a fluorescencia emitida por la ocratoxina A, la cual de acuerdo a lo reportado por Semeniuk et al. (2014) esta molécula emite fluorescencia a 450nm. Enseguida, la micrografía B muestra la aglomeración de bacterias en el plano enfocado por el microscopio de barrido laser confocal; la última micrografía muestra la superposición de las micrografías A y B que muestra la posición exacta de la fluorescencia de la micrografía A sobre la ubicación espacial de las bacterias de la micrografía B, representando la fluorescencia de OTA sobre su superficie. Estos resultados muestran evidencia de la capacidad bacteriana sobre la adsorción de micotoxinas sobre su superficie y que puede contribuir a limitar la biodisponibilidad de esta toxina en los alimentos o en la absorción en seres humanos.

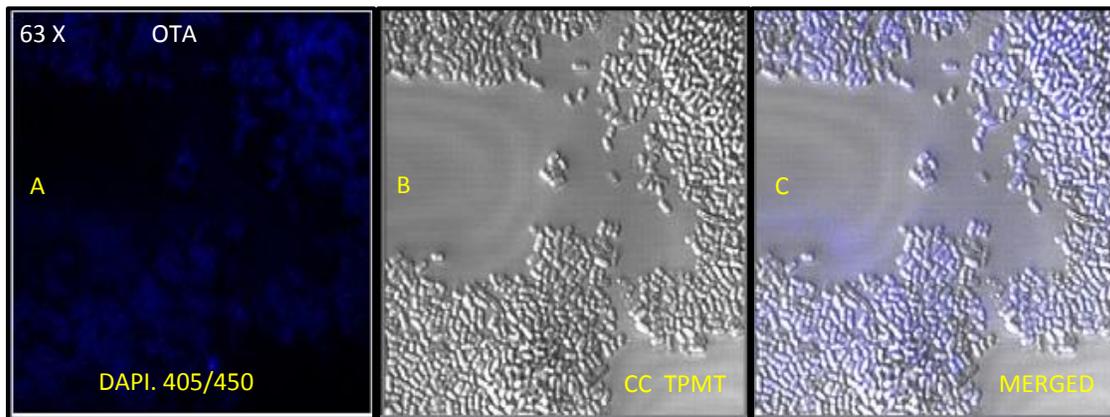


Figura 7.12 Micrografía A, fluorescencia debida a OTA adsorbida sobre la superficie de *L. plantarum* ; Micrografía B, *L. plantarum* en campo claro, Micrografía C, combinación de los canales A,B.

Para corroborar que la fluorescencia observada a 450nm no se debe a fluorescencia innata de la bacteria se realizó un estudio en microscopia confocal de *L. plantarum* pero sin haber estado en contacto con sobrenadantes fúngicos, la Figura 7.13 muestra la ausencia de fluorescencia de las bacterias lácticas en condiciones normales de crecimiento, lo que implica que la fluorescencia encontrada en la Figura 7.13 se debe netamente a la posible presencia de OTA, y se descarta la posibilidad de autofluorescencia por parte de las bacterias.

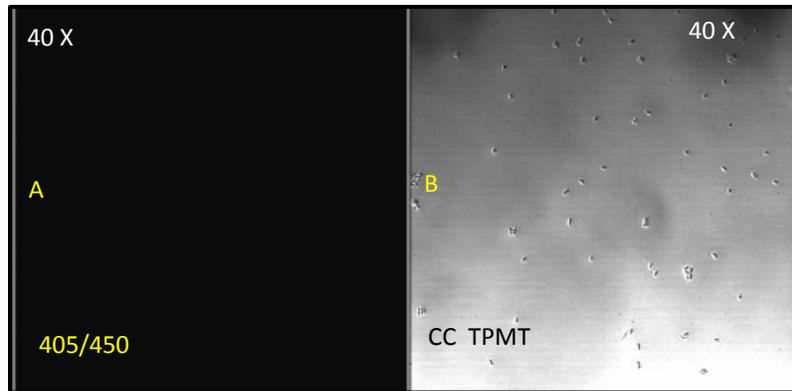


Figura 7.13 Micrografía A, fluorescencia nula a 450nm de longitud de onda. Micrografía B, *L. plantarum* en plano enfocado a 40X.

Diversos estudios han demostrado la capacidad de las bacterias del género *Lactobacillus* como *Lactobacillus rhamnosus* GG y LC 705, *L. acidophilus*, *L. gasseri* y *L. casei* Shirota para eliminar mediante adsorción micotoxinas de medios de cultivo contaminados (El – Nezami et al.1998a). A las cuales se les asocian hasta un 80% (p/p) de eliminación de la toxina (El–Nezami, Kankaanpaa, Salminen y Ahokas, 1998a). Más tarde, se demostró que muchas otras cepas de BAL se unían a micotoxinas como aflatoxina entre otras de una manera específica para cada cepa (Peltonen, El-Nezami, Haskard, Ahokas y Salminen, 2001). Por lo que se piensa que la composición química superficial de cada cepa genera diferencias en la cantidad adsorbida de micotoxinas, por ejemplo, la pared celular de las BAL está formada por la matriz de peptidoglicano que forma el componente estructural principal de la pared celular que alberga otros componentes como el ácido teicoico y lipoteicoico, este último ha demostrado un papel dominante en la adhesión a micotoxinas, posiblemente por su carácter hidrófobo que favorece la adhesión de micotoxinas (Shetty and Jespersen, 2006), de igual manera la capa proteica S y los polisacáridos neutros están involucrados en este proceso adhesivo. Estos componentes desempeñan diversas funciones, incluida la adhesión a epitelio intestinal y la unión macromoléculas, especialmente la red fibrilar de ácidos teicoicos y polisacáridos neutros (Shetty and Jespersen, 2006).

Zhang y Ohta, (1991) sugieren que el papel del peptidoglicano y polisacáridos superficiales están implicados tanto en la unión a superficies como en la unión a toxinas, esto concuerda con lo reportado por Haskard, Binnion y Ahokas, (2000) quienes asocian la degradación

enzimática de polisacáridos con la disminución en la capacidad de adhesión de micotoxinas, por lo que sugieren que los polisacáridos desempeñan un papel importante en la adhesión de igual manera la contribución de las proteínas superficiales sigue siendo significativa en este proceso adhesivo. Por otra parte, Gratz et al. (2004) sugiere la posibilidad de que tanto los mecanismos y las biomoléculas implicadas en la adhesión de las bacterias lácticas sobre el moco intestinal comparten sitios de unión con la adsorción de micotoxinas. Sin embargo es un campo que aun continua bajo investigación, por lo que se considera importante comprender las bases moleculares de la unión de diferentes micotoxinas sobre la superficie de BAL o cualquier otro microorganismo, ya que podría ser una alternativa para disminuir la presencia de micotoxinas en alimentos y piensos.

7.6. Conclusiones y perspectivas

En este capítulo se determinaron los mecanismos implicados en el antagonismo llevado a cabo por las bacterias lácticas del género *Lactobacillus plantarum* en contra del hongo micotoxigénico *Aspergillus carbonarius*, Los resultados obtenidos en microscopia electrónica de barrido, permitieron determinar el contacto físico entre ambos microorganismos. Se trata de antagonismo tipo directo, por su capacidad de adherirse sobre la superficie fúngica y posiblemente causar daño superficial sobre las esporas fúngicas (presencia de poros con diámetro aproximado de 100 nm).

Por lo que ambos mecanismos antagónicos pueden ser utilizados de manera coordinada por las bacterias para lograr el biocontrol del hongo micotoxigénico.

A su vez se determinó la capacidad de *Lactobacillus plantarum* para adsorber ocratoxina A sobre su superficie, este mecanismo coadyuva a limitar la biodisponibilidad de la toxina y como consecuencia puede ser una alternativa para disminuir la presencia de micotoxinas en alimentos y piensos.

Perspectivas

Respecto a los poros superficiales mostrados en la Figura 7.11, sería interesante realizar un estudio que profundice en la procedencia de los poros mediante la identificación de moléculas o mecanismos bacterianos por parte de *Lactobacillus plantarum*, con propiedades para desarrollar poros membranales. Asimismo sería relevante determinar el grado de daño debido a los poros, determinando la profundidad mediante finos cortes celulares transversales, evaluados en microscopia electrónica de transmisión (MET).

Por otra parte, es de sumo interés estudiar las interacciones a nivel molecular de las capas membranales de la superficie de bacterias y esporas estando en contacto, con la finalidad de estudiar cambios estructurales superficiales de las membranas de manera intra y extra celular, debidos al contacto entre superficies, para ello se plantea realizar finos cortes del co-cultivo y evaluar la morfología en MET.

Respecto a la capacidad determinada de adsorber ocratoxina A sobre la superficie de bacterias del género *Lactobacillus plantatum*, sería importante realizar un estudio que brinde una comprensión del porcentaje de disminución de OTA basado en este mecanismo, así mismo es de interés dilucidar las biomoléculas membranales responsables de la captación y retención de esta toxina, a su vez es imprescindible conocer si sólo se lleva a cabo el fenómeno de adsorción por parte de las bacterias o si pudiese presentarse el fenómeno de absorción y biotransformación de la micotoxina, asociados a la reducción en la biodisponibilidad de la micotoxina, proponiendo para este estudio el uso de trazadores fluorescentes específicos y análisis en microscopia de barrido laser confocal.

Por último es de interés realizar más estudios en los mecanismos implicados en el biocontrol del hongo micotoxigénico, como pueden ser la competencia por nutrientes y micronutrientes, competencia por agua, bloqueo de receptores y/o consumo de señales de germinación por parte de las bacterias lácticas, y por último biocontrol mediado por enzimas líticas y bacteriocinas de tipo proteico.

7.7. Referencias

- Adams, T.H., Wieser, JK y Yu, JH. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 35–54
- Antikainen, J., Anton, L., Sillanpaa, J., Korhonen, TK. (2002). Los dominios en la capa S, proteína CbsA de *Lactobacillus crispatus*, están implicados en la adherencia a colágenos, laminina y ácidos lipoteicoicos y en el autoensamblaje. *Molecular Microbiology* 46: 381-394.
- Avall-Jaaskelainen S. Palva A. (2005). Capas superficiales de *Lactobacillus* y sus aplicaciones. *FEMS Microbiological Reviews* 29: 511-529.
- Avall-Jaaskelainen S., Lindholm, A., Palva, A. (2003). La visualización de la superficie de la región de unión al receptor de la proteína de la capa S de *Lactobacillus brevis* en *Lactococcus lactis* proporciona a los lactococos no adhesivos la capacidad de adherirse a las células epiteliales intestinales. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2230-2236.
- Bowman, S. M. y Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* 28: 799-808.
- Breakspear, A. y Momany, M. (2007a). *Aspergillus nidulans* conidiation genes dewA, fluG, and stuA are differentially regulated in early vegetative growth. *Eukaryotic Cell* (6)1697-1700.
- Bréant, D., Jézéquel, K., y Lebeau, T. (2002). Optimisation of the cell release from immobilised cells of *Bacillus simplex* cultivated in culture media enriched with Cd²⁺: influence of Cd²⁺, inoculum size, culture medium and alginate beads characteristics. *Biotechnology Letters* 24: 1237-1241
- Busscher, HJ., Weerkamp, AH., van der Mei, HC., van Pelt, AW., de Jong, HP., Arends J. (1984). Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 48:980-983.
- Campbell, CK. (1971). Fine structure and physiology of conidial germination in *Aspergillus fumigatus*. *Transactions of the British Mycological Society* 57: 393-402.
- Dague, E., Alsteens, D., Latgé, J-P. y Dufrene, Y. F. (2008). Highresolution cell surface dynamics of germinating *Aspergillus fumigatus* conidia. *Biophysical Journal* 94: 656–660.
- Danial, NN., y Korsmeyer, SJ. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116: 205–219.
- De Leeuw, MI., Li, X., Lu, W. (2006). Características de unión de la capa superficial de *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 a proteínas de la matriz extracelular. *FEMS Microbiol Lett* 260: 210-215.
- Deegan, LH., Cotter, PD., Hill, C., Ross, P. (2006). Bacteriocins: herramientas biológicas para la conservación biológica y la extensión de la vida útil. *Dairy J.* 16: 1058-1071.
- d'Enfert, C., Bonini, BM., Zapella, PDA., Fontaine, T., da Silva, AM. y Terenzi, HF. (1999). Neutral trehalases catalyse intracellular trehalose breakdown in filamentous fungi *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology* 32: 471-483.
- Deveau, A., Bonito, G., Uehling, J., Paoletti, M., Becker, M., Bindschedler, S., Hacquard, S., Herve, V., Labbe, J., Lastovetsky, O.A., Mieszkina, S., Millet, L.J., Vajna, B., Junier, P., Bonfante, P., Krom, B.P. Olsson, S., Dirk van Elsas y Wick, L. (2018). Bacterial–fungal interactions: ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(3), 335-352.
- Deveau, A., Brulé, C., Palin, B., Champmartin, D., Rubini, P., Garbaye, J., Sarniguet, A., Frey-Klett, P. (2010). Role of fungal trehalose and bacterial thiamine in the improved survival and growth of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N and the helper bacterium *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8. *Environ. Microbiol* 2:560–568.
- Dexter, SC. (1979). Influence of substratum critical surface tension on bacterial adhesion-in situ studies. *J. Coll. Interf* 70:346-354.
- El-Nazami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S., y Ahokas, J. (1998a). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1, *Food and chemical Toxicology*, 36(4), 321-326
- Etxebeste, O., Markina-Iñarrairaegui, A., Garzia, A., Herrero-García, E., Ugalde, U., Espeso, EA. (2009). KapI, a non-essential member of the Pse1p/ Imp5 karyopherin family, controls colonial and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 155: 3934–3945
- Feofilova, EP., Ivashchkin, AA., Alekhin, AI., y Sergeeva, YE. (2012). Fungal spores: Dormancy, germination, chemical composition, and role in biotechnology (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48: 1–11.

- Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M y Sarniguet, A. (2011). Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75(4): 583–609.
- Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I., Green, D.R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol.* 2:156–62
- Green D.R. (2005). Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121: 671–674.
- Harris, S.D. (2010). Hyphal growth and polarity. *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi* 238-259.
- Hoffman, M.T., y Arnold, A.E. (2010). Diverse bacteria inhabit living hyphae of phylogenetically diverse fungal endophytes. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:4063–4075.
- Hogan, D. y R. Kolter. (2002). *Pseudomonas-Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. *Science* 296:2229–2232.
- Hynonen, U., Westerlund-Wikstrom., Palva, A., Korhonen, T.K. (2002). Identificación por flagelo de una función de unión a fibronectina y células epiteliales en la proteína de superficie SlpA de *Lactobacillus brevis*. *J Bacteriol* 184: 3360-3367.
- Jack, R.W., Carne, A., Metzger, J., Stefanovic, S., Sahl, H.G., Jung, G., Tagg, J. (1994). Elucidation of the structure of SA-FF22, a lanthionine-containing antibacterial peptide produced by *Streptococcus pyogenes* strain FF22. *Europ. J. Biochem.* 220:455–462.
- Jakava-Viljanen M., Avall-Jaaskelainen S., Messner pag., Sleytr, U.B., Palva A. (2002) Aislamiento de tres nuevos genes de proteínas de la capa superficial (slp) de *Lactobacillus brevis* ATCC 14869 y caracterización del cambio en su expresión en condiciones aireadas y anaeróbicas. *Journal of Bacteriology* 184: 6786-6795.
- Jarosz, L.M., Deng, D.M., van der Mei, H.C., Crielaard, W., Krom, B.P., (2009). *Streptococcus mutans* competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. *Eukaryot. Cell* 8 (11): 1658-1664.
- Johnson-Henry, K.C., Hagen, K.E., Gordonpour., Sherman, P.M. (2007). Los extractos de proteínas de la capa superficial de *Lactobacillus helveticus* inhiben la adhesión enterohemorrágica de *Escherichia coli* O157: H7 a las células epiteliales. *Microbiol Celular* 9: 356-367.
- Joyner, P.M., Liu, J., Zhang, Z., Merritt, J., Qi, F., Cichewicz, R.H. (2010). Mutanobactin A from the human oral pathogen *Streptococcus mutans* is a cross-kingdom regulator of the yeast mycelium transition. *Organic and Biomolecular Chemistry* 8 (24): 5486-5489.
- Lebeau, T., Bagot, D., Jézéquel, K. y Fabre, B. (2002). Cadmium biosorption by free and immobilised microorganisms cultivated in a liquid soil extract medium: effects of Cd, pH and techniques of culture. *The Science of the Total Environment* 291: 73-83
- Lecuona, R.E. Ed. (1996). Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Argentina. 338 p.
- Lorca SOL., Torino MI Fuente DV Ljungh., (2002). Los lactobacilos expresan proteínas de la superficie celular que median la unión de colágeno inmovilizado y fibronectina. *FEMS Microbiol Lett* 206: 31-37.
- Lovley, D.R., (ed.). (2000). Environmental Microbe -Metal Interactions, American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Van der Mei, H.C., Weerkamp, A., Busscher H. (1987). Physico-chemical surface characteristics and adhesive properties of *Streptococcus salivarius* strains with defined cell surface structures. *FEMS Microbiology.* 40:15-19.
- Mims, C.W., Richardson E.A., y Timberlake W.E. (1988). Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution. *Protoplasma* 244: 132–141
- Moll, G., Ubbink-Kok, T., Hildeng-Hauge, H., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Konings, W.N., Driessen, A.J.M. (1996). Lactococcin G es una bacteriocina bicomponente conductora de iones de potasio. *Journal of Bacteriology* 178: 600–605.
- Moll, G.N., Konings, W.N., Driessen, A.J.M. (1999). Bacteriocinas: mecanismo de inserción de membrana y formación de poros. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 185–198.
- Montville, T.J., Chen, Y. (1998) Acción mecanicista de pediocin y nisin: progreso reciente y preguntas sin resolver. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 50: 511–519.
- Morales, D.K., Grahl, N., Okegbe, C., Dietrich, L.E., Jacobs, N.J., Hogan, D.A. (2013). Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *MBio* 4 (1)
- Mousavi, S.A. y Robson, G.D. (2004). Oxidative and amphotericin B-mediated cell death in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* is associated with an apoptotic-like phenotype. *Microbiology* 150: 1937–1945.

- Mowat, E., Rajendran, R., Williams, C., McCulloch, E., Jones, B., Lang, S., Ramage, G. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* and their small diffusible extracellular molecules inhibit *Aspergillus fumigatus* biofilm formation. *FEMS Microbiology*. 313 (2): 96-102.
- Nikawa, H., Jin, C., Fukushima, H., Makihiro, S., Hamada, T. (2001). Antifungal activity of histatin- 5 against non- albicans *Candida* species. *Oral Microbiology and Immunology*. 16: 250–252
- Oshero, N. y May, G. S. (2001). The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiology Letters* 199: 153-160.
- Panke-Buisse, K., Poole, AC., Goodrich, JK. (2015). Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function. *ISME Journal* ;9:980–9.
- Pederson, C.S. (1936). A Study of the Species *Lactobacillus plantarum* (Orla-Jensen) Bergey et al. *Journal of Bacteriology*. 31(3):217-24.
- Peltonen K., El-Nezami H., Haskard C., Ahokas J., Salminen S. (2001). Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 84(10):2152-2156.
- Peters, B.M., Jabra-Rizk, M.A., Scheper, M.A., Leid, J.G., Costerton, J.W., Shirtliff, M.E. (2010). Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus-Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 59 (3): 493-503.
- Poudel R, Jumpponen A, Schlatter DC et al. (2016) Microbiome networks: a systems framework for identifying candidate microbial assemblages for disease management. *Phytopathology*; 106:1083–96.
- Ramsdale, M. (2006). Programmed cell death and apoptosis in fungi. In: (ed). *Fungal genomics*. Springer Berlin.
- Ruas-Madiedo, pag., De Los Reyes-Gavilan, CG. (2005). Revisión invitada: métodos para la detección, aislamiento y caracterización de exopolisacáridos producidos por bacterias del ácido láctico. *Journal of Dairy Science* 88: 843-856.
- Ruijter, G. J. G., Bax, M., Patel, H., Flitter, S. J., van de Vondervoort, P. J. I., de Vries, R. P., vanKuyk, P. A. y Visser, J. (2003). Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus Niger* conidiospores. *Eukaryotic Cell* 2: 690-698.
- Sablon, E.B., Contreras y Vandame, E. (2000). Antimicrobial peptides of Lactic Acid Bacteria: mode of action, Genetic and Biosynthesis. In advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.
- Sewall, T.C., Mims, C., y Timberlake W. (1990). A controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell* 2: 731–739
- Shetty, P.H., Jespersen, L., (2006). *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxins decontaminating agents. *Trends in Food Science & Technology*, 17(2), 48-55.
- Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P.W., Garg, S.K. (2002). Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere* 48: 427-435.
- Tarkka, M.T., Sarniguet, A., Frey-Klett, P. (2009). Inter-kingdom encounters: recent advances in molecular bacterium-fungus interactions. *Curr. Genet*. 55 (3): 233-243.
- Taubitz, A., Bauer, B., Heesemann, J. and Ebel, F. (2007). Role of respiration in the germination process of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Current Microbiology* 54: 354-360.
- Todorov, SD, Powell, JE, Meincken, M., Witthuhn, RC., Dicks, LMT. (2007) Factores que afectan la adsorción de bacteriocina bact8KF de *Lactobacillus plantarum* a *Enterococcus faecalis* y *Listeria innocua*. *J. Dairy Technol* 60: 221–227.
- Todorov, SD., Dicks, LMT. (2006). Parámetros que afectan la adsorción de plantaricina 423, una bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* 423 aislada de cerveza de sorgo. *Biotecnología Journal*. 1: 405–409.
- Todorov, SD., Meincken, M., Dicks, LMT. (2006). Factores que afectan la adsorción de bacteriocinas ST194BZ y ST23LD a *Lactobacillus sakei* y *Enterococcus* sp. *J. Gen. Appl. Microbiol*. 52: 159–167.
- Vidgren SOL. Palva YO. Pakkanen R. Lounatmaa K. Palva A. (1992). Gen de la proteína de la capa S de *Lactobacillus brevis*: clonación por reacción en cadena de la polimerasa y determinación de la secuencia de nucleótidos. *J Bacteriol* 174: 7419-7427.
- Weber, D. J y Hess, W. M. (1976). *The Fungal Spore: Form and Function*. John Wiley and Sons Inc, New York.
- Wynne, E., Norman, J. (1953). On the concept of “Direct antagonism” in bacteria. *The Journal of Infectious Diseases*. 93: 243-246
- Zhang, X.B., y Ohta, Y. (1991^a). In vitro binding of mutagenic pyrolyzates to lactic acid bacteria cells in human gastric juice. *Journal of Dairy Science*. 74: 752-757.

8. Estudio de mecanismos de adhesión superficial de *L. plantarum* sobre esporas de *A. carbonarius*

8.1. Resumen

La adhesión bacteriana a superficies es un proceso complejo gobernado por muchos factores, incluidas las características de la superficie, como la rugosidad, topografía, composición química, hidrofobicidad e interacciones eléctricas de superficie, entre otros. **Objetivo.** El objetivo de este capítulo se basa en estudiar los mecanismos involucrados en la adhesión bacteriana sobre la superficie de esporas fúngicas. **Métodos.** Para tal propósito se hace uso de microscopia de fuerzas atómicas (MFA), espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR), Microscopia de barrido laser confocal (CLSM), Potencial Zeta (PZ). **Resultados.** Se determinó la carga superficial y la magnitud de bacterias lácticas y esporas fúngicas evaluado en intervalo de pH 2-7, siendo ambas negativas con valores de -11 a -18 mV para bacterias y de 0 a -10 mV para esporas fúngicas. Así mismo se determinó que al aumentar el pH del medio el potencial Zeta tienden a valores más electronegativos, lo que implica que bajo estas condiciones las fuerzas de repulsión electroestáticas predominan en el sistema, por lo que la adhesión bacteriana no puede ser explicada por una atracción electroestática. Sin embargo, haciendo uso de AlCl_3 0.001M pH 4 se logró disminuir las fuerzas de repulsión electroestáticas, fomentándose la aglomeración bacteriana sobre la superficie de esporas fúngicas.

Posteriormente se evaluó el efecto de las propiedades topográficas y de rugosidad de la superficie de esporas fúngicas. Se determinó el valor de rugosidad promedio R_a (μm) = 0.097 ± 0.031 . Valor que es considerado medio-bajo de acuerdo a la norma DIN 4769 por lo que la rugosidad podría ser un factor que no relacione en gran medida la adhesión observada. Finalmente, además de estudiar las propiedades fisicoquímicas que pueden influir en la adhesión bacteriana sobre superficies, es importante ampliar el estudio hacia las propiedades inherentes de la célula como lo son las biomoléculas superficiales (adhesinas). Mediante CLSM y FTIR se determinaron enlaces químicos superficiales que fueron asociados a proteínas y polisacáridos como posibles biomoléculas membranales asociadas en la adhesión

de *L. plantarum* sobre esporas de *A. carbonarius* (resultados apoyados mediante análisis de componentes principales).

Una mejor comprensión del mecanismo de adhesión bacteriana sobre la superficie de esporas fúngicas y su correlación con las características de la superficie de anclaje permitiría ampliar el conocimiento respecto a si la adhesión bacteriana sobre esporas fúngicas surge como consecuencia de las propiedades superficiales fisicoquímicas, o si es una estrategia antagónica llevada a cabo por las bacterias para competir contra el hongo micotoxigénico

8.2. Introducción

Durante la adhesión de microorganismos célula-célula o a superficies inertes, el substrato tiene que poseer condiciones adecuadas para la adsorción de la bacteria a la superficie. Esta etapa se encuentra gobernada por dos mecanismos que pueden influir en la adhesión.

- a) Factores inespecíficos de índole fisicoquímico y eléctricos
- b) Factores específicos de carácter adhesina-receptor (fimbrias, biomoléculas, polisacáridos, proteínas, lípidos etc).

Ambos factores pueden estar implicados en la adhesión por lo que es importante ser estudiados por separado.

- a) Se sabe que en esta fase la interacción inicial entre la célula y la superficie a la cual está adherida está gobernada por fuerzas de largo y mediano alcance ante todo las fuerzas de van der Waals y las fuerzas electrostáticas (Fletcher, 1996; Razatos et al.1998). Sin embargo, la bibliografía sugiere que no existe ninguna interacción entre la superficie sólida y el microorganismo posterior a una distancia de 50 nm, por lo que solo a distancias menores de 50nm entre superficies (coloides) aparecen las fuerzas atractivas de Van der Waals, que son debidas a un efecto dipolo entre átomos o moléculas. A medida que se va acercando a la superficie de anclaje y a una distancia más corta que la interacción por las Fuerzas de Van der Waals, aparece una segunda fuerza, conocida como fuerza de repulsión debida a la carga negativa de la bacteria y del material que en ocasiones suelen ser del mismo signo. De la interacción de estas dos fuerzas es de lo que depende que un microorganismos tenga mayor o menor acercamiento a la superficie de adhesión y es denominada Energía de Gibbs (Ábalos , 2005), expresado en la siguiente ecuación
Energía de Gibbs= Van der Wals – potencial Zeta

Estas fuerzas dependen de las propiedades fisicoquímicas del sustrato (esporas fúngicas), de la superficie bacteriana y del sistema en que están inmersas, algunas de estas propiedades son:

- Carga superficial (Gannon et al.1991)
- Fuerza iónica (Hermansson, 1999)
- Rugosidad (Hermansson, 1999)
- Hidrofobicidad (Gannon et al.1991)
- Energía libre (Busscher et al.1984)

Rugosidad y topografía

Entre las propiedades de la superficie, la rugosidad y la topografía han sido los temas principales en la investigación en el estudio de biopelículas, ya que juega un papel importante por el cual se puede fomentar la aglomeración bacteriana. Sin embargo la bibliografía ha demostrado que la definición de rugosidad hoy en día no es lo suficiente mente clara, ya que basarse en la amplitud promedio de los picos y valles no es lo suficiente para describir las características de una superficie, además es necesario contemplar otros factores importantes como la distribución de picos y valles que tienen relevancia importante para la formación de biopelículas microbianas (Poncin-Epaillard et al. 2013; Siegismund et al. 2014), sin embargo el estudio de esta propiedad en la actualidad es relevante para explicar la interacción entre superficies.

Este factor está relacionado directamente con la formación de biopelículas ya que la bibliografía sugiere que un aumento en la rugosidad e hidrofobicidad de la superficie promueve la unión bacteriana, se cree que aumenta el área de contacto entre la superficie del material y las células bacterianas (Anselme et al. 2010) además de que la rugosidad superficial promueve la protección contra las fuerzas de corte, es decir las fuerzas de deslizamiento están reducidas y el área de superficie se torna mayor (Teughels et al. 2006).

Por otra parte, por la complejidad que involucra el estudio de la adhesión bacteriana sobre superficies es importante complementar el estudio con la evaluación de factores biomoleculares que también pueden explicar la adhesión superficial de bacterias sobre superficies.

b) Factores específicos de carácter adhesina-receptor (fimbrias, biomoléculas, polisacáridos, proteínas, lípidos etc).

Se ha descrito que las bacterias, una vez que perciben una superficie, proceden a formar una unión activa vía apéndices, como fimbrias, flagelos o pili.

Estudios en microscopia electrónica, han revelado que algunas bacterias se adhieren a superficies mediante finas fimbrias poliméricas extracelulares. Por lo que se cree que probablemente estos apéndices ayudan superar las fuerzas de repulsión electrostática y además contribuyen a la adhesión bacteriana (Donlan, 2002; Ramadan, Sanclement y Thomas, 2005).

Por otra parte, se piensa que la motilidad, otorgada por flagelos sobre algunas bacterias, ayuda al desplazamiento de bacterias hasta la superficie de anclaje y como se mencionó anteriormente superar las fuerzas repulsivas, Sin embargo, la motilidad no pareciera ser un requisito esencial, puesto que bacterias Gram positivas inmóviles, como estafilococos, estreptococos y micobacterias, también poseen la capacidad de formar biopelículas (Scott y Manning, 2003). En el caso de las bacterias Gram positivas se ha descrito que tienen la capacidad de usar proteínas superficiales para estabilizar su unión sobre superficies (Scott y Manning, 2003).

El estudio de las biopelículas ha relacionado además el uso de polímeros como compuestos que ayudan al recubrimiento rápido sobre la superficie de cualquier material y se cree que constituyen un requisito indispensable para una ulterior adhesión microbiana. Aparentemente se piensa que dichos polímeros pueden producir algún tipo de interacción hidrofóbica entre la superficie celular y la del sustrato que permitirían a la bacteria superar las activas fuerzas de rechazo (electrostáticas) a cierta distancia de la superficie del sustrato, y lograr adherirse irreversiblemente. Aunque en los últimos años, estudios han propuesto que fracciones sacarídicas y ácidos lipoteicoicos podrían estar implicados en dicha unión, así mismo se propone que en la mayoría de los casos esté mediada por proteínas.

Avall- Jaaskelainen y Palva (2005) han demostrado que las adhesinas identificadas utilizadas por *Lactobacillus* para la unión a mucus intestinal son de carácter proteico. De igual manera se ha reportado que las proteínas de la capa S están implicadas en la adhesión sin embargo

muchas de estas proteínas no han sido validadas con función de adhesión. Solo algunas proteínas como en el caso de Slp de *L. helveticus* R0052, las SlpA de *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 y *L. acidophilus* NCFM, y CbsA de *L. crispatus* JCM 5810, han demostrado ser responsables de la adhesión a células epiteliales intestinales y a proteínas de la matriz extracelular (Avall- Jaaskelainen y Palva 2005). Además, estas mismas pueden fungir como proteínas de unión a colágeno y unión a fibronectina. No obstante, la adhesión también puede ser mediada por factores no proteicos como pueden ser los ácidos lipoteicoicos los cuales se consideran ser las moléculas que constituyen la mayor aportación a la hidrofobicidad de superficie en función de las sustituciones con ésteres de D- alanina. Por tanto contribuirían principalmente a la adhesión inespecífica.

Busscher et al. (2000) han analizado los procesos de adhesión de bacterias sobre superficies y han encontrado que las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) secretada por las bacterias y los flagelos bacterianos también juega un papel importante en la adhesión y la posterior formación de biopelículas (ZoBell, 1943)

La Figura 8.1 resume las interacciones a) Factores inespecíficos de índole fisicoquímicos y eléctricos y b) Factores específicos de carácter adhesina- receptor.

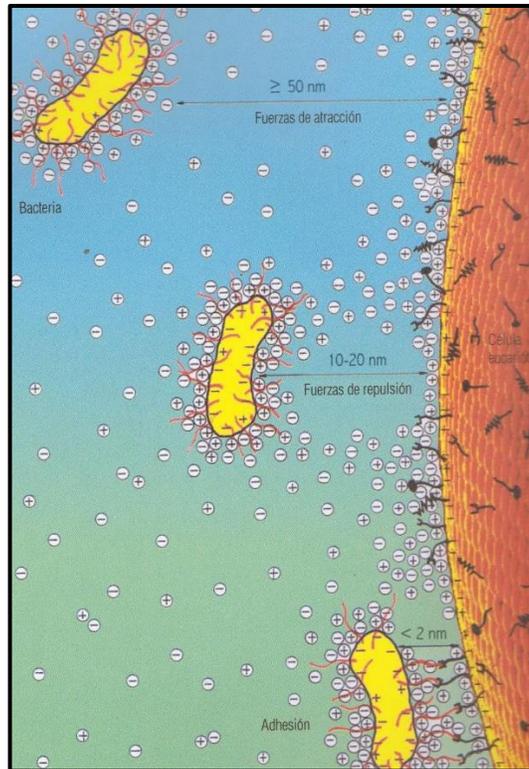


Figura 8.1 Fuerzas de atracción y repulsión en función de la distancia entre dos coloides, uso de bacteriocinas como mecanismo de adhesión. Fuente: <http://microbiologiayepidemiologia.blogspot.com/2012/>

Los métodos comúnmente utilizados para evaluar las propiedades adhesivas de bacterias son mediante análisis microscópicos (Caldwell y Germida, 1985; Evans-Hurrell et al.1993; y Friedman, 1997). Como el uso de microscopia electrónica (Knutton, 1995), y microscopia laser confocal (Manning, 1995), y recientemente se ha hecho uso de microscopia de fuerza atómica.

En el anexo F, se realiza una descripción más detallada y amplia del funcionamiento de los equipos de microscopia y espectroscopia avanzada utilizados en el desarrollo de la tesis.

Una mejor comprensión del mecanismo de adhesión bacteriana sobre la superficie de esporas fúngicas permitiría ampliar el conocimiento respecto a si la adhesión bacteriana sobre esporas fúngicas surge como consecuencia de las propiedades superficiales fisicoquímicas, o si es una estrategia antagónica llevada a cabo por las bacterias para competir contra el hongo micotoxigénico. Finalmente, el objetivo de este capítulo consiste en estudiar factores de

superficie como la rugosidad, topografía, composición química, e interacciones eléctricas, implicados en la adhesión bacteriana sobre superficies.

8.3. Materiales y métodos

8.3.1. *Interacciones eléctricas de doble capa (interfacial) implicadas en la adhesión bacteriana a superficies*

Los microorganismos y las condiciones de crecimiento se realizaron como se describe en la sección 6.3.1.

8.3.2. *Tratamiento de muestras para análisis de potencial Zeta*

La determinación y cuantificación de potencial Zeta, se realizó agregando alícuotas de 5 (mL) de suspensión del microorganismo a estudiar (BAL y espora fúngica) en 10 tubos falcón de 15 mL posteriormente las células se centrifugaron (centrífuga Allegra X-12R Beckman coulter) a 5000 rpm durante 5 min, seguidamente el sobrenadante libre de células de cada tubo se eliminó mediante decantación, el precipitado de células se resuspendió en solución isotónica 0.15 M, el proceso de centrifugación se repitió 3 veces bajo las mismas condiciones y se eliminó el sobrenadante (solución isotónica) en cada proceso. La última resuspensión de bacterias se realizó con solución buffer (citrato-fosfato, 0.1; 0.2 M), donde cada tubo fue resuspendido a un pH diferente (2.6, 3, 3.6, 4, 4.6, 5, 5.6, 6, 6.6, 7), dejándose en contacto durante 24 h previo al análisis de potencial Zeta.

La determinación del efecto de AlCl_3 sobre el potencial Zeta de los microorganismos a estudiar (BAL y espora fúngica) se realizó tomando 1ml de suspensión del microorganismo a estudiar obtenida del punto 5.3.1 y diluyendo en 9 mL de solución isotónica 0.15 M, seguidamente las bacterias se centrifugaron (centrífuga Allegra X-12R Beckman Coulter) a 5000 rpm durante 5 min, y se eliminó el sobrenadante libre de células mediante decantación, este procedimiento de lavado se realizó tres veces, para posteriormente resuspender las células en solución de AlCl_3 0.01M a pH 4, se dejó en contacto con las células durante 5h y se procedió al análisis de potencial Zeta.

Todas las determinaciones de potencial Zeta se realizaron en el equipo Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Inc., Inglaterra).

Para el estudio microscópico del efecto de AlCl_3 sobre la aglomeración bacteriana, se preparó medio CYA adicionado con AlCl_3 0.01M, en el cual se realizó un co-cultivo líquido bacteria-espora, utilizando una densidad celular bacteriana de 1×10^5 (cel/mL) y fúngica de 1×10^6 (esp/mL). Para su visualización en microscopía en campo claro se utilizó un microscopio OLYMPUS modelo BX40F4, se tomaron micrografías a un aumento de 40X al tiempo 5, 15 y 24 horas, adicionalmente se realizó un estudio cuantitativo morfológico, donde se determinó el diámetro promedio de las esporas enfocadas por cuadro y el número de bacterias por cuadro a través del tiempo.

8.3.3. *Estudio de rugosidad en microscopia de fuerzas atómicas (MFA) de superficie de esporas fúngicas y efecto sobre adhesión bacteriana*

La preparación de muestras para el estudio de rugosidad evaluado en MFA se realizó en las mismas condiciones como la preparación de muestras MEB para estructuras fúngicas (*A. carbonarius*) descrito en la sección 7.3.3.1

Las muestras fueron procesadas en el equipo alpha300 RA de WITec combinación Raman-AFM, y analizadas con el software Witec project FOUR 4.0

8.3.4. *Determinación de composición química superficial de esporas fúngicas en estado de dormancia y en vías germinativas, evaluado en espectroscopia infrarroja de transformada de fourier (FTIR)*

Para el estudio de composición química de esporas fúngicas se utilizaron esporas de *Aspergillus carbonarius* obtenidas como se describe en la sección 6.3.1.

Como primer paso la suspensión de esporas fue filtrada con ayuda de una gasa y un embudo bajo condiciones estériles con el fin de retener el micelio que puede estar presente, esto permitió tener una suspensión compuesta solamente por esporas.

Se procedió a realizar una separación de esporas por su densidad y como consecuencia por su estado de maduración, para esto se realizó una sedimentación por gradiente isopícnico utilizando un gradiente de densidades de 10 – 14 gramos de dextrosa sobre litro (g/L) colocados en un tubo falcón de 50 (mL), en la parte superior del tubo se adiciono 5 (mL) de suspensión de esporas y se centrifugó (centrifuga Allegra X-12R Beckman Coulter) a 3000

rpm durante 10 minutos, posteriormente se tomaron muestras de las bandas superior etiquetada como PA= parte alta, e inferior etiquetada como PB= parte baja, formadas como consecuencia de la separación isopícnica, las cuales fueron colocadas en portaobjetos doble cóncavo de 25.4 x 76.2mm, se cubrió con cubreobjetos y se comprobó la separación de esporas por estados de maduración (diferencias morfológicas), con ayuda de un microscopio OLYMPUS modelo BX40F4, se tomaron micrografías a un aumento de 100X.

Una vez lograda la separación de esporas por estado de maduración, se procedió a realizar el análisis de composición química de las esporas en estado de dormancia (PB) y en vías de germinación (PA). Se lavaron las fracciones PA y PB con agua destilada para eliminar el exceso de dextrosa y se colocó 1 (mL) de cada fracción en portaobjetos de vidrio de 25.4 x 76.2mm, las muestras de cada fracción se realizaron por duplicado, posteriormente se dejó evaporar el excedente de agua a temperatura ambiente durante 24h, seguidamente se realizó el estudio de composición en espectroscopia infrarroja a longitud de onda media.

Para el estudio en espectroscopia infrarroja se utilizó un espectrofotómetro FT-IR Thermo Nicolet Avatar, equipado con accesorios ATR (Goldengate, specac), detector DTGS, fuente ever-glo y divisor de haz KBr/ Ge.

8.3.5. *Evaluación de lípidos y polisacáridos superficiales en microscopia de barrido laser confocal (CLSM) como biomoléculas responsables de adhesión superficial bacteria láctica-espora fúngica*

8.3.5.1. *Determinación de no auto fluorescencia en medios de cultivo y materiales*

Se preparó medio MRS (BD Difco), y PDA (PD Bioxon), posteriormente se realizó un estudio de autofluorescencia en microscopia laser confocal, a las longitudes de excitación/emisión, 405/458; 488/538; 561/660.

Para el estudio de autofluorescencia de microorganismos, se utilizaron microorganismos obtenidos como se describe en la sección 7.3.1, posteriormente se realizó un cultivo bacteriano en medio líquido (CYA-anexo B) y un cultivo de esporas fúngicas en medio líquido (CYA-anexo B), colocados en portaobjetos de vidrio de 25.4 x 76.2mm, ambos

microorganismos fueron analizados en microscopia laser confocal, a las longitudes de excitación/emisión, 405/458; 488/538; 561/660.

El estudio en microscopía de barrido laser confocal se realizó como se describe en la sección 7.3.2.1

8.3.5.2. *Inducción de fluorescencia mediante trazadores fluorescentes DIL, DID, en lípidos superficiales de bacterias lácticas y esporas fúngicas respectivamente*

Los microorganismos y las condiciones de crecimiento de cada uno se realizaron como se describe en la sección 6.3.1, posteriormente la inducción de fluorescencia mediante DIL Y DID para bacterias y esporas, respectivamente, se realizó en dos etapas, la etapa 1 consistió en la preparación de microorganismos, unidades experimentales, y lavado de células. La etapa 2 consistió en la inducción de fluorescencia mediante trazadores lipídicos membranales DIL Y DID.

Etapas 1: se colocó 2mL de suspensión bacteriana y de esporas fúngicas en tubos Eppendorf de 2mL (aproximadamente 1×10^7 cel/mL), posteriormente cada suspensión se centrifugó (Eppendorf™ Microcentrífuga 5424000410 Knob) a 10 000 rpm durante 10 min, el sobrenadante libre de células se eliminó y el precipitado de células (bacteria, esporas) se resuspendió en solución isotónica 0.9% p/v, seguidamente con ayuda de un vortex (VORTEX-VIB Modelo Movil-Vib/ XH-B) se agitaron las suspensiones durante 30 s, nuevamente se centrifugaron las células bajo las mismas condiciones, y se repitieron las resuspensiones en solución isotónica 3 veces más.

Etapas 2: Se adicionaron los trazadores DIL para bacterias y DID para esporas fúngicas, a una concentración de 10µL/mL de suspensión de bacteria o espora. Los tubos con cada microorganismo se protegieron de la luz con papel aluminio y se incubaron durante 1h a 30°C, una vez transcurrido el tiempo, los microorganismos fueron centrifugados (Eppendorf™ Microcentrífuga 5424000410 Knob) a 10 000 rpm durante 10 min, el sobrenadante libre de células que contiene el exceso del trazador fluorescente fue eliminado, seguidamente el precipitado de células fue lavado con solución isotónica 3 veces como se describió anteriormente, finalmente se preparó un co-cultivo bacteria-espora con cada microorganismo trazado con fluorescencia, y se dejó en contacto durante 3-5 h previo al análisis de fluorescencia en microscopia de barrido laser confocal.

8.3.5.3. *Inducción de fluorescencia mediante (lectina WGA) en polisacáridos superficiales de bacterias lácticas y esporas fúngicas*

Los microorganismos y las condiciones de crecimiento de cada uno se realizaron como se describe en la sección 6.3.1. La preparación de microorganismos, unidades experimentales, y lavado de células se realizó de la misma manera como se describió en la etapa 1 de la sección 8.3.5.2; de igual manera la inducción de fluorescencia mediante lectinas WGA-Alexa 488 y WGA-Alexa594 se realizó de la misma manera como se describió en la etapa 2 (inducción de fluorescencia).

El estudio en microscopía laser confocal se realizó como se describe en la sección 7.3.2.1

8.3.6. *Determinación de enlaces químicos moleculares implicados en la adhesión bacteriana mediante espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)*

Para el estudio de enlaces químicos implicados en la adhesión bacteriana se realizaron dos co-cultivos en medio líquido (CYA) en tubos Eppendorf de 2mL.

Para el co-cultivo A se utilizaron BAL obtenidas como se describe en la sección 5.3.1 y esporas en estado de dormancia obtenidas como se describe en la sección 7.3.3

El co-cultivo B, se preparó con bacterias obtenidas como se describe en la sección 5.3.1, y esporas en vías germinativas obtenidas como se describe en el punto 7.3.3.

Ambos co-cultivos se dejaron en reposo durante 12h a temperatura ambiente, posterior a ello se eliminó el medio de cultivo mediante decantación y se lavaron las células con solución isotónica. Posteriormente se colocaron los co-cultivos en portaobjetos de vidrio de 25.4 x 76.2mm, se dejó evaporar el medio líquido (solución isotónica) a temperatura ambiente durante 12h. Posteriormente se realizó el estudio de enlaces químicos implicados en la adhesión mediante espectrometría infrarroja a longitud de onda media.

Para el estudio en espectrometría infrarroja se utilizó un espectrómetro FT-IR Thermo Nicolet Avatar, equipado con accesorios ATR (Goldengate, specac), detector DTGS, fuente ever-glo y divisor de haz KBr/ Ge.

8.4. Resultados y discusión

8.4.1. Interacciones eléctricas de doble capa (interfacial) implicadas en la adhesión bacteriana a superficies

La adhesión bacteriana a superficies es un proceso complejo gobernado por múltiples factores, incluidas las características de la superficie, como la rugosidad, topografía, composición química, hidrofobicidad e interacciones eléctricas de superficie, entre otros.

Como primera aproximación se realizó un estudio fisicoquímico de índole electrostático de la adhesión entre ambos microorganismos, se determinó el potencial Z de bacterias lácticas y de esporas fúngicas en función del pH, resultado que son mostrados en la Figura 8.2.

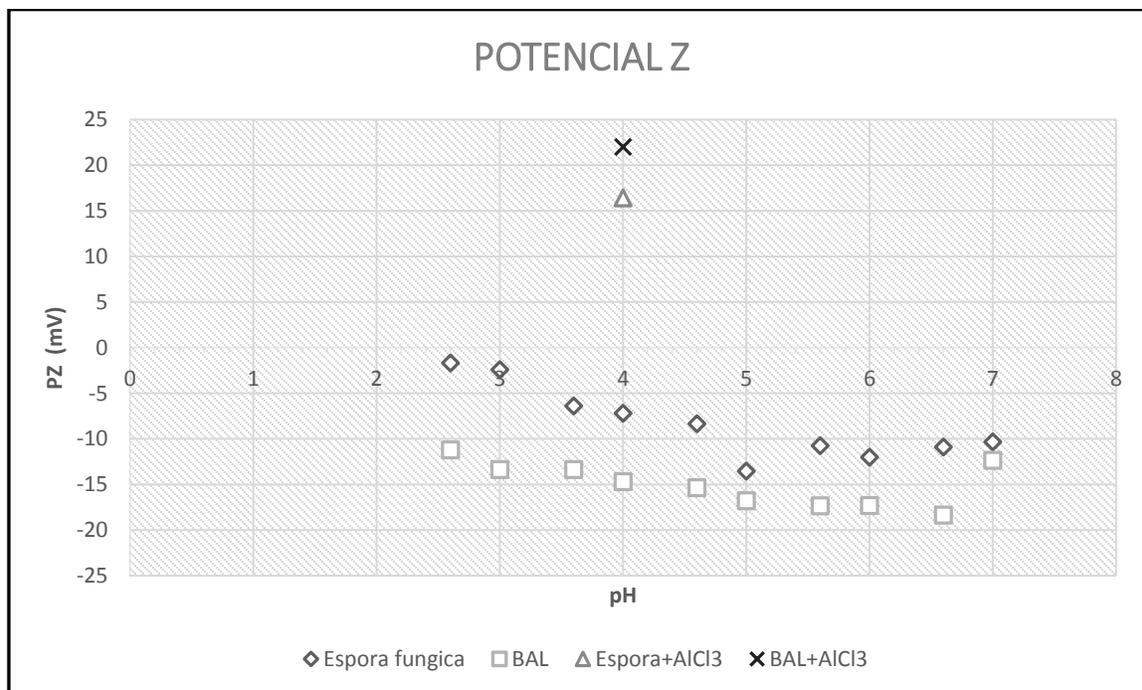


Figura 8.2 Potencial Zeta de bacterias de *L. plantarum* y esporas de *Aspergillus carbonarius* en función del pH.

La carga superficial de las esporas fúngicas y BAL, fueron ambas negativas, el pH del sistema influye directamente en la carga y el valor del potencial Zeta de los microorganismos, es decir al aumentar el pH el valor de potencial Zeta decrece hacia valores más negativos, ubicándose en valores de -11 a -18 mV para bacterias y de 0 a -10 mV para esporas fúngicas, investigadores como Jucker (1996); Van Loosdrecht (1987); Stryer, (1981) sugieren que este comportamiento se puede deber a la desprotonación de grupos funcionales de biomoléculas

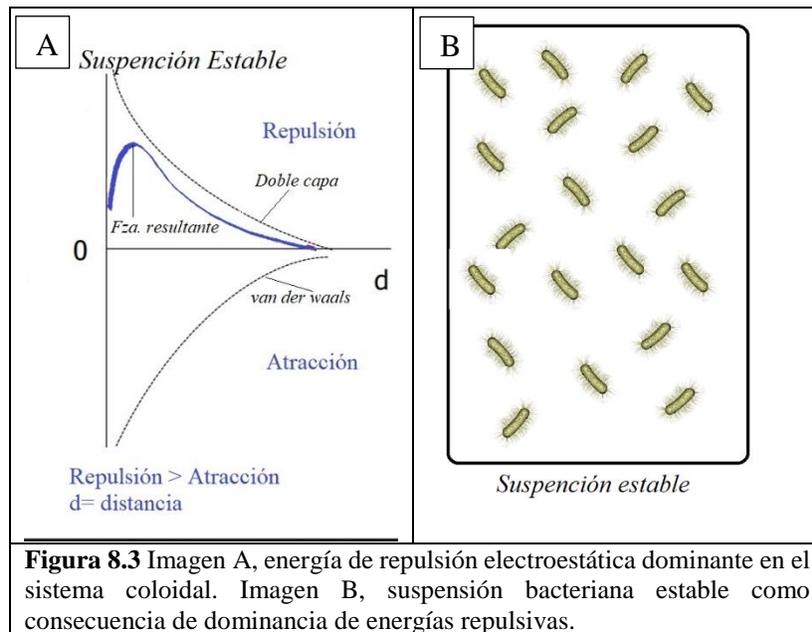
membranales superficiales, es decir, la protonación o desprotonación de grupos amino o carboxilo de proteínas superficiales están en función del pH del medio. Estos autores sugieren en particular que los pKa de lisina y arginina se ven afectados por el pH, así mismo los grupos carboxilos y fosfatos presentes en la superficie de los microorganismos, provocando que incrementen las cargas negativas y los valores se vuelvan más electronegativos en función del pH.

Estos resultados coinciden con los valores reportados para sistemas naturales, básicamente todas las superficies tienen una carga negativa neta (Busscher 1990) que también es la carga neta común de las bacterias (Jucker 1996). Se ha evaluado el potencial Zeta de más de 100 diferentes especies de bacterias entre Gram positivas y Gram negativas en función del pH y no se ha encontrado diferencias sistemáticas, por lo que se generaliza como carga negativa predominante en sistemas membranales biológicos. Autores como Schar-Zammaretti y Job Ubbink (2003); Poortinga et al. (2002), estudiaron el comportamiento de la carga superficial de diversos microorganismos entre ellos del género *Lactobacillus*, demostrando que el comportamiento del potencial Z sigue la misma tendencia que la encontrada en la Figura 8.2. De igual manera es importante señalar que varios autores han estudiado el comportamiento ácido-base de grupos funcionales en la superficie celular y se ha reportado que la disociación por influencia de pH de estos grupos ácido-base superficiales en condiciones fisiológicas generalmente da como resultado que la superficie celular bacteriana y fúngica tengan una carga negativa neta (Beveridge, 1981). La bibliografía sugiere algunas moléculas que pueden tener relación con el carácter electronegativo de las superficies celulares, estas moléculas propuestas en estudios previos sugieren que pueden ser los grupos carboxílico, fosfórico, hidroxilo y amina. Estos grupos funcionales están asociados con los ácidos peptidoglicano, teicoico y teicurónico en las superficies de las bacterias Gram-positivas y con los lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas en las superficies de las bacterias Gram-negativas (Hong y Brown, 2006).

Una vez que se ha determinado el potencial Zeta de bacterias y esporas fúngicas, y que además se cuenta con reportes en bibliografía sobre cuáles son las posibles biomoléculas responsables de generar la superficie negativa se hace uso de la teoría de estabilidad coloidal postulada por, Derjaguin, Landau, Verveij y Overbeek (DLVO), para discernir si la aglomeración de bacterias sobre la superficie de esporas fúngicas observado anteriormente

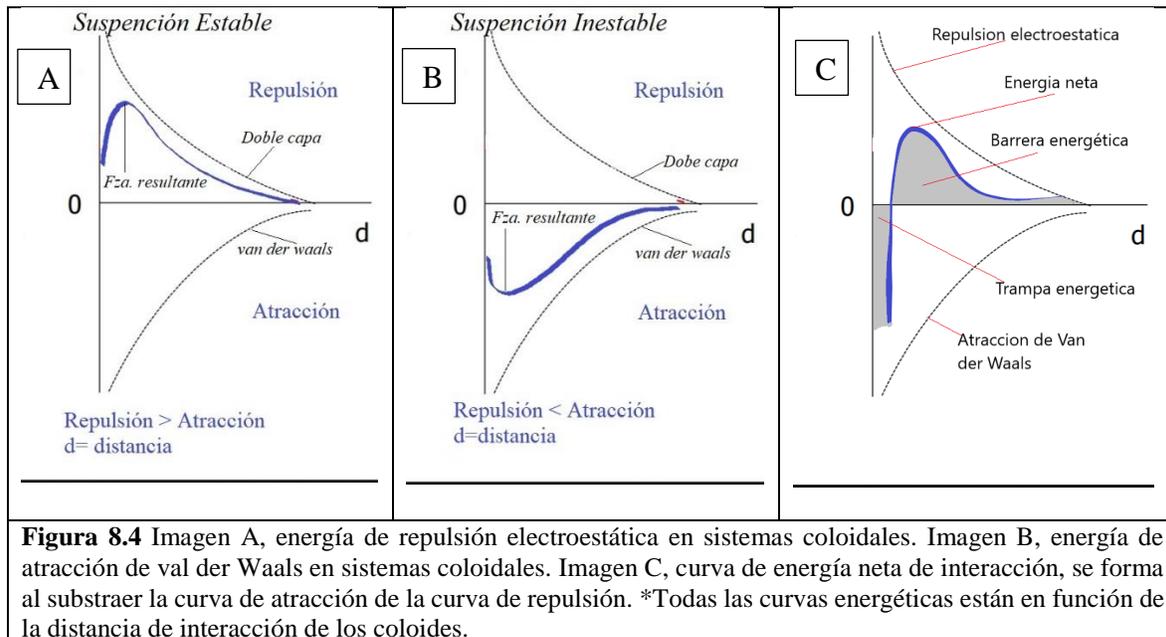
se debe a factores de índole electrostático. Esta teoría se basa en el equilibrio entre las fuerzas opuestas de repulsión electrostática y atracción tipo van der Waals y explica por qué algunos coloides se aglomeran mientras que otros no lo hacen.

Esta teoría también se utiliza para comprender la acción de las fuerzas que actúan entre las interfaces y para interpretar la deposición de partículas, en este caso de estudio se ha demostrado mediante análisis de potencial Zeta de BAL y esporas fúngicas la dominancia de cargas superficiales negativas de ambos microorganismos, por lo que al presentar cargas iguales tanto la bacteria como la spora, las fuerzas predominantes del sistema coloidal bacteria-esporas son fuerzas de repulsión electrostáticas. Cuando este perfil es fuertemente repulsivo (Figura 8.3, imagen A), las partículas se repelen entre sí y forman una suspensión estable (Figura 8.3, imagen B), es decir las partículas no pueden aglomerarse de manera natural, por lo se podría concluir es que los mecanismos de aglomeración bacteriana sobre la superficie de esporas fúngicas no puede ser explicado mediante factores inespecíficos de índole fisicoquímicos y eléctricos.



Sin embargo la teoría de estabilización de coloides utiliza curvas de energía de fuerzas repulsivas (Fig. 8.4 Imagen A) y fuerzas atractivas (Fig. 8.4 Imagen B) de un sistema coloidal, del cual dependiendo de nuestro propósito es posible disminuir o aumentar las curvas de energías repulsivas, es decir se puede inducir aglomeración o repulsión de coloides según nuestro interés. La curva combinada es llamada la energía neta de interacción. A cada

distancia el pequeño valor se resta del mayor valor para dar la energía neta. El valor neto se representa entonces arriba si es repulsivo o abajo si es atractivo Figura 8.4.



En este caso de estudio particular es de sumo interés alterar el entorno del coloide para disminuir la barrera energética y como consecuencia fomentar la aglomeración bacteriana sobre la superficie de esporas fúngicas, ya que este fenómeno de adhesión está involucrado en los mecanismos antagónicos en contra del hongo micotoxigénico y con ende en el biocontrol, para ello varios métodos pueden ser usados para este propósito, tales como cambios en la atmósfera iónica, el pH o agregando compuestos activos para afectar directamente la carga del coloide. En cada caso la medida del potencial Zeta indicará el efecto de la alteración, principalmente en su estabilidad. Para alcanzar este objetivo se utilizó un compuesto activo que afecta directamente la carga superficial de bacterias y esporas, el cual es clorhidrato de aluminio, ya que tiene la propiedad de desplazar el potencial Zeta de los coloides hacia su punto isoeléctrico (potencial Zeta=0) favoreciendo la aglomeración de coloides, siendo efectivo a concentraciones relativamente bajas.

El electrolito utilizado (clorhidrato de aluminio 0.001M) es un electrolito 3:1 y sus cationes trivalentes fácilmente desplazan el potencial Z hacia cero, más específicamente a pH4 tiene la capacidad de desplazar el PZ valores positivos con magnitudes de 22 y 16.4 mV, respectivamente (Figura 8.2). Por lo que las fuerzas atractivas dominan sobre las fuerzas

repulsivas, favoreciéndose la aglomeración de los coloides y como consecuencia se infiere podría favorecerse el biocontrol del hongo micotoxigénico. Los resultados mostrados en la Figura 8.5 demuestran el efecto de $AlCl_3$ sobre la adhesión bacteriana, observándose un incremento en la aglomeración en función del tiempo así mismo se determinó el diámetro promedio de las esporas al tiempo 5, 15, 24 h, manteniendo un diámetro constante de 8.1 lo que implica que las esporas no están en vía de germinación observándose biocontrol al menos durante 24h.

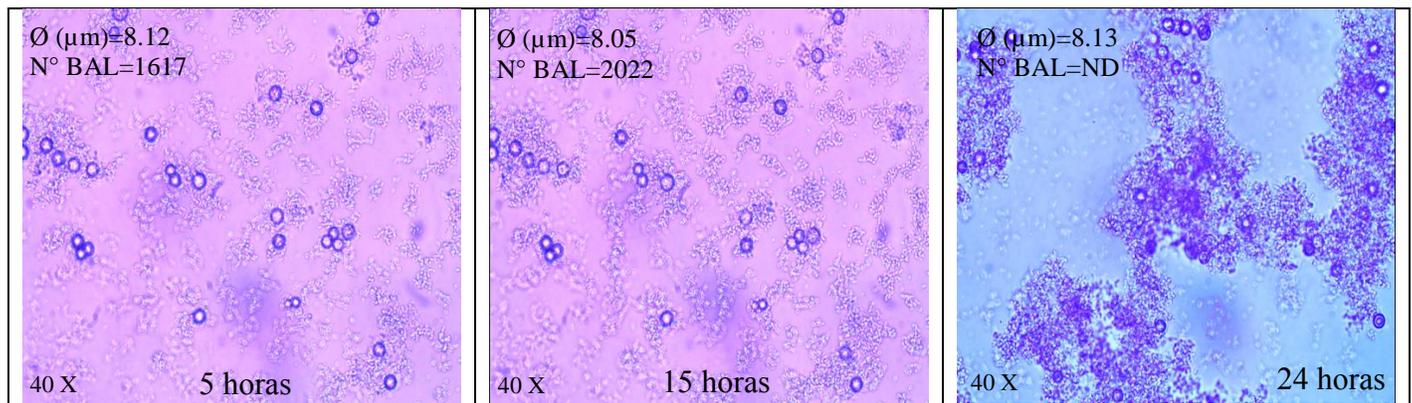


Figura 8.5 Efecto de $AlCl_3$ 0.01M sobre la aglomeración bacteriana en la superficie de esporas fúngicas y su efecto de biocontrol a través del tiempo. ND= No determinado. * El conteo bacteriano y la determinación del diámetro de esporas se describen en el Anexo D.

8.4.2. Estudio de rugosidad en microscopia de fuerzas atómicas (MFA) de superficie de esporas fúngicas y efecto sobre adhesión bacteriana

La rugosidad y topografía es una propiedad fisicoquímica ligada a la adhesión bacteriana sobre superficies. Se realizó un estudio de estas propiedades sobre la superficie de esporas fúngicas llevado a cabo en microscopia de fuerza atómica (MFA).

Estudios de Scheuerman et al. (1998) y Quiryne et al. (1993) han destacado una relación particularmente fuerte entre la adhesión bacteriana y la rugosidad de la superficie.

Las micrografías A, B, C mostrados en la Figura 8.6 representan la reconstrucción tridimensional topográfica de la superficie de las esporas fúngicas.

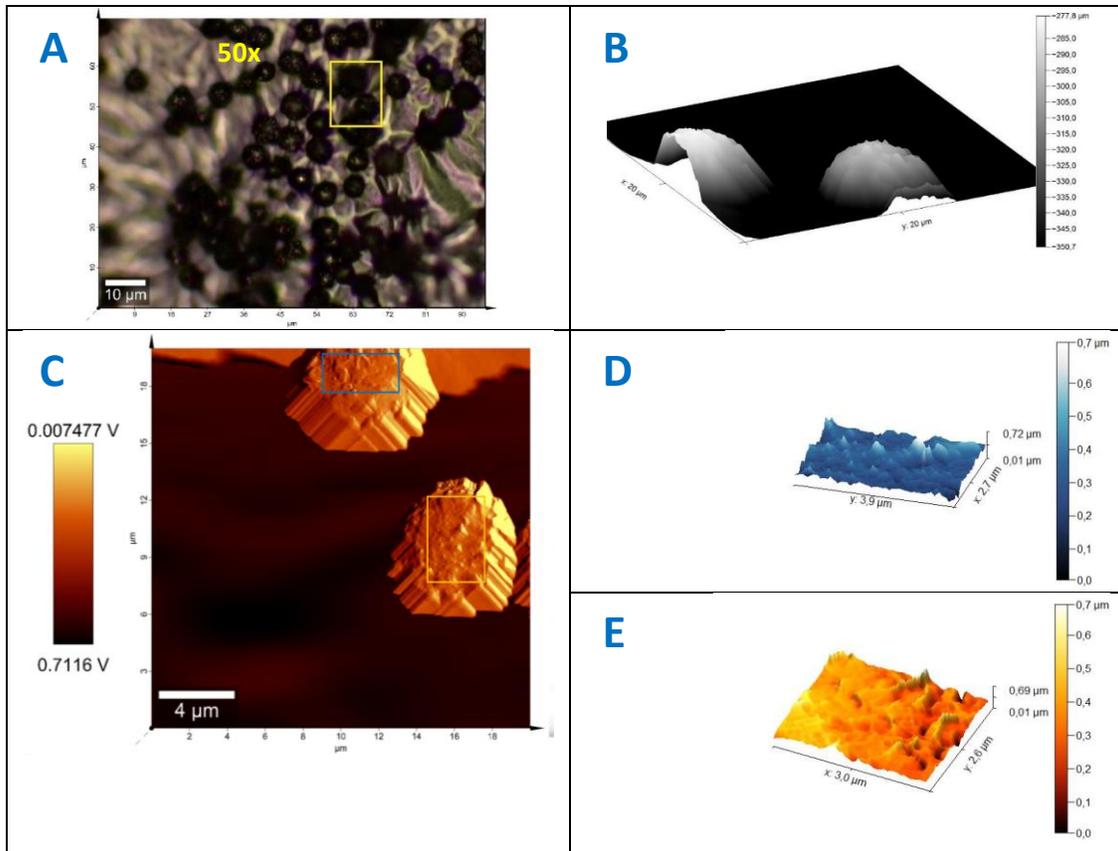


Figura 8.6 Micrografía A, vista superior de esporas fúngicas en microscopia óptica de MFA; Micrografía B, reconstrucción tridimensional topográfica de la superficie de esporas fúngicas. Micrografía C, selección de área rectangular a escanear en modo tapping MFA sobre la superficie de esporas fúngicas; Micrografías D,E, resultado de escaneo modo tapping MFA y su reconstrucción topográfica respectiva a profundidad y altura de valles en µm.

Las figuras D y E representan el área topográfica estudiada mediante MFA modo tapping, de las cuales se realiza la cuantificación de rugosidad utilizando el método más común basado en el registro de perfiles de alturas. El tratamiento estadístico de estos datos permitió determinar los parámetros de rugosidad (R_{rms}) y rugosidad promedio (R_a). Estos parámetros son definidos como:

R_a : es el promedio aritmético de los valores absolutos de las alturas $Y(x)$ y L es la longitud del muestreo

$$R_a = \frac{1}{L} \int_0^L |y(x)| dx$$

R_{rms} : representa el promedio de las desviaciones cuadráticas respecto a la altura media

$$R_{rms} = \sqrt{\frac{1}{L} \int_0^L [y(x)]^2 dx}$$

La Tabla 8.1, muestra los valores de rugosidad determinados en MFA sobre la superficie de las esporas fúngicas.

Tabla 8.1 Rugosidad superficial de esporas de *Aspergillus carbonarius*

Rugosidad	<i>A. carbonarius</i> $f(x)=4\mu m^2$
Rrms μm	0.136 \pm 0.041
Ra μm	0.097 \pm 0.031

x=distancia de escaneo superficial

De acuerdo a la norma DIN 4769 la rugosidad encontrada en esporas fúngicas se puede clasificar como grado N3/N12, estos grados de rugosidad se crearon para una mayor facilidad de especificación y control en los materiales, y está en función del valor de Ra en μm por ser el parámetro utilizado mayoritariamente en todo el mundo.

Este valor de rugosidad de las superficie de esporas se considera bajo-medio (Ra=0.066-0.128 μm), es decir 25-33% rugoso comparado con el material que es considerado en la norma como valor máximo, por lo que se plantea que la rugosidad presentada sobre la superficie de las esporas si puede llegar a influir en la adhesión bacteriana ya que las superficies que presentan algún grado de rugosidad exhiben condiciones como depresiones o valles superficiales, que pueden proporcionar sitios más favorables para la colonización bacteriana. Sin embargo por considerarse una rugosidad media-baja, podría no ser un factor que relacione en gran medida la capacidad bacteriana para adherirse sobre la superficie de las esporas fúngicas.

Algunos informes anteriores han demostrado que la adhesión bacteriana *in vivo* se ve favorecida solamente si la rugosidad superficial Ra es superior a 0.2 μm (200 nm) (Quirynen et al.1995; Bollen et al.1997), por lo que si analizamos el valor de la rugosidad de esporas fúngicas (Ra=0.05-0.15 μm) se encuentra por debajo de 0.2 μm , lo que implica que no debería influir de manera positiva sobre la adhesión bacteriana. Sin embargo, Lee et al. (2011) informaron en un estudio *in vitro*, que la cantidad total de bacterias adheridas sobre la superficie de una resina con valor de rugosidad Ra = 0.179 μm fue significativamente mayor que la adhesión presentada en material titanio con rugosidad característica de Ra = 0.059 μm

o zirconia con rugosidad de $Ra = 0.064 \mu\text{m}$ (valores de $Ra < 0.2 \mu\text{m}$) con base en esto, estos autores relacionan que a mayor rugosidad mayor adherencia bacteriana. Así mismo Madeiros et al. (2016) coincide con esta premisa ya que demostraron que una reducción en la rugosidad de la superficie estaba directamente relacionada con una disminución en la adhesión bacteriana.

Sin embargo, todavía no se ha obtenido un consenso general en la literatura con respecto al nivel mínimo de rugosidad requerido para la adhesión bacteriana. Por lo que de manera particular para este estudio y ya mencionado anteriormente se plantea que la rugosidad encontrada para esporas fúngicas si puede influir en la adhesión bacteriana sin embargo se piensa que puede no ser una variable que relacione de manera directa la adhesión bacteriana sobre la superficie de las esporas.

8.4.3. *Evaluación de lípidos y polisacáridos superficiales con ayuda de la microscopía de barrido laser confocal (CLSM) como biomoléculas responsables de adhesión superficial bacteria láctica - espora fúngica*

Además de estudiar las propiedades fisicoquímicas que pueden influir en la adhesión bacteriana sobre superficies, es importante ampliar el estudio hacia las propiedades inherentes de la célula como lo son las biomoléculas superficiales. Estas biomoléculas pueden estar fuertemente relacionadas en la adhesión irreversible presentada por las bacterias.

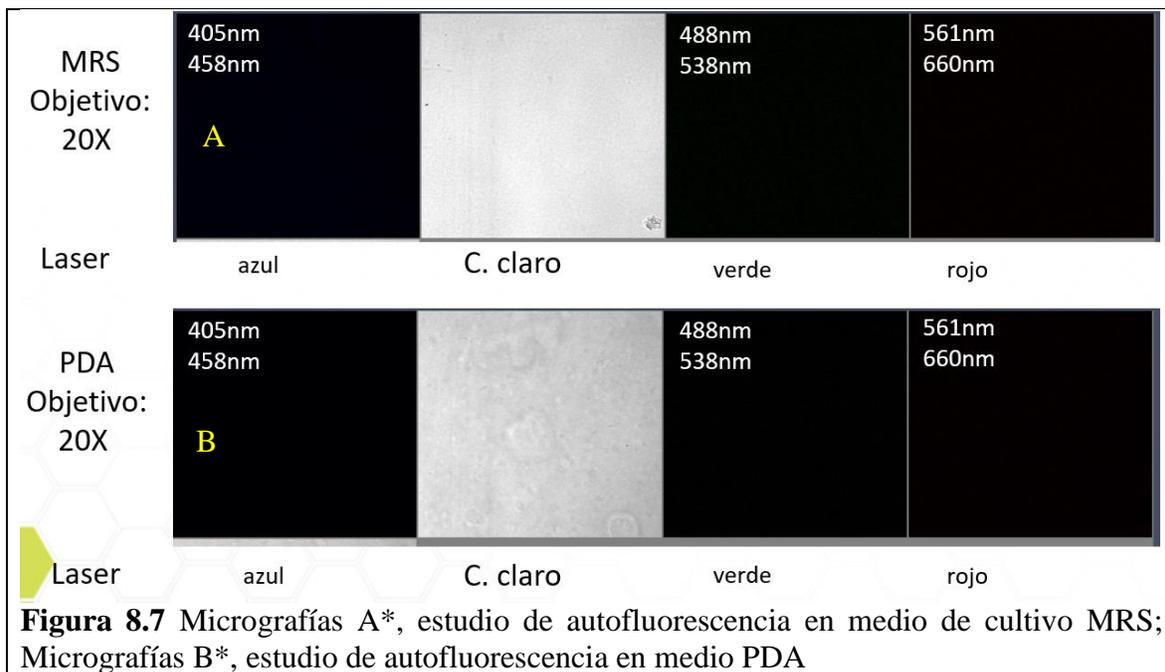
Hoy en día la adhesión bacteriana es un proceso considerado altamente complejo, influenciado por varios factores microambientales, como pH, temperatura, hidrofobicidad entre otros (Moraes et al.2013). Sin embargo, es menester estudiar las propiedades y características de las células en cuestión ya que estas podrían influir en mayor medida en los procesos adhesivos bacterianos. Para ello en esta sección se buscó realizar un estudio de co-localización mediante microscopia de barrido laser confocal, con la finalidad de relacionar la co-localización de fluorescencia asociada a lípidos y/o polisacáridos superficiales en la adhesión superficial entre ambos microorganismos.

Como primer paso se realizó la evaluación del fenómeno de autofluorescencia de los materiales a utilizar (medios de cultivo, materiales analíticos-ópticos y por último

microorganismos), la Figura 8.7 muestra las micrografías características al estudio de autofluorescencia en medios de cultivo MRS y PDA, llevado a cabo en microscopia de barrido laser confocal.

Utilizando 3 longitudes de onda de excitación (405, 488, 561 nm) y analizando 3 longitudes de onda de emisión (458, 538, 660 nm) se determinó como ausente el fenómeno de autofluorescencia en medios de cultivo, observándose un fondo oscuro sobre las micrografías donde se esperaría fluorescencia azul, verde o roja. Las micrografías etiquetadas como “C. claro” representan la visualización del campo enfocado en modo óptico o campo claro del microscopio confocal, las cuales dan evidencia de ausencia de contaminación microbiana sobre los medios de cultivo evaluados y el mantenimiento en foco del plano estudiado.

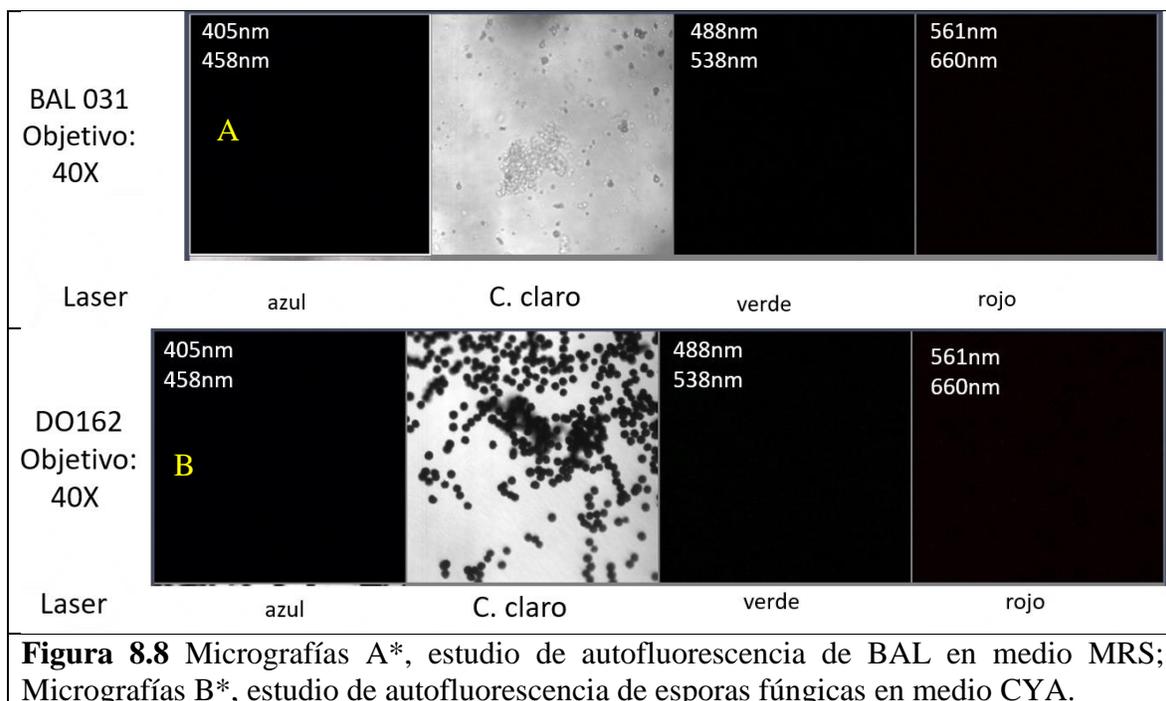
La ausencia de autofluorescencia implica que los medios de cultivo evaluados no contienen fluoróforos, fluorocromos o algún otro mecanismo que pueda emitir fluorescencia al menos en estas longitudes de onda evaluadas y como consecuencia no pueden interferir con los estudios de co-localización planteados para esta sección.



Posteriormente, se evaluaron BAL (*Lactobacillus plantarum*) y esporas fúngicas (*Aspergillus carbonarius*), en medio líquido MRS y CYA, respectivamente, los resultados mostrados en la Figura 8.8, dan evidencia de no autofluorescencia por parte de los microorganismos,

observándose fondo oscuro en las micrografías respectivas a las longitudes de emisión de 458, 538, 660 (azul, verde, rojo). Mientras que en las micrografías en campo claro, demuestran el enfoque de bacterias lácticas y esporas fúngicas a un aumento de 40X.

Por otra parte el hecho de que los microorganismos no emitan fluorescencia a estas longitudes de onda evaluadas, abre la posibilidad de inducir fluorescencia sobre biomoléculas de interés particular, lo que permite seleccionar abiertamente trazadores comerciales fluorescentes bajo estas longitudes de excitación/emisión, permitiendo realizar estudios en microscopía confocal de biomoléculas sin la presencia de fluorescencia interferente.



En seguida y una vez demostrada la no autofluorescencia de los materiales y microorganismos, se procedió a la selección de trazadores fluorescentes, optando por la utilización de trazadores fluorescentes lipofílicos, como lo fue DIL para inducir fluorescencia sobre lípidos superficiales de bacterias, y DID para inducir fluorescencia sobre lípidos de esporas fúngicas ambos con longitudes de excitación y emisión diferentes (514/603, 633/693 respectivamente). Esto permitió observar mediante fluorescencia las zonas superficiales de las bacterias y esporas que contenían lípidos. Las micrografías presentadas en la Figura 8.9 muestran la fluorescencia en color rojo de lípidos ubicados sobre la superficie de esporas fúngicas.

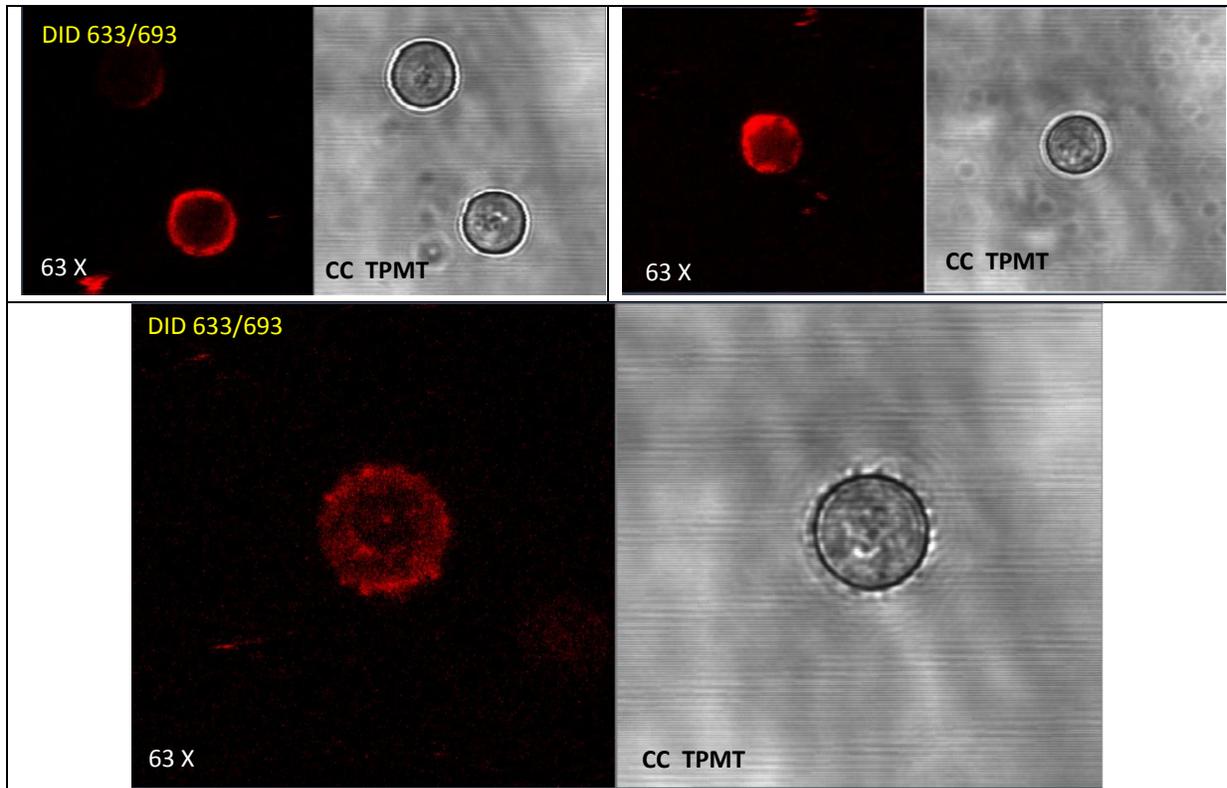


Figura 8.9 Micrografías de fluorescencia de lípidos superficiales de esporas fúngicas, inducida mediante el trazador fluorescente DID

La Figura 8.10 muestra la fluorescencia en color amarillo de lípidos superficiales en bacterias lácticas, es importante notar que algunas bacterias enfocadas en el plano focal, no emiten fluorescencia, esto se puede deber a varios factores, entre ellos el movimiento de las bacterias, ya que se encuentran en medio líquido, esto provoca que las bacterias entren y salgan de foco por el movimiento aunado al líquido. Entre otros factores también se podría deber a la pérdida de fluorescencia de los trazadores en función del tiempo de análisis o por su carácter fotosensible. Incluso se puede pensar en que el método de trazado planteado no fue el adecuado

Como funcionamiento básico del CLSM se basa en enfocar un punto particular de la muestra a estudiar (foco), y eliminar la luz (fluorescencia) proveniente de otras partes de la muestra que estén fuera de foco, por lo que la fluorescencia de las partes de la muestra que estén fuera de foco no será detectada (Lichtman, 1994).

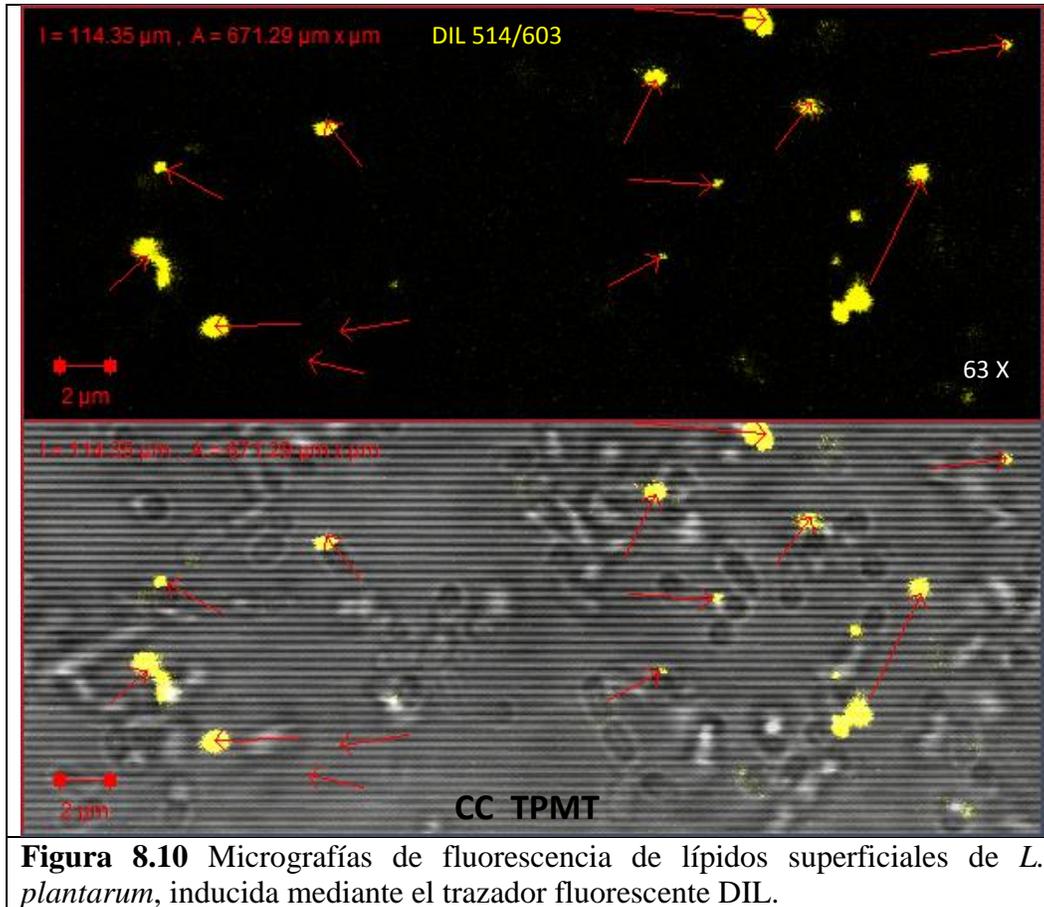
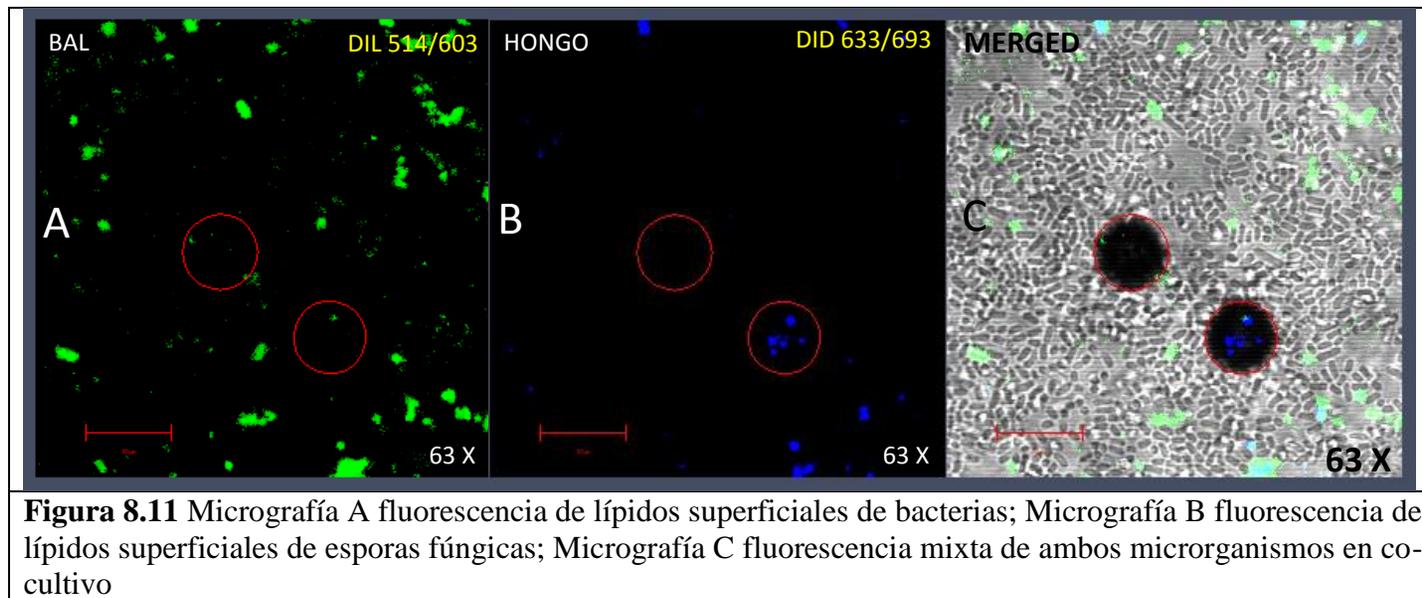


Figura 8.10 Micrografías de fluorescencia de lípidos superficiales de *L. plantarum*, inducida mediante el trazador fluorescente DIL.

Cabe destacar que por la naturaleza y la finalidad por la cual fueron creados estos trazadores fluorescentes (DID y DIL) y a pesar de no lograrse un trazado fluorescente homogéneo se pueden considerar como resultados relevantes ya que estos trazadores no fueron diseñados ni existe algún protocolo recomendado por el fabricante para su uso en organismos inferiores (procariontes) como bacterias o estructuras de supervivencia como esporas, por lo que plantear una metodología que permita inducir fluorescencia sobre estos dos microorganismos nos proporciona una alternativa económica, segura, y de fácil acceso en el mercado para estudios posteriores, respecto a otros trazadores específicos encontrados en el mercado, que además de ser difíciles de conseguir, sus costos son elevados, e incluso algunas moléculas pueden presentar toxicidad. Pese a estos problemas de trazado fluorescente no homogéneo se realizó un estudio de co-localización en microscopía confocal. Para ello se utilizó un co-cultivo en medio líquido entre BAL y esporas fúngicas, ambas trazadas con fluorescencia mediante DIL y DID respectivamente.

La Figura 8.11 muestra la fluorescencia del co-cultivo de ambos microorganismos, la micrografía A presenta en color verde la fluorescencia de lípidos superficiales de bacterias. La micrografía B presenta en azul la fluorescencia de lípidos superficiales de las esporas fúngicas; la micrografía C presenta la combinación de las dos fluorescencias anteriores, y es en donde se pretende realizar el estudio de co-localización, sin embargo como se observa en los resultados de la figura siguiente, no se logró un trazado homogéneo tanto de las esporas como las bacterias, lo cual imposibilitó la realización del estudio de co-localización para el estudio de lípidos superficiales.



Procediendo de la misma manera se estudiaron polisacáridos superficiales de bacterias y esporas fúngicas como posibles biomoléculas responsables de la adhesión, para ello se utilizaron lecitinas de trigo, o “aglutinina del germen de trigo” (WGA, por sus siglas en inglés) conjugadas con anticuerpos secundarios del tipo Alexa 488 para bacterias y Alexa 594 para esporas fúngicas, la Figura 8.12 presenta la fluorescencia debida a polisacáridos superficiales de bacterias. La primera micrografía etiquetada como “DAPI 405/450” muestra un fondo oscuro, lo que implica que no existe fluorescencia por núcleos o alguna otra molécula bacteriana que emita fluorescencia a esas longitudes de onda, la siguiente micrografía “Alexa 488. 488/526” representa la fluorescencia en color blanco de polisacáridos de la bacteria inducidos mediante WGA-Alexa 488. La micrografía etiquetada como “Alexa 594. 561/646” demuestra ausencia de fluorescencia de bacterias a esa longitud de onda, lo cual brinda la posibilidad de estudiar polisacáridos fúngicos a esas longitudes de onda sin tener fluorescencia interferente. La última micrografía etiquetada como “MERGED” permite observar de manera conjunta la fluorescencia de polisacáridos y las estructuras bacterianas en modo campo claro, esta última micrografía muestra un trazado débil y no homogéneo sobre la superficie bacteriana, lo que implica seguir optimizando el método de trazado fluorescente para bacterias.

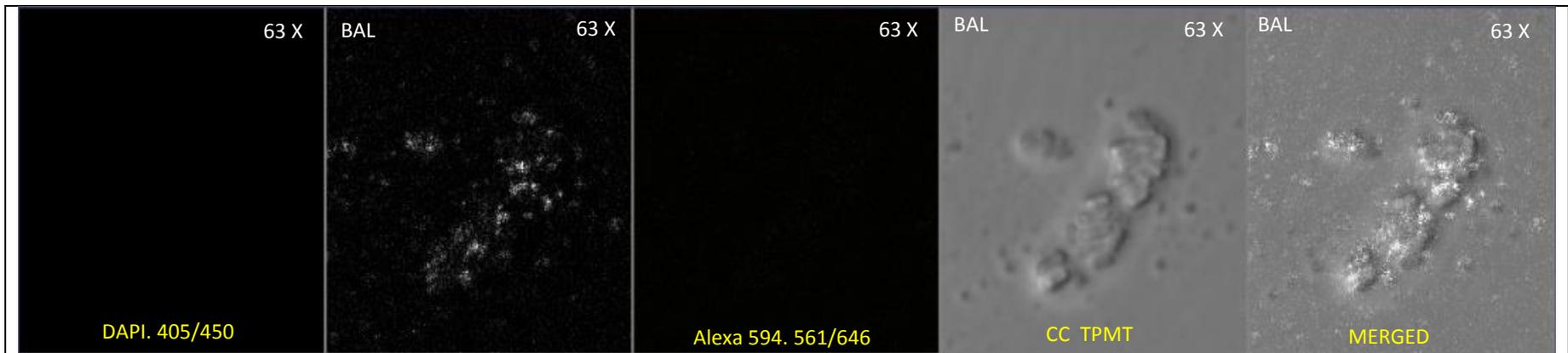


Figura 8.12 Micrografías en MC de fluorescencia de polisacáridos superficiales de bacterias lácticas, inducida mediante lectinas-Alexa 488

La Figura 8.13 muestra la fluorescencia de polisacáridos superficiales de esporas fúngicas. La primera micrografía etiquetada como “DAPI 405/450” muestra fluorescencia azul sobre la superficie de esporas, esta fluorescencia no se atribuye a polisacáridos ya que no se utilizó ningún trazador experimental que emitiera fluorescencia a esa longitud de onda. Sin embargo la bibliografía sugiere que la fluorescencia observada se puede deber a fluorescencia natural de ocratoxina A, la cual emite fluorescencia a longitudes de excitación/emisión 343/450 (Semeniuk et al.2014), por lo que fue detectada en este estudio en microscopia confocal. Por otra parte, la micrografía etiquetada como “Alexa 594. 561/646” muestra la fluorescencia de polisacáridos sobre la superficie de esporas fúngicas inducida mediante la lectina seleccionada previamente; cabe destacar que no todas las esporas presentes en la micrografía emiten fluorescencia, alrededor del 47% de ellas presenta fluorescencia y el resto no, esto implica que la técnica utilizada para inducir fluorescencia de polisacáridos sobre esporas fúngicas necesita seguir optimizándose.



Figura 8.13 Micrografías en MC de fluorescencia de polisacáridos superficiales de esporas fúngicas, inducida mediante lectinas-Alexa 594

Posteriormente se realizó un co-cultivo bacteria-espora en medio líquido en el cual se indujeron fluorescencia mediante lectinas (anteriormente descritas) las cuales actúan sobre polisacáridos superficiales de bacterias y esporas, para seguidamente realizar un estudio de co-localización.

Las micrografías C y C' de la Figura 8.14 muestran el fenómeno de adhesión bacteriana sobre las esporas fúngicas, cuyo principal interés de esta interacción consiste en encontrar fluorescencia de bacterias y esporas en la zona de contacto físico entre ambos microorganismos para dilucidar si la fluorescencia co-localiza en algún punto y esto pueda relacionar a los polisacáridos como moléculas implicadas en la adhesión entre ambos microorganismos. Sin embargo como se aprecia en las micrografías B y B' la fluorescencia es casi nula y no dan evidencia de pertenecer a bacterias, de manera similar la fluorescencia presentada en las micrografías D y D' respectivas a polisacáridos de esporas fúngicas parece no ser homogénea debido a la ausencia de fluorescencia en algunas esporas, estos hechos limitan realizar un estudio de co-localización de fluorescencia de polisacáridos por lo que se optó por reservarnos los estudios de co-localización de manera general para lípidos y para polisacáridos hasta asegurar un correcto método de trazado fluorescente sobre los microorganismos estudiados.

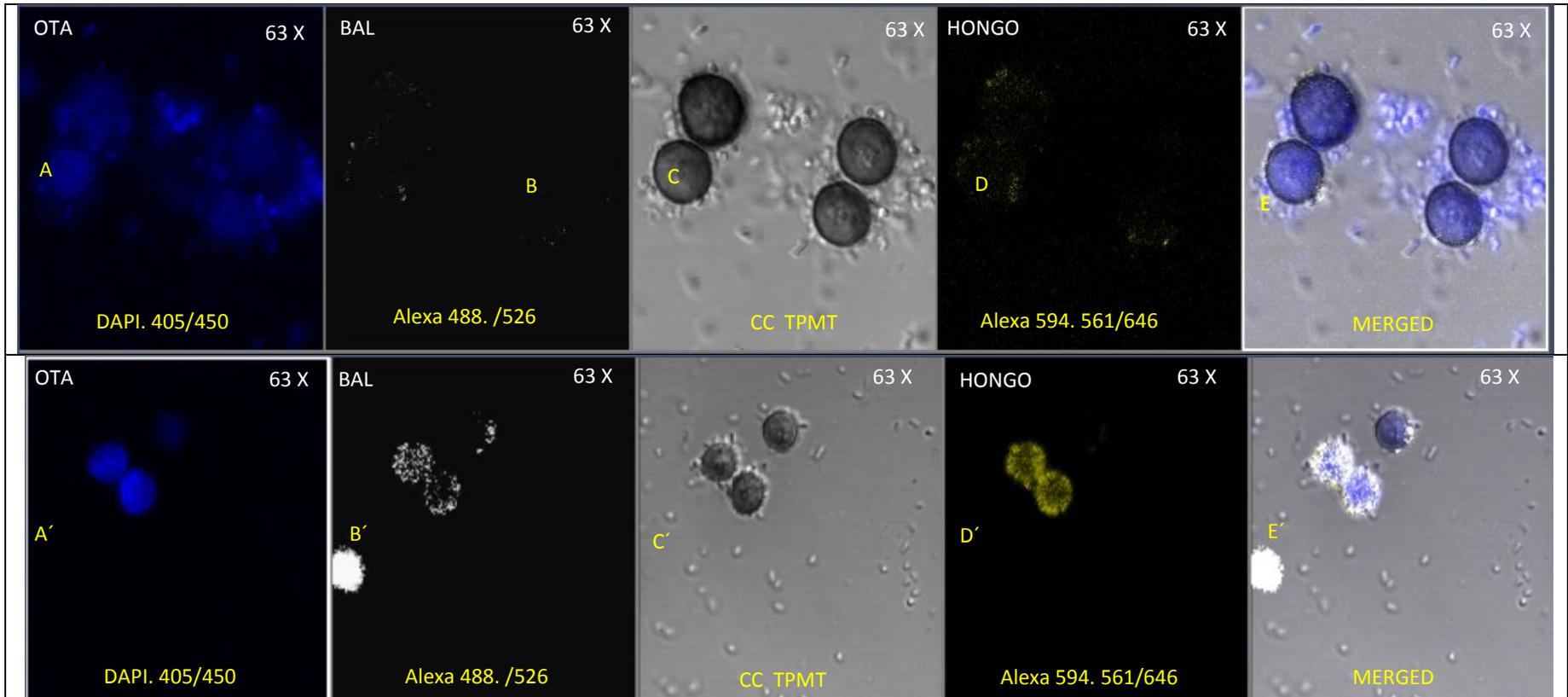


Figura 8.14 Micrografías A fluorescencia de Ocratoxina A (OTA); micrografías B fluorescencia debida a polisacáridos superficiales de bacterias lácticas; Micrografías C visualización en campo claro (CC) del co-cultivo bacterias-esporas; Micrografías D fluorescencia debida a polisacáridos superficiales de esporas fúngicas; Micrografías E visualización conjunta de los canales A,B,C,D.

8.4.4. *Determinación de enlaces químicos moleculares implicados en la adhesión bacteriana mediante espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)*

Continuando con el estudio sobre biomoléculas involucradas en la adhesión entre bacterias y esporas fúngicas, se hace uso de espectrometría infrarroja de transformada de Fourier, para estudiar la composición superficial de ambos microorganismos y los cambios en grupos funcionales químicos ligados al fenómeno adhesivo de estos microorganismos. Como primer paso se realizó la separación de esporas por su estado de maduración, esto se llevó a cabo mediante sedimentación isopícnica. La Figura 8.15 muestra la formación de dos bandas de esporas, la parte alta corresponde a esporas cuya densidad se encuentra alrededor de 0-0.14g/ml, mientras que las esporas etiquetadas como parte baja poseen densidades alrededor de 0.7-0.89 g/ml. por otra parte no se determinó experimentalmente la viscosidad a la cual se encuentran las bandas formadas con esporas, pero autores como Dijksterhuis, Nijssse, Hoekstra y Golovina (2007) demostraron mediante LTSEM (low-temperature scanning electron microscopy) la alta viscosidad citoplasmática de esporas de *Talaromyces macrosporusson* en estado de dormancia reportándose alrededor de 15 cP, sin embargo cuando las esporas se encuentran en vías germinativas se reduce significativamente la viscosidad citoplasmática hasta un valor de 2 cP.

Se sugiere con base en la literatura que las esporas encontradas en la banda superior, etiquetada como “parte alta” sean esporas en vías germinativas, mientras que las esporas que se encuentran en la banda inferior “parte baja” pertenezcan a esporas en estado de dormancia. Autores como Prenti, Polf y Clegg (1971) llegan a la misma conclusión ya que mediante sedimentación isopícnica de esporas de *B. subtilis* determinan que las esporas en vías germinativas presentan menor densidad que las esporas en estado de dormancia. Por lo que se podría decir que las esporas en estado de dormancia presentan mayor densidad y mayor viscosidad citoplasmática, por el contrario, las esporas en vías de germinación presentan menor densidad y menor viscosidad citoplasmática.

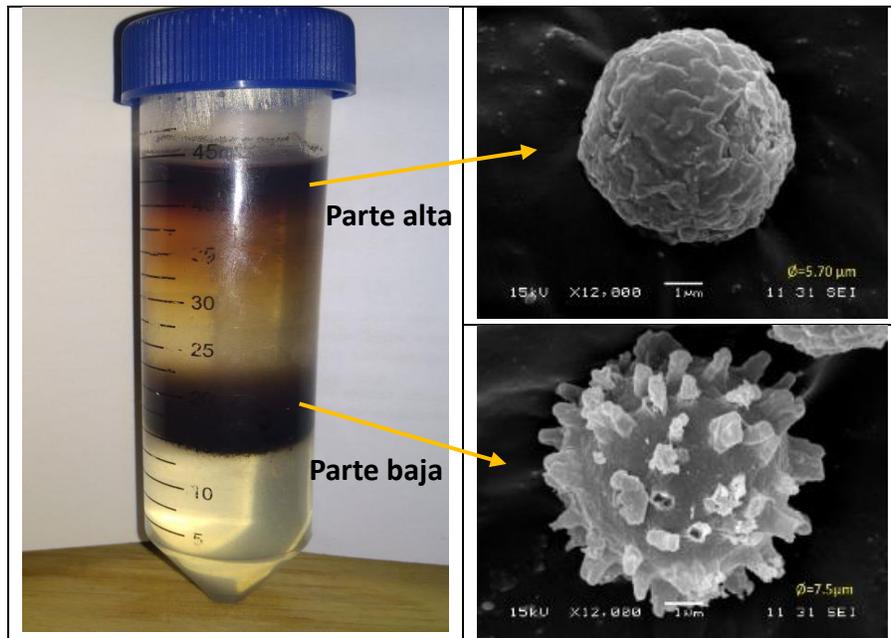


Figura 8.15 Sedimentación isopícnica de dos diferentes estados de maduración de esporas fúngicas.

Para apoyar estas consideraciones se realizó una evaluación morfológica en microscopia óptica de las esporas ubicadas en las banda superior de la separación isopícnica (menor densidad) y de la banda inferior (mayor densidad).

Las micrografías A, mostradas en la Figura 8.16 muestran la morfología de las esporas pertenecientes a la parte alta de la separación isopícnica en el cual se encuentran esporas sin espículas y esporas con tubo germinativo en desarrollo, mientras que la micrografía B, muestra esporas con espículas, rugosas y oscuras, cuyas morfologías están asociadas a esporas en estado de dormancia como se describió en el capítulo 7, finalmente esta técnica demostró ser efectiva para separar esporas en estado de dormancia de esporas en germinación.

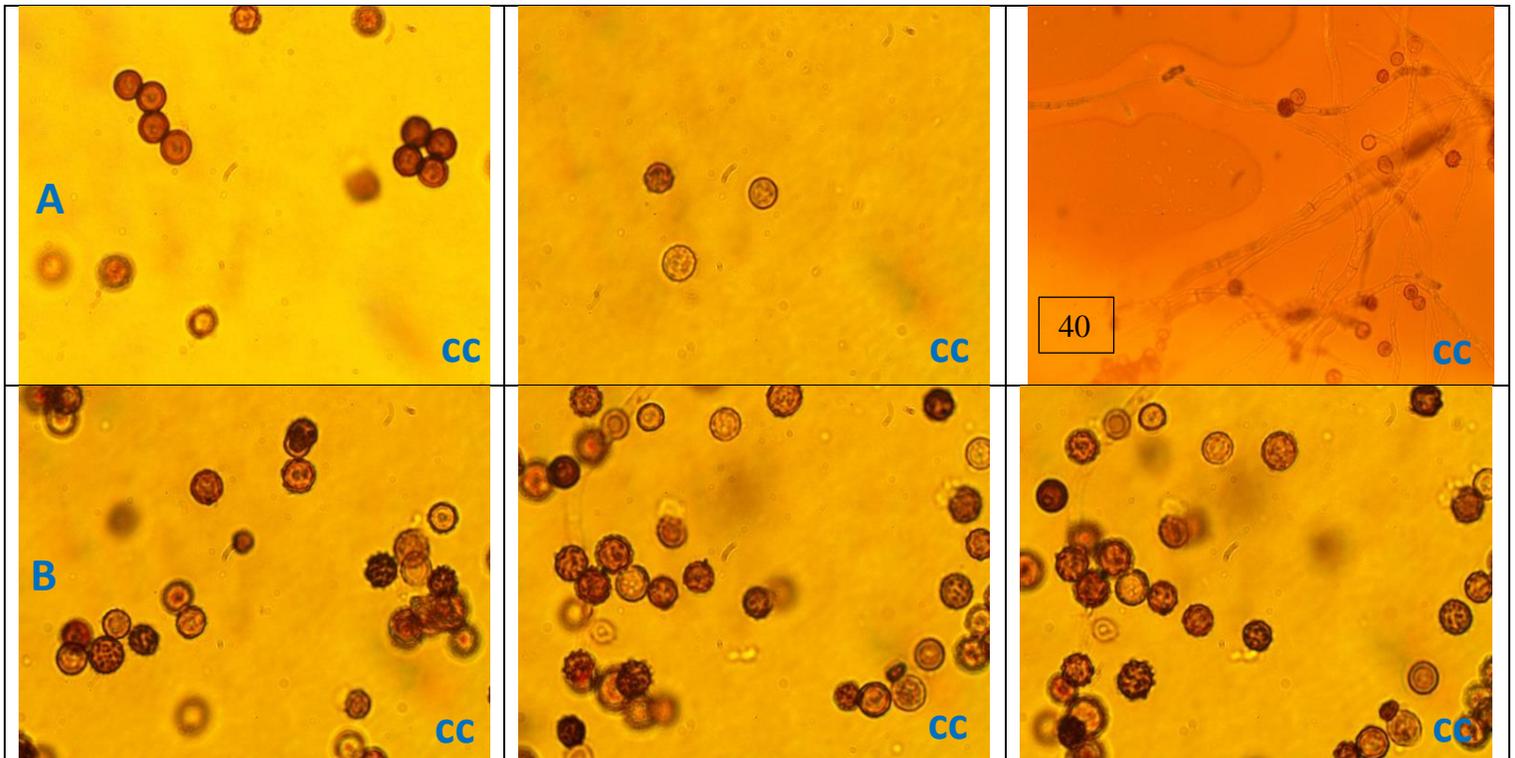


Figura 8.16 Micrografías A muestran a un aumento de 100 X y 40X de la parte Alta (PA) de sedimentación isopícnica de esporas con densidad aproximada de (0-0.14g/ml) gluc; Micrografía B muestran a un aumento de 100 X la parte baja (PB) de sedimentación isopícnica de esporas con densidad aproximada de (0.7-0.89 g/ml) gluc. *Microscopía en campo claro (CC)

Después de separar las esporas de *Aspergillus carbonarius* por su estado de maduración, se realizó un estudio de composición química superficial mediante espectrometría infrarroja de transformada de Fourier. Se demostró que no sólo existen diferencias morfológicas en esporas en estado de dormancia comparadas con esporas en vías germinativas, sino que también utilizando FTIR se encontraron diferencias en composición química. La Figura 8.17 muestra los espectros característicos de esporas en estado de dormancia (Rojas) y esporas en

vías germinativas (Azul), se presentan cambios alrededor del número de onda 3300 cm^{-1} correspondiente al modo vibracional “ $\nu\text{ OH}$ ”, respectivo a grupos funcionales del tipo OH (Socrates, 2001; Delille, 2007). Se plantea que los carbohidratos en su forma simple pueden ser las moléculas responsables de aportar estos grupos OH, además Johnston (1965) reporta que los azúcares más comunes en membranas de hongos del genero *Aspergillus* pueden ser glucosa, galactosa, manosa, arabinosa, glucosamina y en algunos casos trehalosa.

Es importante notar que la banda de absorción al número de onda 3300 cm^{-1} para esporas en estado de dormancia presenta forma puntiaguda comparada con la banda de esporas en vías germinativas (achatada), esto se puede deber a la presencia de enlaces de hidrógeno y a la formación de momentos dipolares por parte de los grupos OH presentes en la superficie de las esporas en vías germinativas. Además de estas diferencias, estudios como los de Tsukahara, (1980) sugieren un mayor contenido de carbohidratos en esporas en estado de dormancia comparado con esporas en procesos germinativos para hongos del genero *Aspergillus fumigatus*, el contenido de carbohidratos fue de 38.8% del peso seco de los conidios maduros y de 32.7% para las células en germinación.

Así mismo se aprecian diferencias en composición alrededor del número de onda $1300\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ respectivo a modos vibracionales del tipo “ $\delta\text{Cizallamiento CH}_2$, $\delta\alpha\text{ CH}_3$, $\delta\text{torsión, CH}_2$, Amida III ($\nu\text{ C-N unido a } \delta\text{ N-H}$), $\delta\text{ sCH}_3$ ” (Socrates, 2001; Delille, 2007), por lo que se deduce que las esporas en estado de dormancia presentan dos bandas de absorción que podrían ser de moléculas del tipo lipídicas y cadenas de ácidos grasos, y que no están presentes en células germinativas aunque la diferencia de espectros en esta región parece ser mínima se estipula que si existe diferencia. Este planteamiento será analizado mediante un análisis de componentes principales, con el cual se dilucidara si existe diferencia significativa entre ambos estados de maduración de las esporas.

Estudios como los de Tsukahara (1980) sugieren diferencias en la composición lipídica entre esporas en estado de dormancia y esporas en vías germinativas, reportando valores de 9.9% de lípidos en esporas en estado de dormancia y documenta una ligera disminución de la cantidad de lípidos en células vegetativas hasta un valor de 8%. Además, es probable que el mayor porcentaje de lípidos y ácidos grasos en esporas en estado de dormancia esté relacionado con la alta hidrofobicidad que presentan las esporas en estado de dormancia comparado con las esporas en vías germinativas que tienden a ser hidrofílicas. Estas

consideraciones fueron estudiadas en esta tesis evaluada mediante la técnica de ángulo de contacto, sin embargo los resultados no son mostrados. Aunado a esto investigadores como Dague, Alsteens, Latge y Dufrene (2008) realizaron un estudio en AFM, donde evaluaron la hidrofobicidad de esporas de *Aspergillus fumigatus* en estado de dormancia hasta su proceso germinativo, concluyendo que las esporas en estado de dormancia correspondía a una superficie compuesta por un 40% de grupos metilo hidrófobos. Sin embargo cuando incrementa el tiempo y comenzaba el proceso germinativo encontraron una pérdida progresiva de la hidrofobicidad, por lo que existe una relación entre la hidrofobicidad, la composición lipídica y la estructura de ácidos grasos de la membrana de esporas en estado de dormancia. Autores como Tereshina et al. (1991) estudiaron el incremento en insaturaciones lipídicas sobre la superficie del hongo *Cunninghamella japonica* y relacionan cambios en la composición de la bicapa lipídica cuando el hongo se encuentra en condiciones de estrés. Se piensa que estos cambios están involucrados en la protección de la membrana para resistir condiciones desfavorables como incremento en la temperatura; puede ser un mecanismo común llevado a cabo sobre la membrana de esporas en estado de dormancia como estructuras resistentes frente a factores desfavorables.

Por otra parte la región correspondiente al número de onda entre $1200-900\text{cm}^{-1}$ respectivo a enlaces " ν C-O, ν C-C, δ C-O-H, δ CO-C" (Socrates, 2001; Delille, 2007) y que es correspondido a polisacáridos y proteínas, es la región en la cual se encuentra mayor diferencia entre los dos estados de maduración de las esporas estudiadas; se aprecian picos de polisacáridos de esporas en estado de dormancia y que no están presentes en esporas en vías germinativas, esto se puede deber a que las esporas en estado de dormancia presentan una acumulación de polisacáridos que son necesarios para su posterior germinación como biomoléculas de reserva. Sin embargo para el caso de las proteínas se aprecia un mayor número de bandas IR en esporas en vías germinativas, autores como Tsukahara, (1980) reportan un incremento de 30 al 34% de proteína, cuantificado por el método de Lowry para esporas en estado de dormancia y en vías de germinación respectivamente, lo cual concuerda con lo encontrado en la región de infrarrojo estudiada, Tsukahara sugiere que la síntesis de proteínas en esporas en vías germinativas surge a raíz de la necesidad proteica para su crecimiento de hifas.

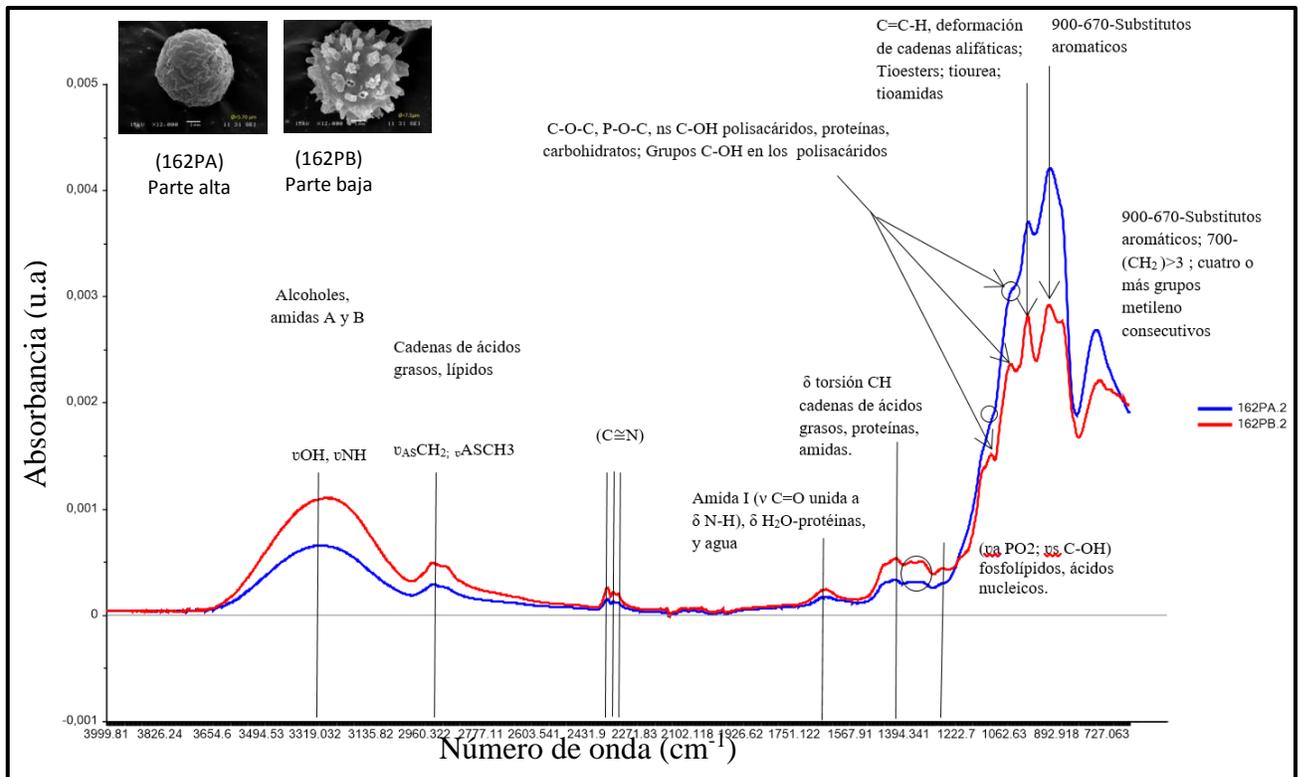


Figura 8.17 Espectrograma IR de composición química de esporas en estado de dormancia y esporas en etapa de germinación.

Con base en lo anterior es razonable pensar que las esporas en estado de dormancia contengan diferencias en las bandas de absorbancia de radiación infrarroja respectiva a moléculas como carbohidratos, lípidos y una mayor variedad de polisacáridos, ya que estas moléculas desempeñan funciones importantes como almacenamiento y reserva de nutrientes que posteriormente serán utilizados durante el proceso germinativo, incluso carbohidratos como la trehalosa proporcionan resistencia y protección frente a factores bióticos y abióticos dañinos para el hongo, en particular se ha relacionado la presencia de este disacárido como molécula de protección que incrementa su concentración cuando la célula fúngica se encuentra en estados de deshidratación extremos, como lo es durante la formación de conidios (Feofilovaa, 2011).

Continuando con el estudio de espectrometría infrarroja de transformada de Fourier se obtuvieron los espectros característicos a esporas fúngicas, bacterias lácticas, y la interacción entre bacterias y esporas fúngicas, con la finalidad de estudiar los cambios en los enlaces químicos implicados en la adhesión de ambas superficies. La Figura 8.18 muestra los

espectros de infrarrojo para esporas en estado de dormancia (azul), de bacterias lácticas (verde) y la adhesión entre ambos microorganismos (rojo).

Se pone especial atención al espectro correspondiente al co-cultivo bacteria espora ya que presenta los cambios en enlaces químicos implicados en la adhesión, del cual se aprecia un ligero cambio en los enlaces químicos presentes en el número de onda entre 2960 a 2850 (cm^{-1}) aproximadamente, cuyos estados vibracionales corresponden a los enlaces $\nu_a \text{CH}_3$, $\nu_a \text{CH}_2$, νCH terciario, $\nu_s \text{CH}_3$, $\nu_s \text{CH}_2$ (Socrates, 2001; Delille, 2007), cuyos principales compuestos "contribuyentes" o grupos funcionales pueden ser cadenas de ácidos grasos y lípidos, y que posiblemente estas moléculas estén implicadas en la adhesión entre ambos microorganismos.

Dague, Alsteens, Latge y Dufrene (2008) comprueban mediante AFM que las moléculas hidrófobas influyen en la adhesión sobre superficies, por lo que a mayor hidrofobicidad mayor adhesión, lo que implica que probablemente se ve favorecida la adhesión bacteriana sobre la superficie de las esporas fúngicas en estado de dormancia. Sin embargo se considera que la principal región en la cual se aprecian cambios respectivos al contacto entre ambos microorganismos se da alrededor del número de onda 1600-1555 cm^{-1} (enlaces amida II, $\delta \text{N-H}$ unido a $\nu \text{C-N}$, amida I, $\nu \text{C=O}$ unido a $\delta \text{N-H}$), 1400-1300 cm^{-1} ($\delta \text{C-O-H}$, $\delta_s \text{CH}_3$, δCH , $\delta_{\text{torsión}} \text{CH}_2$, $\delta_{\text{torsión}} \text{CH}_2$, Amida III ($\nu \text{C-N}$ unido a $\delta \text{N-H}$) y 1100-800 cm^{-1} ($\nu \text{C-O}$, $\nu \text{C-C}$, $\delta \text{C-O-H}$, $\delta \text{CO-C}$, $\nu_s \text{C-OH}$) (Socrates, 2001; Delille, 2007), siendo esta última región donde se presentan los principales enlaces químicos implicados en la adhesión, lo que significa que es muy probable que moléculas como polisacáridos, proteínas y carbohidratos estén implicados en la adhesión bacteriana sobre la superficie de esporas fúngicas.

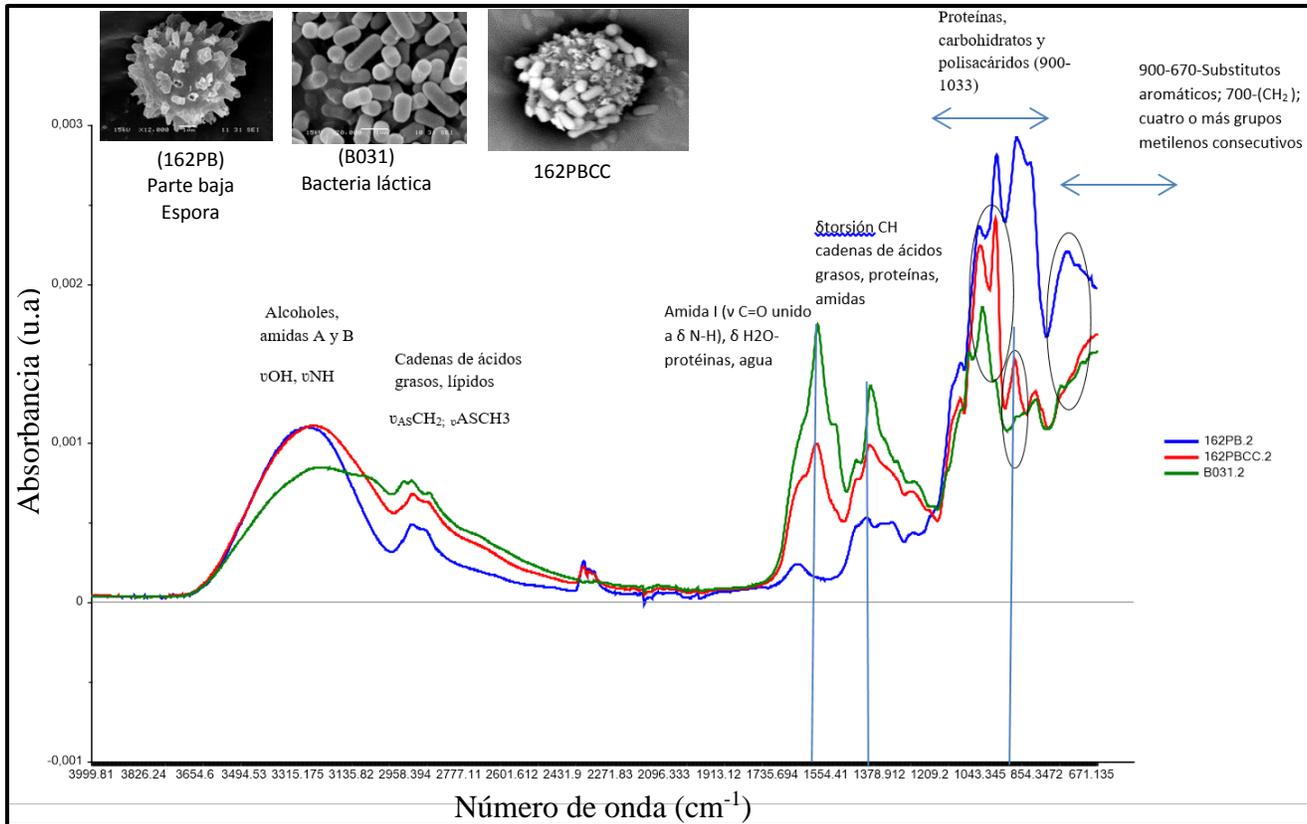


Figura 8.18 Espectrograma IR de esporas con espículas, bacterias lácticas, y bacterias adheridas sobre esporas espiculadas

De igual manera se estudió la composición química de esporas en vías germinativas, y los enlaces químicos implicados en la adhesión de bacterias, la Figura 8.19 muestra el espectro infrarrojo de las esporas en vías de germinación (azul), bacterias (verde) y la interacción (rojo). Sin embargo los espectros aparentemente no presentan cambios en enlaces químicos entre el co-cultivo bacteria-espora y los microorganismos por separado, lo que implica que la adhesión entre bacterias y esporas probablemente es baja, por lo que no se generan cambios en enlaces químicos nuevos, respectivos a biomoléculas superficiales adheridas, y como consecuencia el espectro no presenta diferencia entre los microorganismos por separado y los microorganismos adheridos. Este análisis será evaluado mediante un análisis de componentes principales para conocer si la composición química de las bacterias en estado planctónico (libre flotación) es igual a la composición química de las bacterias adheridas sobre las esporas.

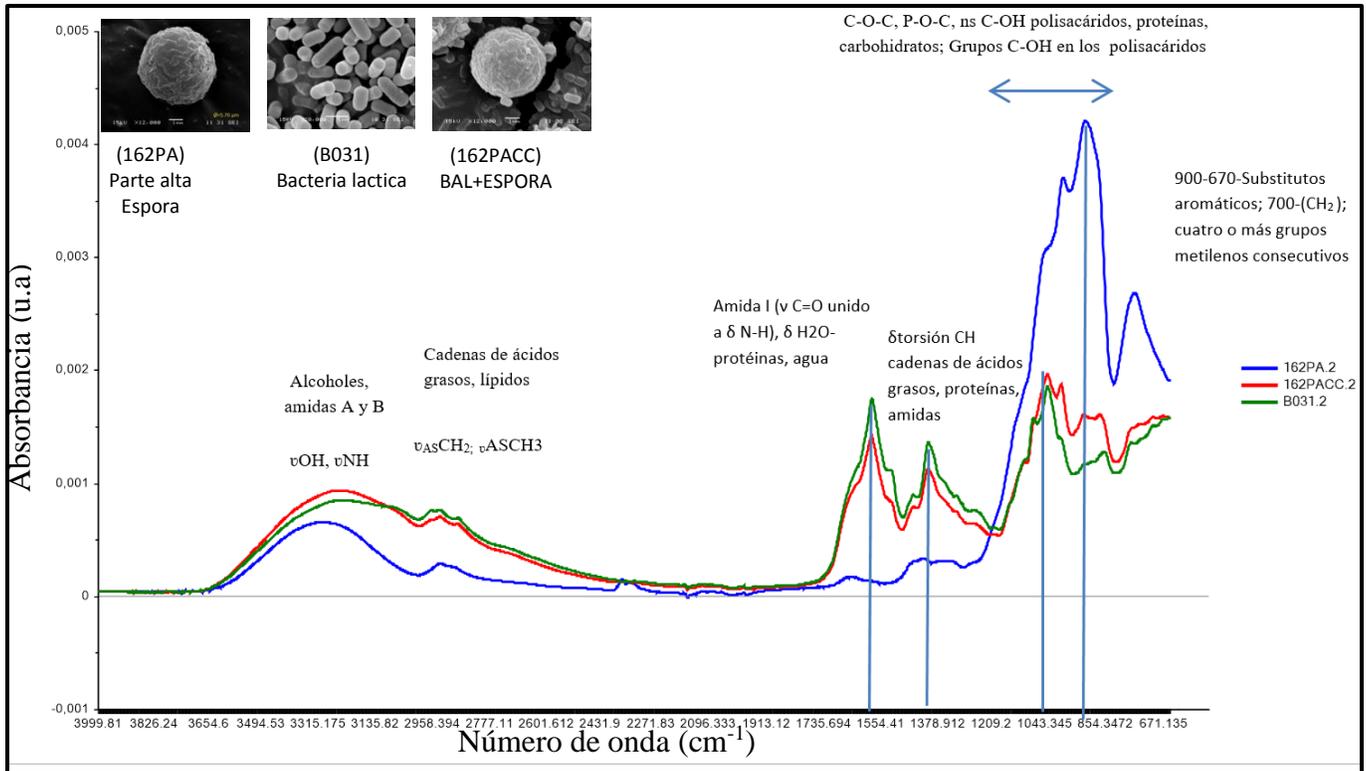


Figura 8.19 Espectrograma IR de esporas sin espículas, bacterias lácticas, y bacterias adheridas sobre esporas sin espículas fúngicas.

Por último el análisis de componentes principales o PCA por sus siglas en inglés, es una técnica que proviene del análisis exploratorio de datos, cuyo objetivo se basa en la síntesis de información “reducción de dimensiones”, en otras palabras, reducción de variables, perdiendo la menor cantidad de información posible, estas últimas variables son conocidas como componentes principales, las cuales son combinaciones lineales de las variables de partida y en general es utilizada para variables cuantitativas (Lever, Krzywinski y Altman, 2017).

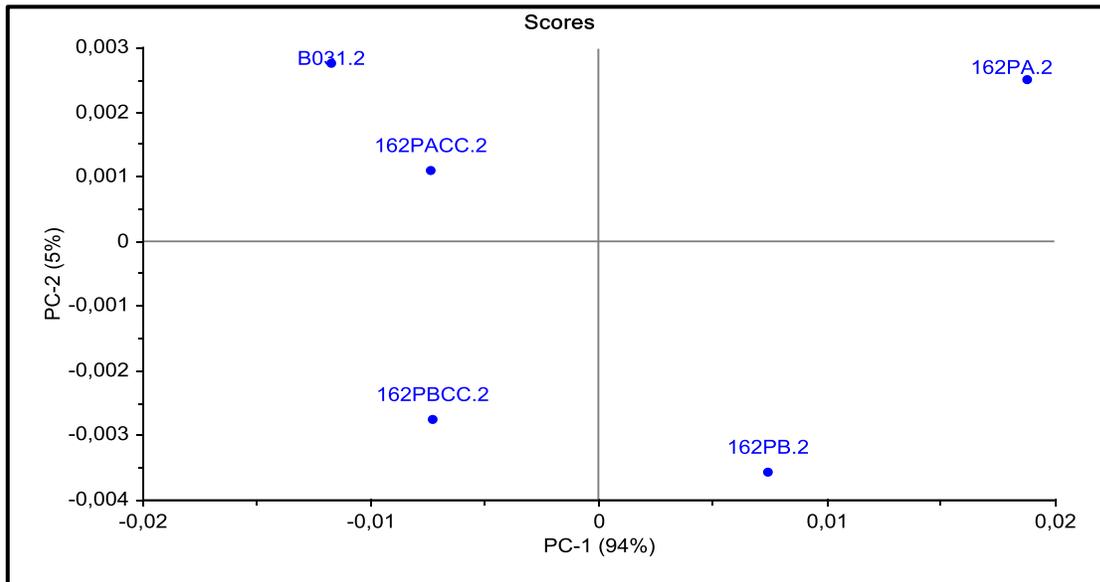


Figura 8.20 Análisis de componentes principales (PCA) de espectrogramas IR

La Figura 8.20 muestra la gráfica del plano principal para las componentes 1 y 2, ubicando en cuatro cuadrantes los grupos (clúster), entre los espectros característicos a la composición química de bacterias (B031.2), esporas en estado de dormancia (162PB.2), esporas en vías germinativas (162PA.2), y co-cultivo bacteria-esporas en estado de dormancia (162PBCC.2), co-cultivo bacterias-esporas en vías germinativas (162PACC.2).

El PCA da evidencia de existir diferencias significativas en la composición química de esporas en estado de dormancia y esporas en vías de germinación, por lo que se aprecia la variable (162PA.2) en el cuadrante superior derecho y la variable (162PB.2) en el cuadrante inferior derecho, esto implica que estas dos variables no se encuentran correlacionadas, por lo que se concluye que dependiendo del estado de maduración de las esporas se pueden encontrar tanto diferencias morfológicas (demostrado en MEB) como diferencias en composición química. Probablemente las principales moléculas responsables de esta diferenciación se deben a la presencia de carbohidratos (polisacáridos) y proteínas analizado en la Tabla 8.2.

Tabla 8.2. Análisis de espectro IR. Diferencias composicionales entre diferentes estados de maduración de esporas de *A. carbonarius*

Número de onda (cm ⁻¹)	Enlaces y modos vibracionales	Observaciones.
3300	“v OH	Los carbohidratos simples pueden ser las moléculas responsables de aportar estos grupos OH
1300-1400	δcizallamiento CH ₂ , δa CH ₃ , δtorsión, CH ₂ , Amida III (v C-N unido a δ N-H), δ sCH ₃	Las esporas en estado de dormancia presentan dos bandas de absorción que podrían ser de moléculas del tipo lipídicas y cadenas de ácidos grasos, y que no están presentes en células germinativas
1200-900	v C-O, v C-C, δ C-O-H, δ CO-C	Los enlaces pueden ser aportados por polisacáridos y proteínas. Esta es la región en la cual se encuentra mayor diferencia entre los dos estados de maduración de las esporas estudiadas, ya que se aprecian picos de polisacáridos de esporas en estado de dormancia y que no están presentes en esporas en vías germinativas.

De igual manera haciendo la comparación de los espectros característicos a la composición química de bacterias en estado planctónico (libre flotación) y bacterias adheridas sobre los dos tipos de esporas (en estado de dormancia y en vías de germinación). Se logró demostrar mediante PCA (Figura 8.20) que los enlaces químicos presentes en la interacción bacteria-espora en estado de dormancia difieren de la composición química de los microorganismos por separado, esto implica que durante la interacción o adhesión bacteriana se generan nuevos grupos funcionales químicos o incluso la composición química normal de los microorganismos de manera separada se ve modificada o alterada por la adhesión entre superficies, demostrándose como se describió anteriormente de manera particular para cada co-cultivo, que los principales grupos funcionales que presentaron cambios en el espectro infrarrojo, corresponden a carbohidratos (polisacáridos) y proteínas, por lo que es probable que estas moléculas estén implicadas en la adhesión bacteriana (Tabla 8.3).

Tabla 8.3. Análisis de espectro IR. Principales moléculas implicadas en la adhesión BAL-Espora fúngica

Número de onda (cm ⁻¹)	Enlaces y modos vibracionales	Observaciones.
2960 a 2850	enlaces ν_a CH ₃ , ν_a CH ₂ , ν CH terciario, ν_s CH ₃ , ν_s CH ₂	Los grupos funcionales pueden ser aportados por cadenas de ácidos grasos y lípidos. Posiblemente estas moléculas estén implicadas en la adhesión entre ambos microorganismos
1600-1555	enlaces amida II, δ N-H unido a ν C-N, amida I, ν C=O unido a δ N-H	Es muy probable que moléculas como polisacáridos, proteínas y carbohidratos estén implicados en la adhesión bacteriana sobre la superficie de esporas fúngicas.
1400-1300	(δ C-O-H, δ sCH ₃ , δ CH, δ torsión CH ₂ , δ torsión, CH ₂ , Amida III ν C-N unido a δ N-H	
1100-800	ν C-O, ν C-C, δ C-O-H, δ CO-C, ν_s C-OH	

Sin embargo al analizar la composición química de bacterias en estado planctónico y bacterias adheridas sobre esporas en vías germinativas, el PCA correlacionó la composición química de ambos espectros colocando las variables (B031.2) y (162PACC.2) en el mismo cuadrante (esquina superior izquierda), lo que implica que no existe diferencia significativa entre los enlaces químicos de bacterias libres y bacterias adheridas sobre esporas en vías germinativas. Este comportamiento puede ser explicado por la baja adherencia que pudiesen presentar las bacterias sobre esta superficie, ya que al no existir gran cantidad de bacterias adheridas no se detectan nuevos enlaces químicos. Este comportamiento fue observado en MEB, las micrografías mostradas en la Figura 8.21 muestra esporas en vías germinativas (sin espículas) y esporas en estado de dormancia (esporas con espículas), determinándose que existe mayor aglomeración bacteriana sobre la superficie de esporas fúngicas con espículas (aproximadamente 20 bacterias/espora) mientras que las esporas sin espículas presentan en promedio alrededor de 5 bacterias/espora, sin embargo esto solo es una premisa la cual

necesita de un estudio estadístico con un número mayor de esporas analizadas, para comprobar el comportamiento observado de las bacterias.

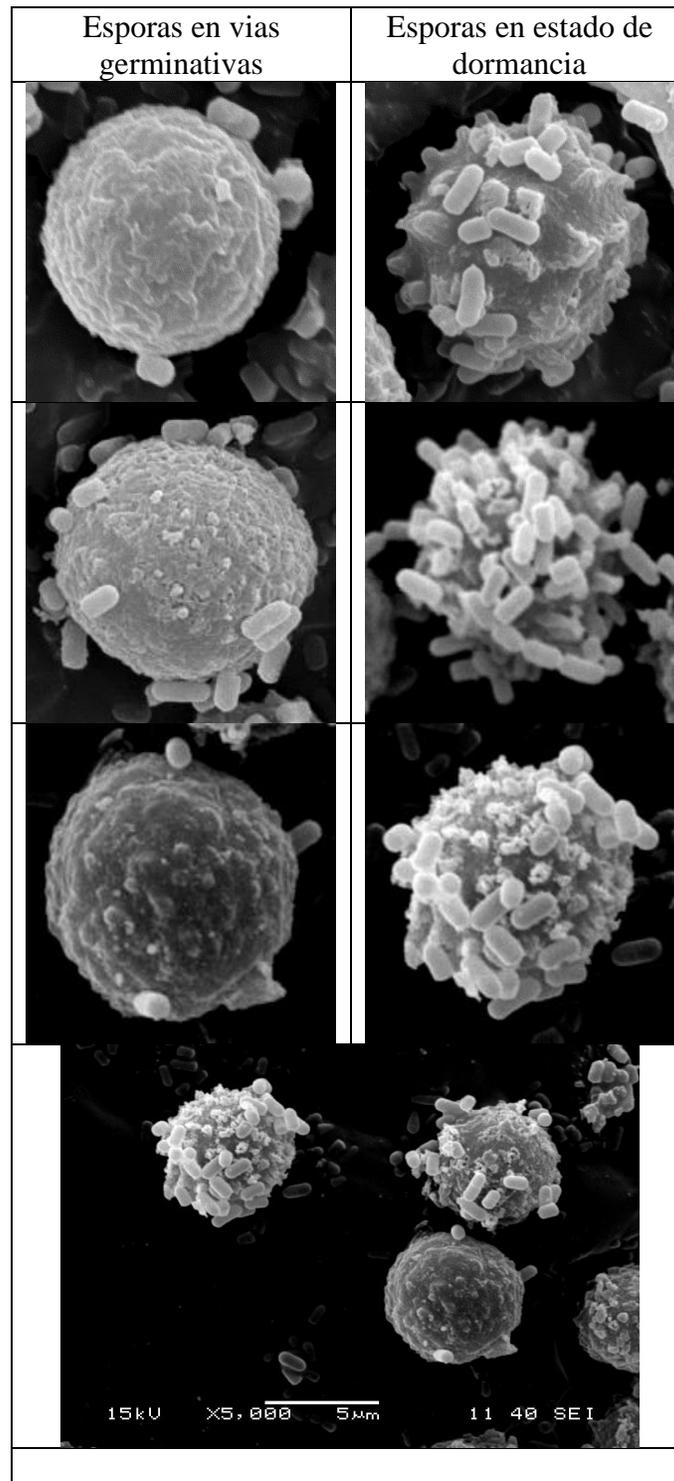


Figura 8.21 Estudio de adhesión de bacterias sobre esporas con espículas y esporas sin espículas.

8.5. Conclusiones y perspectivas

En este capítulo se estudiaron los mecanismos responsables de adhesión de bacterias sobre la superficie de esporas fúngicas, para este propósito se comenzó el estudio de índole fisicoquímico con las interacciones eléctricas de doble capa implicadas en la adhesión. Sin embargo los resultados obtenidos no dan evidencia de que las superficies de ambos microorganismos se vean atraídas mediante interacciones electroestáticas, por el contrario, se determinó que la fuerza dominante en el sistema es la fuerza de repulsión electroestática por la presencia de cargas negativas en ambos microorganismos, por lo que los microorganismos no tienden a aglomerarse. Por otra parte, considerando que es de nuestro interés fomentar el biocontrol del hongo, se utilizaron técnicas de la teoría de estabilidad coloidal para disminuir la energía de repulsión electroestática y como consecuencia fomentar la adhesión bacteriana ya que este fenómeno de adhesión está involucrado en los mecanismos antagónicos en contra del hongo micotoxigénico, para ello se logró exitosamente modificar la fuerza iónica del medio mediante el uso del electrolito AlCl_3 0.01M pH 4, comprobándose el fomento a la aglomeración mediante microscopia óptica.

Continuando con el estudio de las propiedades fisicoquímicas, se evaluó la rugosidad superficial de esporas y se determinó que no es un factor que favorezca en gran medida la adhesión bacteriana, por lo que se concluye que la adhesión bacteriana no puede ser explicada solamente por las propiedades fisicoquímicas de las superficies que están en contacto (bacteria-esporas), ya que la adhesión bacteriana a superficies es un proceso complejo, gobernado por muchos factores, es por ello que para complementar el estudio se realizó la evaluación de factores específicos de carácter adhesina-receptor.

La metodología propuesta en CLSM para el estudio de biomoléculas como lípidos y polisacáridos responsables en la adhesión, resultó complicada de estandarizar, ya que el trazado fluorescente mediante el uso de DIL, DID, WGA-ALEXA, no fue homogéneo en todas las muestras, por lo que es recomendable cambiar de trazadores o continuar el estudio de su estandarización. Pese a estos problemas se utilizó la FTIR que permite continuar con el estudio de las biomoléculas responsables en la adhesión entre bacterias y esporas fúngicas. Haciendo uso de espectrometría infrarroja de transformada de Fourier, se logró determinar que los principales cambios en enlaces químicos que ocurren durante la adhesión bacteria

espora se debe principalmente a carbohidratos (polisacáridos) y proteínas, por lo que posiblemente las bacterias se adhieren sobre la superficie de esporas fúngicas mediante receptores de naturaleza proteica y glucídica.

Perspectivas

Respecto al estudio de las interacciones eléctricas de doble capa implicadas en la adhesión, se considera relevante evaluar diversas moléculas (electrolitos, tenso activos iónicos) además del $AlCl_3$ (ya evaluado en este trabajo) y las concentraciones adecuadas que favorezcan la aglomeración bacteriana sobre la superficie de esporas fúngicas, con la finalidad de ser considerado parte de la formulación de un producto biotecnológico que fomente el biocontrol de hongos micotoxigénicos.

Por otra parte, es relevante ampliar el conocimiento sobre el efecto de la hidrofobicidad de la superficie bacteriana y fúngica en la adhesión entre ambos microorganismos, por lo cual se plantea un estudio de hidrofobicidad mediante el método MATH, ángulo de contacto, y técnicas en AFM.

Así mismo es de interés continuar con el estudio de las biomoléculas membranales implicadas en la adhesión entre bacterias-esporas fúngicas, para ello se considera de interés continuar con el estudio de co-localización de lípidos proteínas y polisacáridos en CLSM.

Por último, se considera importante verificar la persistencia en las interacciones adhesivas de bacterias sobre esporas fúngicas, después de someterse a tratamientos de degradación enzimática de lípidos, proteínas, polisacáridos, con la finalidad de discernir de manera particular que tipo de biomolécula es la responsable de la adhesión.

8.6. Referencias

- Ábalos C. (2005). Adhesión bacteriana a biomateriales. *Av. Odontoestomatol*, 21(1): 347-353.
- An, Y.H., Friedman, R.J. (1997). Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *Journal of Microbiological Methods*, 30: 141–152.
- Anselme, K., Davidson, P., Popa, A., Giazzon, M., Liley, M., Ploux, L. (2010). The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale. *Acta Biomaterialia*. 6(10):3824-46. doi: 10.1016/j.actbio.2010.04.001.
- Avall- Jaaskelainen, S. y Palva, A. (2005). *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 511- 529.
- Beveridge, T.J. (1981). Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall. *International Review of Cytology*. 72:229-317.
- Busscher, H.J., Bellon-Fontaine, M.N., Mozes, N., van der Mei, H.C., Sjollema, J., Cerf, O., Rouxhet, P.G. (1990). A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 17(1):93-106.
- Busscher, H.J., Bos, H.C. van der Mei, y Handley, P.S. (2000). Physicochemistry of microbial adhesion from an overall approach to the limits. In *Physical Chemistry of Biological Interfaces*. A. Baszkin, and W. Norde, editors. Marcel Dekker, New York.M 431–458.
- Busscher, H.J., Weerkamp, A.H., van der Mei, H.C., van Pelt, A.W.J., De Jong, H.P., Arends, J. (1984). Measurements of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 980–983.
- C.E. ZoBell. (1943). The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *Journal of Bacteriology*, 46(1): 39–56.
- Caldwell, D.E., Germida, J.J. (1985). Evaluation of difference imagery for visualizing and quantitating microbial growth. *Canadian Journal of Microbiology*, 31: 35–44.
- Dague, E., Alsteens, D., Latge, JP. y Yves F. Dufrene. (2008). High-Resolution Cell Surface Dynamics of Germinating *Aspergillus fumigatus* Conidia. *Biophysical Journal*, 94: 656-660
- Delille A. (2007). Etude *in situ*, par spectroscopie infrarouge en mode ATR, des premières étapes de la formation d'un biofilm de *Pseudomonas fluorescens* et de sa réponse aux variations de la quantité de carbone organique dissous : application à la détection précoce du changement de la qualité microbiologique d'une eau de distribution. Tesis de doctorado. Université Henri Poincaré Nancy I. Francia
- Dijksterhuis, J., Nijssse, J., Hoekstra, FA., Golovina, EA. (2007). High viscosity and anisotropy characterize the cytoplasm of fungal dormant stress-resistant spores. *Eukaryot Cell*. 6(2):157-70.
- Donlan, RM. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9): 881-90.
- Evans-Hurrell, J.A., Adler, J., Denyer, S., Rogers, T.G., Williams, P. (1993). A method for the enumeration of bacterial adhesion to epithelial cells using images analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 107: 77–82.
- Feofilovaa, E. P., Ivashechkinb, A. A., Alekhinc, A. I. y Sergeeva, Ya. E. (2011). Fungal Spores: Dormancy, Germination, Chemical Composition, and Role in Biotechnology (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48: 1–11.
- Fletcher, M. (1996). Bacterial attachment in aquatic environments: a diversity of surfaces and adhesion strategies. In: Fletcher, M. (Ed.), *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*, Wiley–Liss, New York, pp. 1–24.
- Gannon, J.T., Manilal, V.B., Alexander, M. (1991). Relationship between cell surface properties and transport of bacteria through soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 190–193.
- Hermansson, M. (1999). The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 14: 105–119 In: Vickerman, J.C. (Ed.). *Surface Analysis. The Principal Techniques*, Wiley, Chichester. Interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometer scale. *Acta Biomaterialia*, 6(10):3824–3846.
- Hong, Y., Brown. G. (2006). Cell surface acid–base properties of *Escherichia coli* and *Bacillus brevis* and variation as a function of growth phase, nitrogen source and C:N ratio. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 50: 112–119
- Johnston, I. R. (1965). The Composition of the Cell Wall of *Aspergillus Niger*. *Biochemical Journal*,. 96: 651
- Jucker, B. A., Harms, H., x Zehnder, H. (1996). Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *Journal of Bacteriology*, 178(18): 5472–5479.
- Jucker, B.A., Harms, H., y Zehnder A. (1996). Adhesion of the Positively Charged Bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to Glass and Teflon. *Journal of bacteriology*. 178(18): 5472–5479

- Lee, BC., Jung, GY., Kim, DJ., Han, JS. (2011). Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirconia in vitro. *The Journal of Advanced Prosthodontics*, 3(2):81–4.
- Lever, J., Krzywinski, M., y Altman, N. S. (2017). Points of Significance: Principal component analysis. *Nature methods*, 14(7), 641-642. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4346>
- Lichtman J. (1994). Investigación y Ciencia. La ciencia de la luz. *Microscopía confocal*, 29:36-41
- Manning, P.A. (1995). Use of confocal microscopy in studying bacterial adhesion and invasion. In: Doyle, R.J., Ofek, I. (Eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. 253, Academic Press, California, pp. 159–166.
- Medeiros-Dantas L.C., Silva-Neto, JP. Souza-Dantas, T., Zasgo-Naves, L., Domingues das Neves, f., da Mota, A. (2016). Bacterial Adhesion and Surface Roughness for Different Clinical Techniques for Acrylic Polymethyl Methacrylate. *International Journal of Dentistry*, 2-6. doi: 10.1155/2016/8685796
- Moraes, M.N., da Silveira, W. C., Moreira, L.E., Duval, I. (2013). Mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials. *Revista Médica de Minas Gerais* - 23(1): 96-101
- Poncin-Epaillard, F., Herry, J., Marmey, P., Legeay, G., Debarnot, D., Bellon-Fontaine, M. (2013). Elaboration of highly hydrophobic polymeric surface: a potential strategy to reduce the adhesion of pathogenic bacteria?. *Materials Science and Engineering: C*, 33(3):1152–1161.
- Poortinga, A., Bos, R., Henk J. Busscher. (2001). Electrostatic interactions in the adhesion of an ion-penetrable and ion-impenetrable bacterial strain to glass. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 20: 105–117
- Prentice, G. A., Wolfe and L. F. L. Clew. (1971). The Use of Density Gradient Centrifugation for the Separation of Germinated from Nongerminated Spores. *Journal of applied bacteriology*. 35: 345-349.
- Prisca Schar-Zammaretti and Job Ubbink, (2003). The Cell Wall of Lactic Acid Bacteria: Surface Constituents and Macromolecular Conformations, *Biophysical Journal* 85: 4076–4092
- Quirynen, M., van der Mei, HC., Bollen, CM., Schotte, A., Marechal, M., Doornbusch, van Steenberghe D. (1993). An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. *Journal of Dental Research*. 72(9):1304-1309.
- Ramadan H.H., Sanclement, J.A, Thomas J.G. (2005). Chronic rhinosinusitis and biofilms. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 132: 414-7.
- Razatos, A., Ong, Y.L., Sharma, M.M., Georgiou, G. (1998). Razatos, A., Ong, Y.-L., Sharma, M.M., Georgiou, G. Atomic force microscopy. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA*.95,11059–11064.
- Scheuerman, TR., Camper, AK., Hamilton, MA. (1998). Effects of substratum topography on bacterial adhesion *Journal of Colloid and Interface Science* 208: 23-33.
- Scott, C., Manning S.C. (2003). Basics of biofilm in clinical otolaryngology. *Ear Nose Throat J*, 82 (suppl): 18-20.
- Siegismund,D., Undisz, A., Germerodt, S., Schuster, S., Rettenmayr, M. (2014). Quantification of the interaction between biomaterial surfaces and bacteria by 3-D modeling. *Acta Biomaterialia*. 10(1):267–275.
- Socrates, G. (2001). Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies, Tables and Charts. London England. John wiley & sons, ltd. Third Edition., ISBN 0-471-85298-8.
- Stryer, L. (1981). *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Tereshina, V.M., Mikhailova, M.V., and Feofilova, E.P. (1991). Alterations in the carbohydrate composition of the cytosol of fungal spores caused by temperature variations and the storage process. *Mikrobiologiya*, 63(4): 781–786.
- Teughels, W., Van-Assche, N., Sliepen, I., Quirynen, M. (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res*. 17(2):68–81. the literature. *Journal of Clinical Periodontology*, 22(1):1–14.
- Tsukahara, T. (1980). Changes in Chemical Composition of Conidia of *Aspergillus fumigatus* during Maturation and Germination. *Microbiology and Immunology*. 24 (8): 747-751
- Zehnder. (1987). Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol*. 53:1898–1901.

9. Conclusiones generales

La presente tesis tuvo como objetivo fundamental determinar las interacciones fisicoquímicas y ecológicas involucradas en los mecanismos de antagonismo de hongos ocratoxigénicos en presencia de bacterias ácido lácticas. Para ello mediante pruebas antagonicas en medio sólido y medio líquido se demostró la capacidad y el grado de biocontrol llevado a cabo por la bacteria *Lactobacillus plantarum* en contra del hongo micotoxigénico *A. carbonarius*. Alcanzando un máximo de inhibición del desarrollo micelial de 84% utilizando un inóculo bacteriano en el orden de 5×10^4 cel/mL, además se determinó que el tipo de biocontrol llevado a cabo por las bacterias es de tipo fungistático ya que las bacterias demostraron capacidad de inhibir el desarrollo fúngico por encima del 50% durante 5-6 días, posterior al sexto día el efecto antagonista decreció.

Respecto a las pruebas en medio líquido, las bacterias demostraron inhibición de la esporulación al menos durante 72h.

Posteriormente, mediante el uso de técnicas avanzadas en microscopia (MEB, CLSM) se determinó el fenómeno de adhesión superficial de bacterias sobre esporas fúngicas como interacción predominante al coexistir ambos microorganismos en un mismo hábitat, este comportamiento es considerado en literatura como antagonismo directo.

Así mismo las bacterias demostraron capacidad para fermentar trehalosa como fuente de carbono para la producción de ácidos orgánicos como: ácido L- láctico, ácido D- láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico y etanol. Los cuales podrían estar implicados en el biocontrol observado. Por lo que se concluye que *Lactobacillus plantarum* tiene la capacidad de utilizar de manera concomitante antagonismo de tipo directo (por su capacidad de adhesión o contacto físico) y mixto (por su capacidad para producir compuestos con propiedades antifúngicas) para el biocontrol del hongo micotoxigénico. Adicionalmente las bacterias demostraron capacidad para adsorber OTA sobre su superficie, lo cual puede ser una alternativa para disminuir la presencia de micotoxinas en alimentos y piensos.

Finalmente respecto al estudio de los mecanismos responsables de adhesión superficial de bacterias lácticas sobre esporas fúngicas evaluado mediante el uso de técnicas avanzadas en microscopia, espectroscopia y técnicas fisicoquímicas, se puede concluir que los factores de índole fisicoquímicos y eléctricos, no explican en su totalidad el fenómeno adhesivo de las

bacterias, así mismo la rugosidad y topografía superficial de esporas no dan evidencia de ser un factor determinante en la adhesión. Sin embargo, los factores de tipo adhesina-receptor parecen tener relación con el fenómeno adhesivo, ya que se pudo detectar mediante FTIR cambios en enlaces químicos respectivos a proteínas superficiales, polisacáridos y ácidos grasos cuando las bacterias están adheridas sobre la superficie de la espora fúngica. Por lo que se concluye que estas biomoléculas están implicadas en la adhesión bacteriana sobre la superficie de esporas fúngicas.

10. Anexo A.

Comercio internacional (exportaciones)

Las exportaciones mundiales de café, en el ciclo 2016/17, se estiman en 127.8 millones de sacos de 60 kg., menores en 4.0% a las obtenidas en el ciclo anterior. En periodo 2007-2017 se estima un incremento promedio anual de 3.5%. Las exportaciones brasileñas de café representan el 27% de las exportaciones mundiales, así mismo se estima aumenten a una tasa media anual de 3.4% del ciclo 2007/08 al ciclo 2016/17.

Los siguientes datos de volumen exportado por país, fueron tomados de la base de datos de ICO 2018.

BRASIL

Las exportaciones de Brasil crecieron un 24.2% a 2.33 millones de sacos en julio de 2018

VIETNAM

En julio de 2018, Las exportaciones de Vietnam alcanzaron un estimado de 2.22 millones de sacos, un 20.7% más que en julio. 2017.

COLOMBIA

Las exportaciones de Colombia aumentaron un 7.5% a 1.08 millones de sacos en julio de 2018.

HONDURAS

En julio de 2018, Honduras exporto 0.69 millones de sacos, 10.8% menos que en julio de 2017, y las exportaciones totales en los primeros diez meses del año de cosecha 2017/18 fueron un 2.8% más baja.

INDONESIA

Las exportaciones de Indonesia se estima 33.6% menor, en 4.69 millones de sacos entre octubre de 2017 y julio de 2018.

ETIOPIA

Etiopía fue el sexto mayor exportador en julio de 2018 con envíos de 0.42 millones de sacos, un 15.6% más que en julio de 2017. Además, sus exportaciones de octubre de 2017 hasta julio de 2018 crecieron 8.5% alcanzando 3.08 millones de sacos.

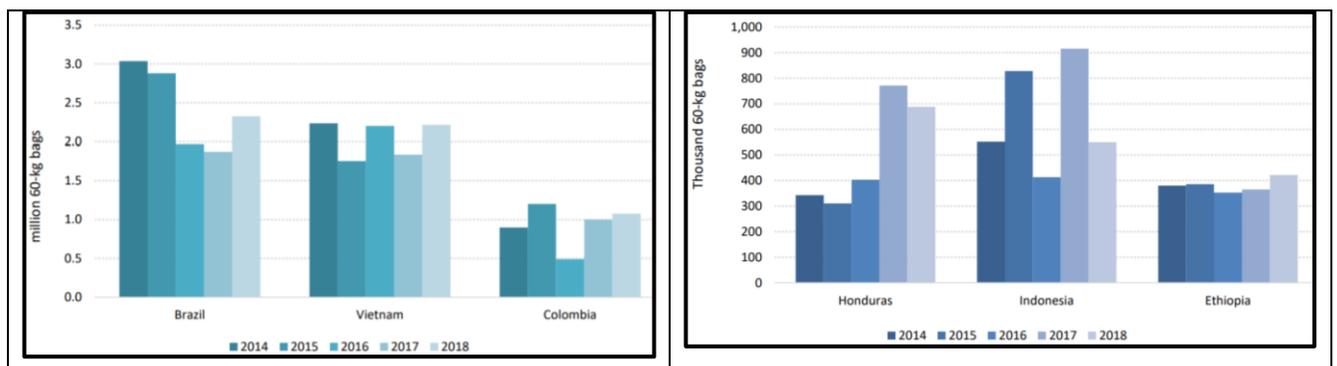


Figura Anexa A 1 Principales países exportadores a nivel mundial Fuente: Informe del mercado de café – Agosto 2018 ICO

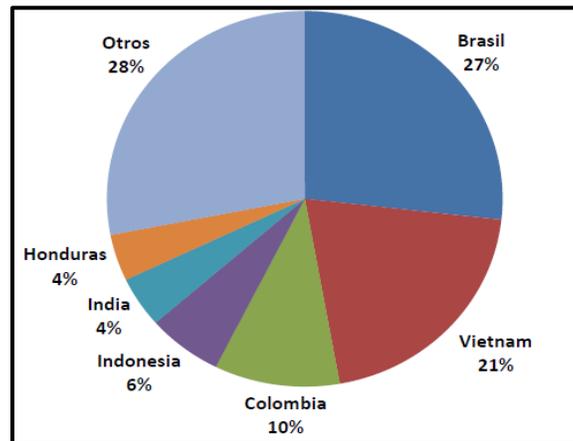


Figura Anexa A 2 Estructura porcentual de las exportaciones mundiales de café. Fuente: Elaborado por cima con datos de USDA/ Extranjero Agrícola

Comercio internacional (importaciones)

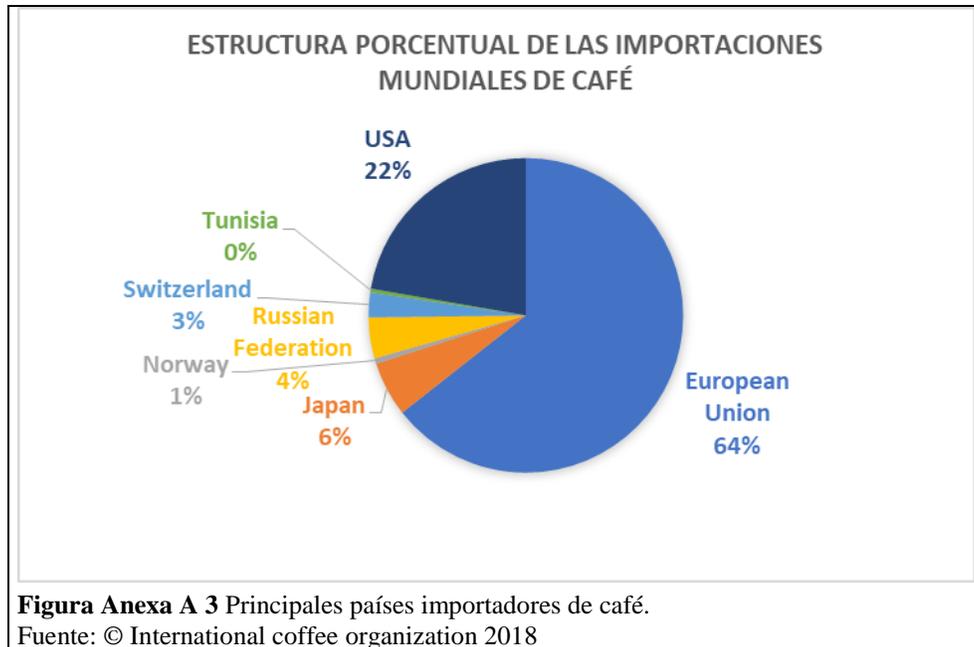
Tabla Anexa A 1 Principales países importadores de café

	Mayo 2017	Mayo 2018	Cambio (%)	Octubre- 2016/17	Mayo 2017/18	Cambio (%)
Total	11049	11317	2.4	85049	85568	0.6
Unión europea	6906	7046	2.0	53493	55091	3.0
Japón	671	714	6.4	5203	4823	-7.3
Noruega	76	55	-27.2	536	485	-9.5
Federación rusa	462	480	4.0	3659	3597	-1.7
Suiza	263	298	13.4	2009	2179	8.5
Túnez	28	40	42.8	385	336	-12.8
USA	2643	2683	1.5	19765	19057	-3.6

Fuente: © International coffee organization, Octubre 2018

-La Unión Europea ocupa el primer lugar en importaciones de café. Para el ciclo 2017/18 se estima en 55 millones de sacos de 60 kg (64% del total importado en el mundo).

-Las importaciones de Estados Unidos, segundo comprador de café en el mercado mundial, se estiman con un crecimiento promedio anual, de 2007 a 2017 de 1.5%.



Importancia social y económica

Por otra parte, este producto es crucial para la economía y política de desarrollo de países cuyas economías dependen del café. Por ejemplo, en África, el café representa la principal fuente de ingresos para más de 10 millones de hogares en 25 países cafetaleros africanos. Algunos de estos países dependen del café como principal fuente de ingresos para su población rural y es un producto que inyecta importantes flujos económicos mediante su exportación. Es un contribuyente vital a los ingresos en divisas, además de representar una proporción significativa de los ingresos fiscales y el Producto Interno Bruto de una serie de países en África, el cual es representado en la Figura Anexa A 4 (PNUD 2007).

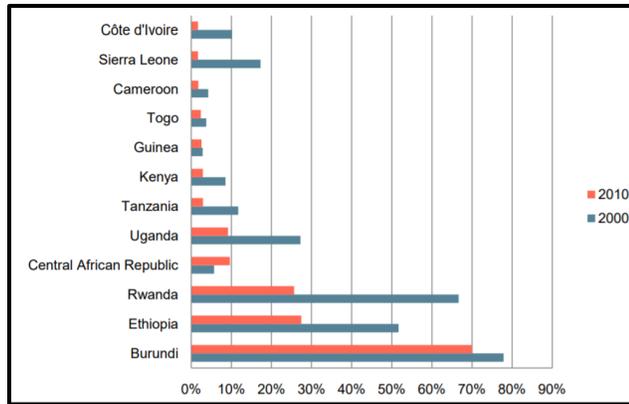


Figura Anexa A 4 Porcentaje de café en el valor total de las exportaciones de todos los productos. Fuente: © 2015 International Coffee Organization (www.ico.org)

En México el producto interno bruto (PIB) *per cápita* y la relación entre la aportación económica proveniente de la comercialización de café reflejan que esta actividad es crucial para la economía de los productores nacionales.

El promedio nacional del PIB *per cápita* es de 7 555 dólares anuales, mientras que, en los municipios cafetaleros no supera los 3 270 dólares. Lo anterior es una manifestación clara de que en los municipios cafetaleros se presentan los mayores rezagos económicos que tienen como consecuencia, los niveles bajos de bienestar social, es decir, dedicarse a la producción de café es de suma importancia para las familias dedicadas a esa actividad.

Importancia del café en el mercado bursátil

El café es uno de los artículos de consumo de mayor importancia en la bolsa de valores de Londres y Nueva York sin embargo los precios internacionales del café han experimentado una tendencia a la baja en los últimos dos años, promediando 102.41 centavos US DL/lb en agosto de 2018, lo que representa una caída del 20.1% en comparación con agosto de 2017. Esta disminución está vinculada principalmente a los mercados, donde factores como el tipo de cambio y los mercados futuros, también juegan un papel importante.

Sin embargo, las exportaciones totales en julio de 2018 ascendieron a 10.11 millones de sacos, en comparación con 9.66 millones en julio de 2017 (ICO 2018).

Pese a las variaciones en los precios reportadas en los últimos dos años, el café sigue siendo un producto de gran relevancia en las bolsas de valores. Esto se corrobora con las estadísticas de crecimiento del consumo de café proyectado hacia 2025 en miles de millones de sacos de 60 Kg (MM Sac. 60 Kg) presentado en la Figura Anexa A 5.

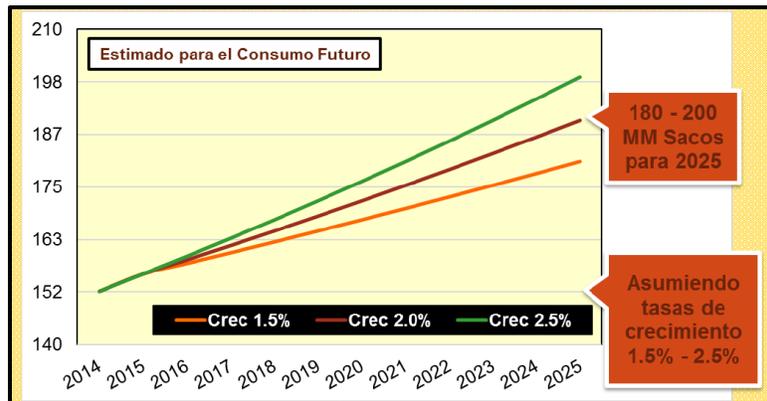


Figura Anexa A 5 Crecimiento consumo de café (MM Sac. 60 Kg)
Fuente © 2017 International Coffee Organization (www.ico.org)

11. Anexo B.

Preparación de caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe)

Pesar 5.5 g de medio MRS y disolver en 100 mL de agua destilada.

Calentar con agitación constante y hervir durante 1 min.

Dividir el contenido en tubos con 9 mL de caldo MRS.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Preparación de Agar papa dextrosa (PDA)

Pesar 3.9 gramos de agar PDA en un matraz Erlenmeyer.

Agregar 100 mL de agua destilada.

Calentar con agitación constante y hervir durante 1 min.

Repartir el medio en matraces Erlenmeyer con 50 mL de PDA cada uno.

Esterilizar en autoclave (121 °C, 15 min).

Preparación de medio CYA.

Preparar agar CYA con 0.8% o medio CYA (Tablas B1 y B2)

Tabla Anexa B 1 Composición del medio CYA 0.8%

Ingrediente	Cantidad
K ₂ HPO ₄	0.1 g
Extracto de levadura	0.5 g
Sacarosa	3 g
Agar bacteriológico	0.8 g
Czapek concentrado*	1 mL
Agua destilada	100 mL

Tabla Anexa B 2 Composición del medio Czapek concentrado*

Ingrediente	Cantidad
KCl	0.5 g
NaNO ₃	2 g
Sulfato ferroso	0.01 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Agua destilada	Cbp 100mL

Esterilización a 121°C 15min.

Vaciar 50µl de medio CYA en un portaobjetos con dos excavaciones,

Colocar un cubreobjetos de (X) en cada excavación

Sellar el cubreobjetos sobre todo los bordes con barniz para uñas transparente.

Incubar 24,48,72 horas a 30°C

12. Anexo C

Tabla Anexa C 1 Inhibición (%) de crecimiento radial en función del tiempo

24h				48h			
Conc. BAL	Área	StdDev	inhibición %	Conc. BAL	Área	StdDev	inhibición %
5.00E+04	1.062	0.049	72.397	5.00E+04	3.06	0.23672	70.17
	1.033				3.33		
	0.966				2.86		
1.00E+05	1.395	0.066	60.963	1.00E+05	3.10	0.55374	66.80
	1.416				3.12		
	1.518				4.07		
1.00E+06	1.414	0.173	56.842	1.00E+06	2.81	0.18947	70.71
	1.758				3.18		
	1.614				3.09		
1.00E+07	2.493	0.169	37.391	1.00E+07	3.43	0.03305	66.45
	2.292				3.49		
	2.158				3.48		
4.00E+07	0.569	0.097	84.138	4.00E+07	2.22	0.01901	78.31
	0.691				2.26		
	0.499				2.24		
72h				96h			
Conc. BAL	Área	StdDev	Inhibición %	Conc. BAL	Área	StdDev	Inhibición %
5.00E+0	4.10	0.1729	78.71	5.00E+0	4.891	0.5696	83.55401
4		9		4			
	3.76				5.533		
	3.91				4.397		
1.00E+0	4.88	0.1456	74.39	1.00E+0	5.332	0.7510	79.46943
5		6		5		9	
	4.63				6.787		
	4.64				6.383		
1.00E+0	3.95	0.9528	74.48	1.00E+0	8.218	3.7028	68.06454
6		4		6			
	5.77				6.775		
	4.38				13.78		
					7		
1.00E+0	11.4	0.5463	36.93	1.00E+0	17.03	0.3163	43.39833
7	6	8		7		7	

11.1				16.67			
6				4			
12.2				17.30			
2				5			
4.00E+0	7.33	0.1919	60.46	4.00E+0	12.34	0.2972	58.72802
7		4		7		7	
7.45				12.72			
7.07				12.13			
				4			

120 h				168 h			
Conc.	Área	StdDev	Inhibición %	Conc.	Área	StdDev	Inhibición %
BAL				BAL			
5.00E+04	9.04	0.2553	74.87	5.00E+04	37.01	1.84348	35.35
	9.40				36.20		
					33.49		
1.00E+05	11.65	0.396	69.00	1.00E+05	31.23	6.58006	31.68
	11.09				37.17		
					44.37		
1.00E+06	13.88	1.195	59.85	1.00E+06	54.45	3.82568	9.06
	15.57				47.75		
					47.90		
1.00E+07	26.41	1.07	25.07	1.00E+07	55.31	0.96397	0
	27.49				55.88		
	28.55				54.00		
4.00E+07	18.13	0.3281	51.60	4.00E+07	47.38	0.7484	14.90
	17.53				47.11		
	17.60				45.97		
192 h							
Conc.	Área	StdDev	Inhibición %				
BAL							
5.00E+04	50.77	1.20329	16.77				
	50.49						
	48.56						
1.00E+05	52.68	3.05534	11.72				

56.16			
50.07			
1.00E+06	58.04	1.8068	5.51
57.40			
54.64			
1.00E+07	60.00	0.15275	0
59.90			
59.70			
4.00E+07	57.42	0.48754	4.85
56.53			
57.32			

Tabla Anexa C 2 Tabla resumen de inhibición (%) en función de concentración bacteriana (cel/mL) y tiempo (días)

Conc de BAL (cel/mL)	tiempo en días						
	1	2	3	4	5	7	8
5.00E+04	72	70	79	84	75	35	17
1.00E+05	61	67	74	79	69	32	12
1.00E+06	57	71	74	68	60	9	6
1.00E+07	37	66	37	43	25	0	0
4.00E+07	84	78	60	59	52	15	5

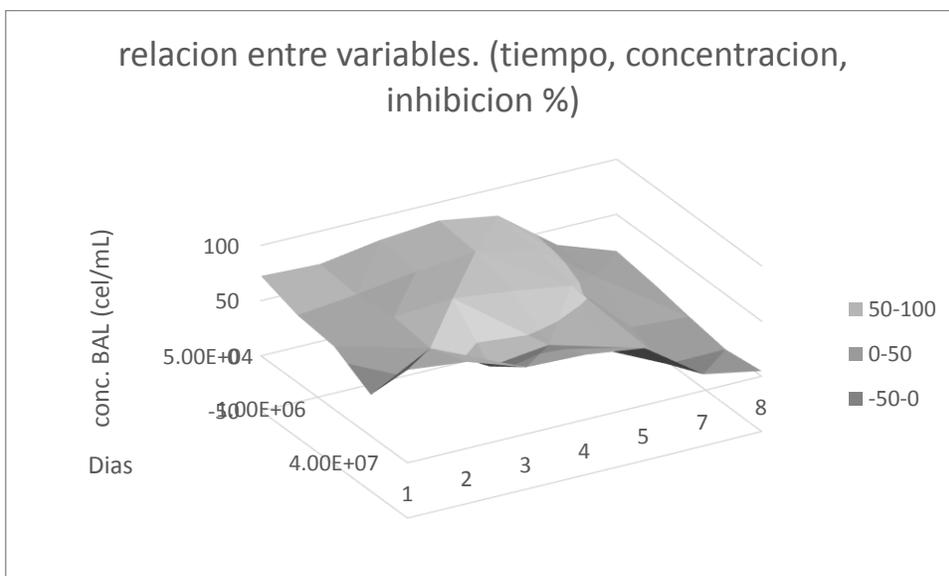


Figura Anexa C 1 Grafica de superficie respuesta y correlación de las variables concentración y tiempo sobre inhibición (%)

13. Anexo D

Tabla Anexa D 1 Análisis de partículas de bacterias y diámetro de esporas en medio líquido.

<table border="1"> <thead> <tr> <th>Label</th> <th>Area</th> <th>StdDev</th> <th>Perim.</th> <th>Median</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg</td><td>4.237E-6</td><td>6.630E1</td><td>7.260E-3</td><td>1.170E2</td></tr> <tr><td>2</td><td>3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg</td><td>5.396E-6</td><td>6.007E1</td><td>8.260E-3</td><td>9.500E1</td></tr> <tr><td>3</td><td>3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg</td><td>4.987E-6</td><td>6.096E1</td><td>7.920E-3</td><td>7.400E1</td></tr> <tr><td>4</td><td>3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg</td><td>5.602E-6</td><td>6.875E1</td><td>8.415E-3</td><td>1.110E2</td></tr> <tr><td>5</td><td>3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg</td><td>6.265E-6</td><td>6.514E1</td><td>8.910E-3</td><td>6.300E1</td></tr> <tr><td>6</td><td>3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg</td><td>4.789E-6</td><td>6.003E1</td><td>7.700E-3</td><td>8.700E1</td></tr> <tr><td>7</td><td>3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg</td><td>4.976E-6</td><td>6.912E1</td><td>7.920E-3</td><td>8.000E1</td></tr> <tr><td>8</td><td>3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg</td><td>6.155E-6</td><td>6.466E1</td><td>8.740E-3</td><td>1.020E2</td></tr> <tr><td>9</td><td>3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg</td><td>5.903E-6</td><td>6.397E1</td><td>8.580E-3</td><td>7.900E1</td></tr> <tr><td>10</td><td>3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg</td><td>5.023E-6</td><td>5.635E1</td><td>6.105E-3</td><td>1.230E2</td></tr> </tbody> </table>	Label	Area	StdDev	Perim.	Median	1	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg	4.237E-6	6.630E1	7.260E-3	1.170E2	2	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg	5.396E-6	6.007E1	8.260E-3	9.500E1	3	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg	4.987E-6	6.096E1	7.920E-3	7.400E1	4	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg	5.602E-6	6.875E1	8.415E-3	1.110E2	5	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg	6.265E-6	6.514E1	8.910E-3	6.300E1	6	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg	4.789E-6	6.003E1	7.700E-3	8.700E1	7	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg	4.976E-6	6.912E1	7.920E-3	8.000E1	8	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg	6.155E-6	6.466E1	8.740E-3	1.020E2	9	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg	5.903E-6	6.397E1	8.580E-3	7.900E1	10	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg	5.023E-6	5.635E1	6.105E-3	1.230E2	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Slice</th> <th>Count</th> <th>Total Area</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg (green)</td> <td>2544</td> <td>26410</td> </tr> </tbody> </table>	Slice	Count	Total Area	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg (green)	2544	26410
Label	Area	StdDev	Perim.	Median																																																																				
1	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg	4.237E-6	6.630E1	7.260E-3	1.170E2																																																																			
2	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg	5.396E-6	6.007E1	8.260E-3	9.500E1																																																																			
3	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg	4.987E-6	6.096E1	7.920E-3	7.400E1																																																																			
4	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg	5.602E-6	6.875E1	8.415E-3	1.110E2																																																																			
5	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg	6.265E-6	6.514E1	8.910E-3	6.300E1																																																																			
6	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg	4.789E-6	6.003E1	7.700E-3	8.700E1																																																																			
7	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg	4.976E-6	6.912E1	7.920E-3	8.000E1																																																																			
8	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg	6.155E-6	6.466E1	8.740E-3	1.020E2																																																																			
9	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg	5.903E-6	6.397E1	8.580E-3	7.900E1																																																																			
10	3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg	5.023E-6	5.635E1	6.105E-3	1.230E2																																																																			
Slice	Count	Total Area																																																																						
3h bal hongo sin ALCL3 a.jpg (green)	2544	26410																																																																						
3h																																																																								
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Label</th> <th>Area</th> <th>StdDev</th> <th>Perim.</th> <th>Median</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg</td><td>5.143E-6</td><td>5.290E1</td><td>8.078E-3</td><td>1.430E2</td></tr> <tr><td>2</td><td>BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg</td><td>5.832E-6</td><td>5.571E1</td><td>8.583E-3</td><td>1.030E2</td></tr> <tr><td>3</td><td>BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg</td><td>5.648E-6</td><td>5.440E1</td><td>8.415E-3</td><td>8.300E1</td></tr> <tr><td>4</td><td>BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg</td><td>6.198E-6</td><td>5.304E1</td><td>8.752E-3</td><td>1.110E2</td></tr> <tr><td>5</td><td>BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg</td><td>5.832E-6</td><td>6.756E1</td><td>8.583E-3</td><td>6.500E1</td></tr> <tr><td>6</td><td>BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg</td><td>6.142E-6</td><td>5.645E1</td><td>8.752E-3</td><td>1.150E2</td></tr> <tr><td>7</td><td>BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg</td><td>4.821E-6</td><td>5.770E1</td><td>7.742E-3</td><td>9.500E1</td></tr> <tr><td>8</td><td>BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg</td><td>6.107E-6</td><td>6.334E1</td><td>8.752E-3</td><td>6.700E1</td></tr> <tr><td>9</td><td>BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg</td><td>5.020E-6</td><td>5.969E1</td><td>8.078E-3</td><td>1.020E2</td></tr> <tr><td>10</td><td>BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg</td><td>4.006E-6</td><td>4.173E1</td><td>7.069E-3</td><td>1.620E2</td></tr> </tbody> </table>	Label	Area	StdDev	Perim.	Median	1	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg	5.143E-6	5.290E1	8.078E-3	1.430E2	2	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg	5.832E-6	5.571E1	8.583E-3	1.030E2	3	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg	5.648E-6	5.440E1	8.415E-3	8.300E1	4	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg	6.198E-6	5.304E1	8.752E-3	1.110E2	5	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg	5.832E-6	6.756E1	8.583E-3	6.500E1	6	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg	6.142E-6	5.645E1	8.752E-3	1.150E2	7	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg	4.821E-6	5.770E1	7.742E-3	9.500E1	8	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg	6.107E-6	6.334E1	8.752E-3	6.700E1	9	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg	5.020E-6	5.969E1	8.078E-3	1.020E2	10	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg	4.006E-6	4.173E1	7.069E-3	1.620E2	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Slice</th> <th>Count</th> <th>Total Area</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg (green)</td> <td>3944</td> <td>51643</td> </tr> </tbody> </table>	Slice	Count	Total Area	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg (green)	3944	51643
Label	Area	StdDev	Perim.	Median																																																																				
1	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg	5.143E-6	5.290E1	8.078E-3	1.430E2																																																																			
2	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg	5.832E-6	5.571E1	8.583E-3	1.030E2																																																																			
3	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg	5.648E-6	5.440E1	8.415E-3	8.300E1																																																																			
4	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg	6.198E-6	5.304E1	8.752E-3	1.110E2																																																																			
5	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg	5.832E-6	6.756E1	8.583E-3	6.500E1																																																																			
6	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg	6.142E-6	5.645E1	8.752E-3	1.150E2																																																																			
7	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg	4.821E-6	5.770E1	7.742E-3	9.500E1																																																																			
8	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg	6.107E-6	6.334E1	8.752E-3	6.700E1																																																																			
9	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg	5.020E-6	5.969E1	8.078E-3	1.020E2																																																																			
10	BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg	4.006E-6	4.173E1	7.069E-3	1.620E2																																																																			
Slice	Count	Total Area																																																																						
BAL HONGO SIN ALCL3 15h a.jpg (green)	3944	51643																																																																						
15h																																																																								
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Label</th> <th>Area</th> <th>StdDev</th> <th>Perim.</th> <th>Median</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg</td><td>5.177E-6</td><td>5.509E1</td><td>8.078E-3</td><td>1.480E2</td></tr> <tr><td>2</td><td>BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg</td><td>6.142E-6</td><td>5.570E1</td><td>8.752E-3</td><td>1.480E2</td></tr> <tr><td>3</td><td>BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg</td><td>4.962E-6</td><td>5.667E1</td><td>7.910E-3</td><td>1.070E2</td></tr> <tr><td>4</td><td>BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg</td><td>4.568E-6</td><td>5.343E1</td><td>7.573E-3</td><td>1.440E2</td></tr> <tr><td>5</td><td>BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg</td><td>6.773E-6</td><td>5.496E1</td><td>9.256E-3</td><td>1.350E2</td></tr> <tr><td>6</td><td>BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg</td><td>5.878E-6</td><td>5.576E1</td><td>8.583E-3</td><td>1.330E2</td></tr> </tbody> </table>	Label	Area	StdDev	Perim.	Median	1	BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg	5.177E-6	5.509E1	8.078E-3	1.480E2	2	BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg	6.142E-6	5.570E1	8.752E-3	1.480E2	3	BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg	4.962E-6	5.667E1	7.910E-3	1.070E2	4	BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg	4.568E-6	5.343E1	7.573E-3	1.440E2	5	BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg	6.773E-6	5.496E1	9.256E-3	1.350E2	6	BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg	5.878E-6	5.576E1	8.583E-3	1.330E2	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Slice</th> <th>Count</th> <th>Total Area</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg (green)</td> <td>4849</td> <td>107536</td> </tr> </tbody> </table>	Slice	Count	Total Area	BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg (green)	4849	107536																								
Label	Area	StdDev	Perim.	Median																																																																				
1	BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg	5.177E-6	5.509E1	8.078E-3	1.480E2																																																																			
2	BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg	6.142E-6	5.570E1	8.752E-3	1.480E2																																																																			
3	BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg	4.962E-6	5.667E1	7.910E-3	1.070E2																																																																			
4	BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg	4.568E-6	5.343E1	7.573E-3	1.440E2																																																																			
5	BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg	6.773E-6	5.496E1	9.256E-3	1.350E2																																																																			
6	BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg	5.878E-6	5.576E1	8.583E-3	1.330E2																																																																			
Slice	Count	Total Area																																																																						
BAL HONGO SIN ALCL3 72h a.jpg (green)	4849	107536																																																																						
72h																																																																								

14. Anexo E

Tabla Anexo E 1 Análisis de partículas de bacterias y diámetro de esporas en medio líquido en presencia de AIC13 0.01M

<p>Øpromedio:2.676619 um</p>																																																												
<p>Results</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Label</th> <th>Area</th> <th>StdDev</th> <th>Perim</th> <th>Median</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>bal hongo 5h con aic13 a.jpg</td><td>5.832E-6</td><td>5.353E1</td><td>8.983E-3</td><td>6.900E1</td></tr> <tr><td>2</td><td>bal hongo 5h con aic13 a.jpg</td><td>6.107E-6</td><td>5.850E1</td><td>8.752E-3</td><td>8.700E1</td></tr> <tr><td>3</td><td>bal hongo 5h con aic13 a.jpg</td><td>5.832E-6</td><td>5.493E1</td><td>8.983E-3</td><td>5.800E1</td></tr> <tr><td>4</td><td>bal hongo 5h con aic13 a.jpg</td><td>5.809E-6</td><td>5.951E1</td><td>8.983E-3</td><td>8.100E1</td></tr> <tr><td>5</td><td>bal hongo 5h con aic13 a.jpg</td><td>5.614E-6</td><td>5.533E1</td><td>8.415E-3</td><td>7.700E1</td></tr> <tr><td>6</td><td>bal hongo 5h con aic13 a.jpg</td><td>6.383E-6</td><td>5.143E1</td><td>8.920E-3</td><td>6.400E1</td></tr> <tr><td>7</td><td>bal hongo 5h con aic13 a.jpg</td><td>4.569E-6</td><td>5.499E1</td><td>7.573E-3</td><td>7.800E1</td></tr> <tr><td>8</td><td>bal hongo 5h con aic13 a.jpg</td><td>4.982E-6</td><td>5.471E1</td><td>7.910E-3</td><td>5.600E1</td></tr> </tbody> </table>	Label	Area	StdDev	Perim	Median	1	bal hongo 5h con aic13 a.jpg	5.832E-6	5.353E1	8.983E-3	6.900E1	2	bal hongo 5h con aic13 a.jpg	6.107E-6	5.850E1	8.752E-3	8.700E1	3	bal hongo 5h con aic13 a.jpg	5.832E-6	5.493E1	8.983E-3	5.800E1	4	bal hongo 5h con aic13 a.jpg	5.809E-6	5.951E1	8.983E-3	8.100E1	5	bal hongo 5h con aic13 a.jpg	5.614E-6	5.533E1	8.415E-3	7.700E1	6	bal hongo 5h con aic13 a.jpg	6.383E-6	5.143E1	8.920E-3	6.400E1	7	bal hongo 5h con aic13 a.jpg	4.569E-6	5.499E1	7.573E-3	7.800E1	8	bal hongo 5h con aic13 a.jpg	4.982E-6	5.471E1	7.910E-3	5.600E1	<p>Summary</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Slice</th> <th>Count</th> <th>Total Area</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>bal hongo 5h con aic13 a.jpg (green)</td> <td>1617</td> <td>53851</td> </tr> </tbody> </table>	Slice	Count	Total Area	bal hongo 5h con aic13 a.jpg (green)	1617	53851
Label	Area	StdDev	Perim	Median																																																								
1	bal hongo 5h con aic13 a.jpg	5.832E-6	5.353E1	8.983E-3	6.900E1																																																							
2	bal hongo 5h con aic13 a.jpg	6.107E-6	5.850E1	8.752E-3	8.700E1																																																							
3	bal hongo 5h con aic13 a.jpg	5.832E-6	5.493E1	8.983E-3	5.800E1																																																							
4	bal hongo 5h con aic13 a.jpg	5.809E-6	5.951E1	8.983E-3	8.100E1																																																							
5	bal hongo 5h con aic13 a.jpg	5.614E-6	5.533E1	8.415E-3	7.700E1																																																							
6	bal hongo 5h con aic13 a.jpg	6.383E-6	5.143E1	8.920E-3	6.400E1																																																							
7	bal hongo 5h con aic13 a.jpg	4.569E-6	5.499E1	7.573E-3	7.800E1																																																							
8	bal hongo 5h con aic13 a.jpg	4.982E-6	5.471E1	7.910E-3	5.600E1																																																							
Slice	Count	Total Area																																																										
bal hongo 5h con aic13 a.jpg (green)	1617	53851																																																										
5h																																																												
<p>Øpromedio:2.557174um</p>																																																												
<p>Results</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Label</th> <th>Area</th> <th>StdDev</th> <th>Perim</th> <th>Median</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>bal hongo 15h con aic13 a.jpg</td><td>5.395E-6</td><td>5.355E1</td><td>8.247E-3</td><td>7.400E1</td></tr> <tr><td>2</td><td>bal hongo 15h con aic13 a.jpg</td><td>5.349E-6</td><td>6.026E1</td><td>8.247E-3</td><td>1.120E2</td></tr> <tr><td>3</td><td>bal hongo 15h con aic13 a.jpg</td><td>5.395E-6</td><td>5.655E1</td><td>8.247E-3</td><td>8.400E1</td></tr> <tr><td>4</td><td>bal hongo 15h con aic13 a.jpg</td><td>5.189E-6</td><td>5.991E1</td><td>8.078E-3</td><td>1.260E2</td></tr> <tr><td>5</td><td>bal hongo 15h con aic13 a.jpg</td><td>5.189E-6</td><td>5.659E1</td><td>8.078E-3</td><td>8.400E1</td></tr> <tr><td>6</td><td>bal hongo 15h con aic13 a.jpg</td><td>4.821E-6</td><td>5.565E1</td><td>7.742E-3</td><td>7.900E1</td></tr> <tr><td>7</td><td>bal hongo 15h con aic13 a.jpg</td><td>4.833E-6</td><td>5.753E1</td><td>7.742E-3</td><td>1.240E2</td></tr> <tr><td>8</td><td>bal hongo 15h con aic13 a.jpg</td><td>4.936E-6</td><td>5.597E1</td><td>7.910E-3</td><td>6.600E1</td></tr> </tbody> </table>	Label	Area	StdDev	Perim	Median	1	bal hongo 15h con aic13 a.jpg	5.395E-6	5.355E1	8.247E-3	7.400E1	2	bal hongo 15h con aic13 a.jpg	5.349E-6	6.026E1	8.247E-3	1.120E2	3	bal hongo 15h con aic13 a.jpg	5.395E-6	5.655E1	8.247E-3	8.400E1	4	bal hongo 15h con aic13 a.jpg	5.189E-6	5.991E1	8.078E-3	1.260E2	5	bal hongo 15h con aic13 a.jpg	5.189E-6	5.659E1	8.078E-3	8.400E1	6	bal hongo 15h con aic13 a.jpg	4.821E-6	5.565E1	7.742E-3	7.900E1	7	bal hongo 15h con aic13 a.jpg	4.833E-6	5.753E1	7.742E-3	1.240E2	8	bal hongo 15h con aic13 a.jpg	4.936E-6	5.597E1	7.910E-3	6.600E1	<p>Summary</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Slice</th> <th>Count</th> <th>Total Area</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>bal hongo 15h con aic13 a.jpg (red)</td> <td>2022</td> <td>63502</td> </tr> </tbody> </table>	Slice	Count	Total Area	bal hongo 15h con aic13 a.jpg (red)	2022	63502
Label	Area	StdDev	Perim	Median																																																								
1	bal hongo 15h con aic13 a.jpg	5.395E-6	5.355E1	8.247E-3	7.400E1																																																							
2	bal hongo 15h con aic13 a.jpg	5.349E-6	6.026E1	8.247E-3	1.120E2																																																							
3	bal hongo 15h con aic13 a.jpg	5.395E-6	5.655E1	8.247E-3	8.400E1																																																							
4	bal hongo 15h con aic13 a.jpg	5.189E-6	5.991E1	8.078E-3	1.260E2																																																							
5	bal hongo 15h con aic13 a.jpg	5.189E-6	5.659E1	8.078E-3	8.400E1																																																							
6	bal hongo 15h con aic13 a.jpg	4.821E-6	5.565E1	7.742E-3	7.900E1																																																							
7	bal hongo 15h con aic13 a.jpg	4.833E-6	5.753E1	7.742E-3	1.240E2																																																							
8	bal hongo 15h con aic13 a.jpg	4.936E-6	5.597E1	7.910E-3	6.600E1																																																							
Slice	Count	Total Area																																																										
bal hongo 15h con aic13 a.jpg (red)	2022	63502																																																										
15h																																																												
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Slice</th> <th>Count</th> <th>Total Area</th> <th>Average Size</th> <th>%Ar</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>bal hongo 24h con aic13 a.jpg (green)</td> <td>487</td> <td>5488</td> <td>11.269</td> <td>1.25</td> </tr> </tbody> </table>		Slice	Count	Total Area	Average Size	%Ar	bal hongo 24h con aic13 a.jpg (green)	487	5488	11.269	1.25																																																	
Slice	Count	Total Area	Average Size	%Ar																																																								
bal hongo 24h con aic13 a.jpg (green)	487	5488	11.269	1.25																																																								

24h

15. Anexo F

Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).

Este último equipo es una potente y versátil herramienta que mediante la interacción de electrones, permite visualizar y estudiar estructuras muy pequeñas de muestras sólidas y conductoras con gran resolución. Proporciona información morfológica, topográfica, cristalográfica y de composición. Siendo muy útil para una gran variedad de aplicaciones científicas e industriales. El MEB o MEB se compone de los siguientes elementos básicos. Columna, cámara del espécimen, detectores y computadora de control (Goldstein, 2003).

En la columna encontramos el cañón de electrones que es la fuente de iluminación. Esta puede variar proporcionando un haz más o menos intenso y fino en función del sistema utilizado para la emisión de electrones termoiónicos o de emisión de campo. También encontramos el sistema óptico de lentes electromagnéticas que focaliza el haz sobre la muestra. Está formado por lentes condensadoras y lente objetivo (https://www.jeol.co.jp/en/applications/pdf/sm/sem_atoz_all.pdf). Los electrones altamente acelerados producidos por el cañón, se hacen converger en un fino haz que pasa a través del sistema óptico y mediante bobinas deflectoras situadas por encima de la lente objetivo. El haz de electrones barre pequeñas áreas seleccionadas de la superficie de la muestra (Goldstein, 2003). En la cámara del espécimen es donde el haz primario de electrones impacta sobre la muestra. Este penetra hasta una profundidad de unas pocas micras dependiendo de la tensión de aceleración y la densidad de la muestra. Como resultado de esta interacción se generan diversas señales que son captadas por los diferentes detectores situados según la geometría de dispersión y en relación al haz primario (Reimer, 1998).

El detector de electrones retrodispersados situado encima de la muestra, capta los llamados electrones de alta energía. Distinguiendo la variación de la señal causada entre otros factores por la diferencia en el número atómico promedio y la orientación cristalográfica. Esto proporciona información adicional sobre la composición de la superficie de la muestra (https://www.jeol.co.jp/en/applications/pdf/sm/sem_atoz_all.pdf).

El detector de electrones secundarios, situado muy cerca y al lado de la muestra, capta la intensidad de la radiación superficial generada por los electrones de baja energía. Estos son

expulsados por la interacción del haz incidente con los electrones que forman los átomos de la superficie de la muestra (<http://www.ualberta.ca/~ccwj/teaching/microscopy/>).

El detector de rayos X es sensible a la señal producida por los electrones incidentes que excitan los átomos de la muestra y provocan la emisión de rayos X. La energía de esta radiación es característica de los elementos presentes en la muestra y su intensidad es proporcional a su concentración relativa (<http://www.ualberta.ca/~ccwj/teaching/microscopy/>).

Esto permite realizar análisis tanto cualitativos como cuantitativos y al mismo tiempo mapas de distribución elemental (Egerton, 2005).

Finalmente la computadora de control con su monitor. Además de visualizar y grabar las imágenes, posibilita actuar de manera remota sobre todos los sistemas y dispositivos del microscopio.

De manera resumida para el procesamiento de muestras, deberemos montarlas sobre soportes especiales metálicos que a su vez van fijados sobre porta muestras simples o múltiples. La cámara del espécimen puede mantenerse en alto vacío o en condiciones de bajo vacío, según el tiempo de preparación.

Algunas muestras biológicas pueden requerir una deshidratación y fijación previas, En caso de tratarse de muestras no conductoras como lo son la mayoría de las muestras biológicas, es necesario hacer pasos adicionales al procesamiento de muestras, esto implica un recubrimiento metálico o de carbón muy delgado en función del tipo de muestra y del análisis que se pretenda realizar.

Dentro de la cámara la muestra queda situada justo debajo de la pieza polar del lente objetivo, allí puede girarse y desplazarse en todas las direcciones para una mejor observación y análisis. Alrededor de la muestra están dispuestos los diferentes detectores para captar la radiación generada por la interacción del haz con la muestra para poder adquirir la imagen o el espectro de la zona de interés (Clarke, 2002).

Potencial Z (PZ).

Estas fuerzas y la adhesión de los microorganismos a varias interfaces han sido explicadas comúnmente por la clásica teoría de la estabilidad coloidal de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO). La teoría ha tenido aplicaciones como un modelo cualitativo, pero

también en ocasiones ha sido utilizada de forma cuantitativa para calcular los cambios de energía libres de adherencias implicados en la adhesión microbiana.

Inicialmente el estudio de las interacciones eléctricas de doble capa (interfacial) implicadas en la adhesión bacteriana a superficies implica el estudio de potencial Z o carga superficial de los coloides (microorganismos), y es importante tener presente que existen varios potenciales de coloide (Arboleda, 1981), los principales son 3 (Figura Anexa F1), y son descritos a continuación:

- 1.- Potencial ψ : es el potencial que existe en la superficie del coloide, también es conocido como potencial de Nernst.
- 2.- Potencial Φ : existe en el interior de la doble capa, donde empieza la parte difusa.
- 3.- Potencial Z (ζ): este potencial existe en el plano de cizalla y que es el que se describirá con más detalle.

El plano de cizalla es considerado como una sección de la capa que se mueve con la partícula formando parte integral de ella, también es la sección que separa a la partícula de estudio o coloide del resto de la dispersión. Como no se pueden separar el coloide de los contra iones que lo rodean, el único potencial que se puede determinar con más o menos precisión es el potencial Z, es decir el potencial en la superficie del plano de cizalla.

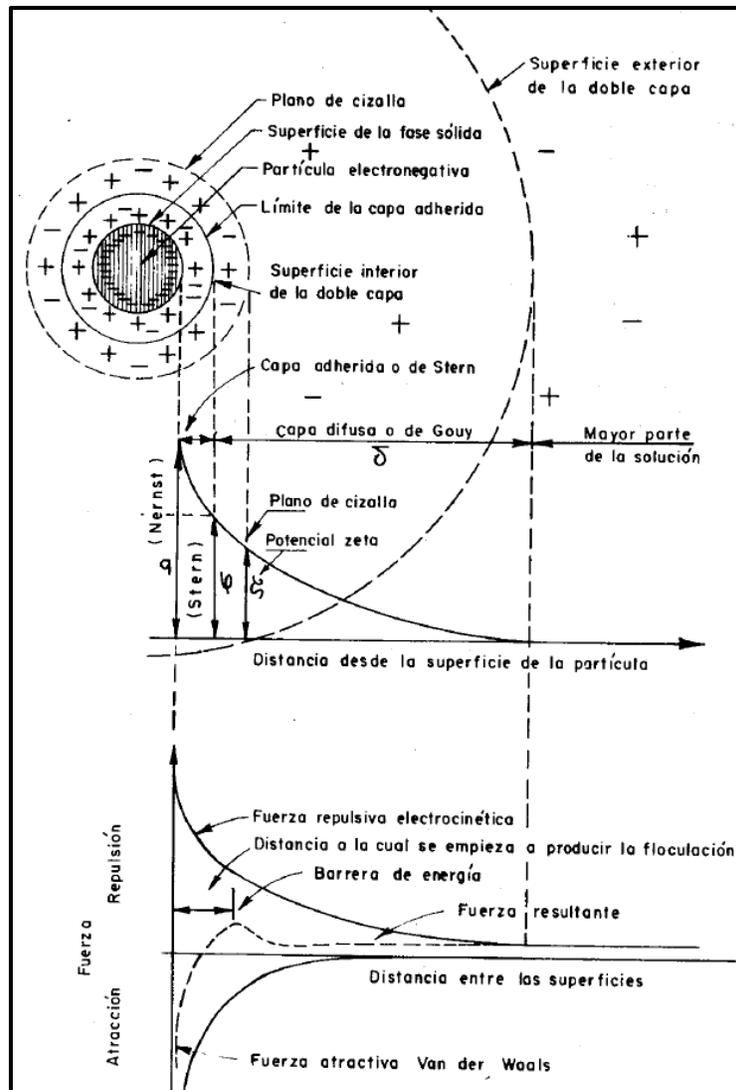


Figura Anexa F 1 Representación gráfica de los diferentes potenciales y capas pertenecientes al sistema eléctrico coloidal. Fuente: Arboleda, J. (1981)

Modelo de la doble capa

Se usa el modelo de la doble capa para esquematizar la atmósfera iónica existente en la proximidad del coloide y para explicar cómo actúan las fuerzas eléctricas de repulsión.

La fuerza atractiva que puede presentar un coloide negativo hacia algunos iones positivos provoca que se forme una rígida capa alrededor de la superficie del coloide; esta capa de contra-iones (ión positivo) es conocida como la capa de Stern (Figura Anexa F2). Seguido a la capa de Stern otros iones positivos adicionales son todavía atraídos por la fuerza del coloide negativo, pero estos son ahora rechazados, así como por otros iones positivos que

intentan acercarse al coloide. Este equilibrio dinámico entre cargas resulta en la formación de una capa conocida como capa difusa de contra-iones y que es la que se puede estudiar más ampliamente (<http://www.zeta-meter.com/>). Se sabe que los contra-iones se concentran sobre la superficie del coloide, seguidamente va disminuyendo gradualmente con la distancia del centro del coloide y la del sistema, hasta que se alcanza un equilibrio dinámico entre iones positivos y negativos en el seno de la disolución (Figura Anexa F2).

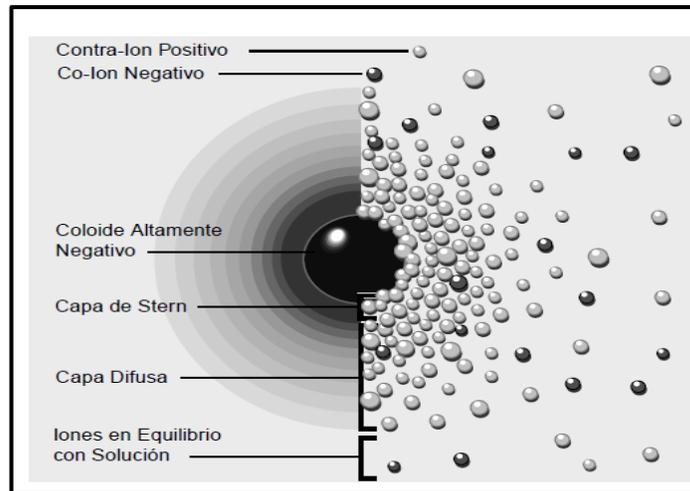


Figura Anexa F 2 Modelo de la doble capa que esquematiza la atmósfera iónica existente en la proximidad del coloide. Fuente: <http://www.zeta-meter.com/>

Por último, es importante considerar que el coloide negativo y su atmósfera cargada positivamente producen un potencial eléctrico relativo a la solución. Este tiene un valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia, aproximándose a cero fuera de la capa difusa.

Un punto de particular interés para el estudio electroquímico de los coloides es el potencial donde se unen la capa difusa y la de Stern. Este potencial es conocido como el potencial Z, el cual es importante porque puede ser medido de una manera fácil, ya que la carga de la superficie del colide y su potencial no pueden ser medidos con facilidad.

El potencial Z puede ser una manera efectiva de controlar el comportamiento del coloide puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión/atracción entre los coloides.

La teoría DLVO es una teoría que explica el comportamiento de los coloides en suspensión. Esta teoría se basa en el estudio del equilibrio entre las fuerzas repulsivas causadas por cargas

eléctricas de superficies y fuerzas atractivas tipo van der Waals y explica por qué algunos coloides se aglomeran mientras que otros no lo hacen (www.zeta-meter.com).

Cuando se busca tener suspensiones inestables, es decir se busca una aglomeración entre partículas, el estudio de la repulsión electrostática llega a ser importante, ya que cuando los coloides se aproximan la doble capa interfiere en este acercamiento, por lo que ocurre un fenómeno repulsivo debido a cargas. Se requiere energía para sobrepasar esta repulsión y forzar la unión entre las partículas, lo cual puede ser un tema de utilidad para fomentar el contacto entre las bacterias lácticas y las esporas, para ello el uso de la teoría de estabilidad de coloides nos ayuda a conocer mediante una curva de repulsión electrostática cual es la cantidad de energía que hay que vencer para que las partículas puedan ser forzadas a juntarse. La teoría de estabilidad de coloides “DLVO” se basa en el estudio de las fuerzas de atracción de van der Waals y la curva de repulsión electrostática: la combinación de ambas curvas energéticas es llamada la energía neta de interacción. A cada distancia el pequeño valor se resta del mayor valor para dar la energía neta. El valor neto se representa arriba en la gráfica si es repulsivo o abajo si es atractivo, y así se forma la curva (Figura Anexa F3). Sin embargo, se sabe que la curva de interacción neta cambia siempre.

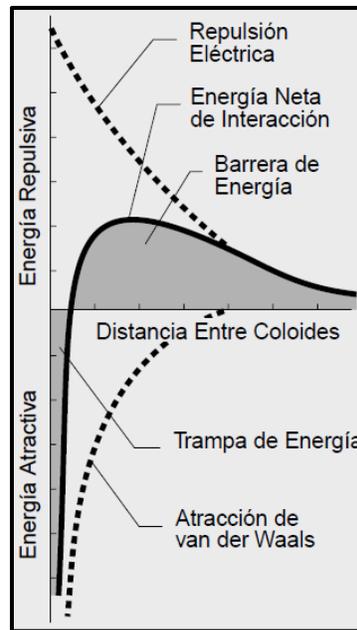


Figura Anexa F 3 Energía de interacción de fuerzas moleculares en coloides. Fuente: <http://www.zeta-meter.com/>

Dependiendo de nuestro propósito, es posible alterar el entorno del coloide para aumentar o disminuir la barrera energética y como consecuencia, aumentar o disminuir la aglomeración. Varios métodos pueden ser usados para este propósito, tales como cambios en la atmósfera iónica, el pH o agregando compuestos activos para afectar directamente la carga del coloide (Trefalt, Szilagyi, Borkovec, 2013).

Microscopia de Fuerzas Atómicas (MFA).

Esta última herramienta proporciona información directa con resolución lateral a escala nanométrica, por lo que proporciona gran cantidad de información de la superficie evaluada. Esta técnica de imágenes de superficie, inventada en 1986 (Binnig et al., 1986), consta básicamente de una cabeza óptica que permite detectar la deflexión del cantiléver causada por la topografía de la muestra. La muestra a estudiar se encuentra sobre una superficie plana denominada piezotubo y permite el movimiento de la muestra para realizar barridos de toda su superficie. La cabeza de un microscopio de fuerzas atómicas consiste de un bloque óptico y de una base, ejemplificado en la figura siguiente

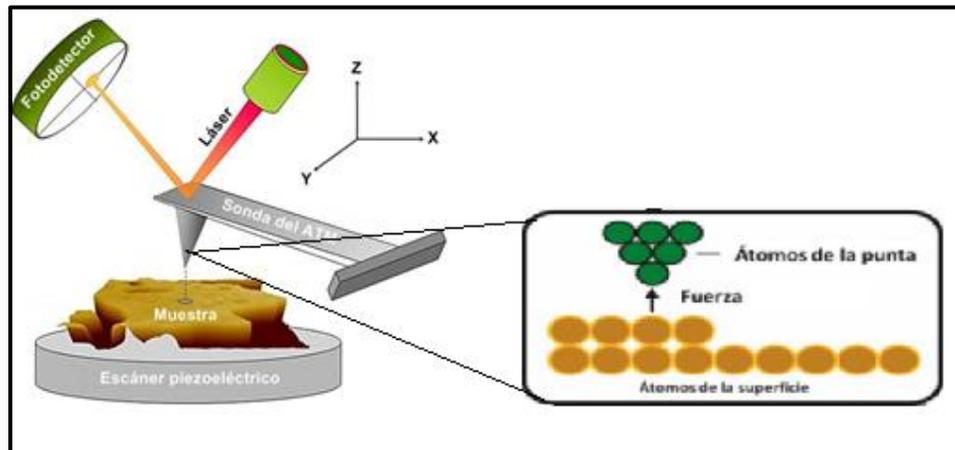


Figura Anexa F 4 Esquema representando al microscopio de fuerzas atómicas. (b) Detección de la señal del láser entre los segmentos verticales A y B del fotodetector. Fuente: Carolina Díaz (2011); <https://histoptica.com/microscopio-de-fuerza-atomica-MFA/>

La muestra es montada sobre el piezotubo el cual permite estudiar la superficie de la muestra en todas direcciones. El bloque óptico contiene una ventana en la parte superior, un diodo láser, espejos y el foto detector (Díaz, 2011).

Bajo esta configuración, el haz del diodo láser que emite variaciones dependiendo del movimiento del cantiléver, refleja la luz desde la punta del cantiléver hasta el fotodetector quien posteriormente envía la señal a un ordenador el cual traduce la señal y la convierte en información e imágenes.

Dos de los modos de trabajo más utilizados son. Modo contacto (Figura Anexa F5): En el cual la muestra entra en contacto con la punta y como consecuencia el cantiléver sufre una deformación. Esta técnica permite obtener dos tipos de imágenes, topográficas y de deflexión, en las imágenes topográficas se obtienen variaciones locales de alturas de los valles presentados en la muestra, mientras que en las imágenes de deflexión se registran los cambios aunados a la deflexión del cantiléver mientras que la altura de escaneo se mantiene constante.

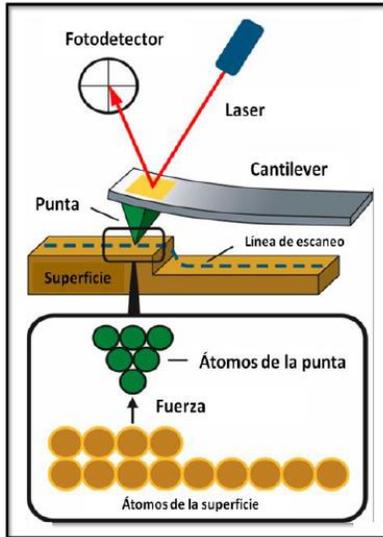


Figura Anexa F 5 Esquema representando el escaneo de la punta del MFA sobre una superficie.
Fuente: Carolina Díaz 2011

Modo intermitente: En el caso del MFA en modo intermitente, la punta del cantiléver genera vibraciones verticales las cuales oscilan a una frecuencia de resonancia constante. Cuando la muestra se aproxima a la punta vibrante, ésta entra en contacto intermitente y como consecuencia genera una alteración de la amplitud vibracional (Díaz 2011). La disminución o la variación de la amplitud son utilizadas para la realimentación al sistema de detección, el cual permite traducir estas señales en información e imágenes superficiales sin la necesidad de existir un contacto con la muestra.

En este modo de operación, la fuerza ejercida entre la interacción punta-muestra es mínima lo cual ayuda a que las superficies blandas sean menos modificadas, es decir este modo de trabajo ayuda a no dañar o modificar las propiedades superficiales de muestras blandas, ya que el corto tiempo de contacto punta-muestra evita la modificación de la superficie (Figura Anexa F6).

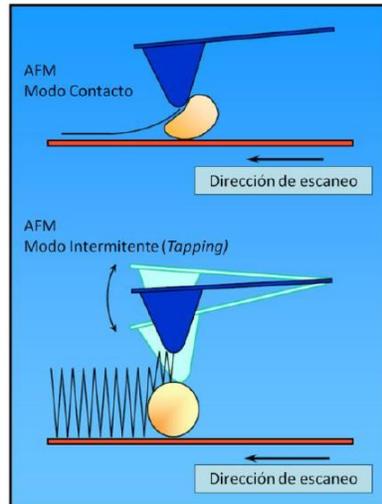


Figura Anexa F 6 Representación de MFA en modo contacto y MFA en modo intermitente (*Tapping*) de una muestra esférica blanda.
Fuente: Carolina Díaz 2011

En las últimas décadas, herramientas en microscopía avanzada como las microscopías de barrido de sonda (SPMs), se han transformado en herramientas esenciales para la caracterización de superficies de materiales. Las principales herramientas utilizadas son la microscopía de barrido de efecto túnel (STM) y la microscopía de fuerzas atómicas (MFA), ambas herramientas permiten visualizar la materia a nivel atómico por lo que sus aplicaciones han incrementado considerablemente.

Además de la potente resolución asociada a la microscopía de barrido de sonda estas poseen una de las principales ventajas respecto a otras técnicas de caracterización superficial a nivel micro y manométrico, por ejemplo comparándose con microscopía electrónica de barrido (MEB), y microscopía electrónica de transmisión (MET), las SPMs son técnicas no destructivas que pueden operar en ambientes ubicuos (aire, vacío, bajo atmósfera de nitrógeno o argón, en medio líquido acuoso, etc), además otorga una fácil preparación de muestras ya que incluso en ocasiones no hace falta ningún tratamiento especial de la muestra para poder realizar el análisis. Estas características confieren la ventaja de estudiar las muestras en su ambiente nativo. Lo cual es una gran ventaja frente a otras técnicas en las que se requiere, por ejemplo, fijar y deshidratar la muestra, trabajar en vacío, etc. Hecho que pone

de manifiesto su gran potencial para investigar muestras biológicas en un rango que se extiende desde células hasta moléculas únicas, tales como ADN o gran variedad de proteínas. La versatilidad del microscopio de fuerzas atómicas nos permite obtener, tanto medidas de rugosidad superficial (microscopio interferométrico y MFA), como la altura de valles o capas y la distribución de estructuras en la superficie estudiada (Meyer, 1992). También permite la medida cuantitativa de diferentes propiedades de los materiales, como, por ejemplo, la respuesta mecánica bajo fuerzas de compresión con resolución en el rango de los piconewtons (modo Espectroscopia de Fuerzas), la detección de cargas estáticas superficiales (modo Potencial de Superficie SPM), la detección y presencia de dominios magnéticos (modo MFM), entre otras funciones más, se puede encontrar más información sobre los principios de MFA y sobre los diferentes modos de operación en la literatura (Meyer, 1992; Bonnell, 1993; Wiesendanger, 1994; Guntherodt et al., 1995; Magonov y Whangbo, 1996; Leggett, 1997).

Microscopia de Barrido Laser Confocal (CLSM).

Otra herramienta utilizada para evaluar las propiedades adhesivas de bacterias, consiste en el uso del (CLSM), el cual combina el microscopio de fluorescencia con imagen electrónica y puntos de luz suministrados por láser dirigido al espécimen en particular para obtener imágenes tridimensionales (Cooper, G. 1997).

Este microscopio ha presentado un número creciente de aplicaciones en biología celular. Que se basan en imágenes de células y tejidos tanto fijos como vivos. De hecho, la tecnología confocal ha demostrado ser uno de los avances más importantes jamás alcanzados en microscopía óptica.

Los componentes fundamentales de este microscopio consisten en:

- Fuente luminosa: Luz amplificada por emisión estimulada de radiación láser
- Espejo dicróico: Refleja totalmente la luz que incide con un ángulo de cerca de 45°. El término dicróico proviene de dicróismo del griego dichromatismós y es la propiedad de presentar de manera alternativa dos coloraciones según la dirección de los rayos de luz incidentes.
- Ranura detectora Pinhole: Esta ranura sólo permite el paso de la luz reflejada por el plano focal.

-Lente objetivo: Permite enfocar el rayo de luz reflejado por el espejo dicroico hacia el plano focal de la muestra.

-Detector. Recibe el haz de luz y genera una imagen (<https://histoptica.com/microscopio-confocal-o-laser-de-barrido/>.)

La Figura Anexa F7 muestra los componentes y el modo de operación básico del microscopio de barrido laser confocal.

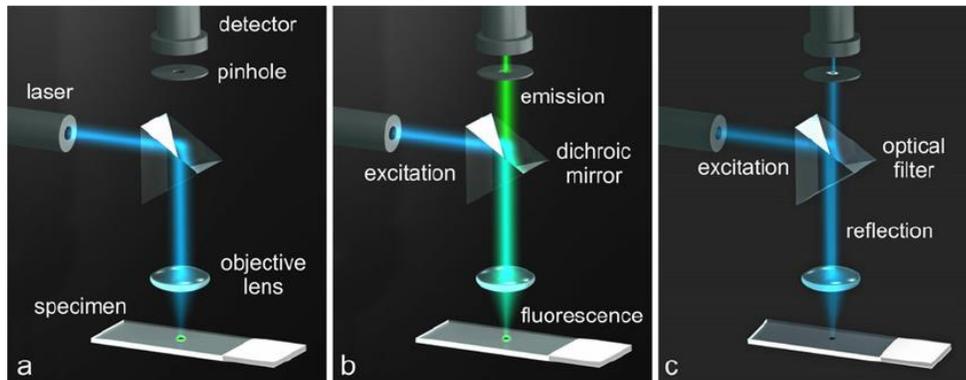


Figura Anexa F 7 Imagen A: Representaciones de barrido láser confocal, propiedades de reflexión de luz. Imagen B: Espejo dicroico y objetivo que excitan el tinte fluorescente en el espécimen. Imagen C: La luz fluorescente emitida. Fuente: <https://histoptica.com/microscopio-confocal-o-laser-de-barrido/>

Uno de los principios de funcionamiento del equipo se basa en el fenómeno físico de la fluorescencia. La fluorescencia es un fenómeno de procesos luminiscentes que se basa en la capacidad que tiene una sustancia susceptible para absorber luz, y como consecuencia liberar fotones de estados excitados electrónicamente después de un tiempo determinado (Figura Anexa F8). Los procesos fotoluminiscentes se subdividen en fluorescencia y fosforescencia, los cuales son procesos que se generan a través de la excitación que es inducida mediante mecanismos físicos, mecánicos o químicos (Ishikawa-Ankerhold, Ankerhold y Drummen, 2012).

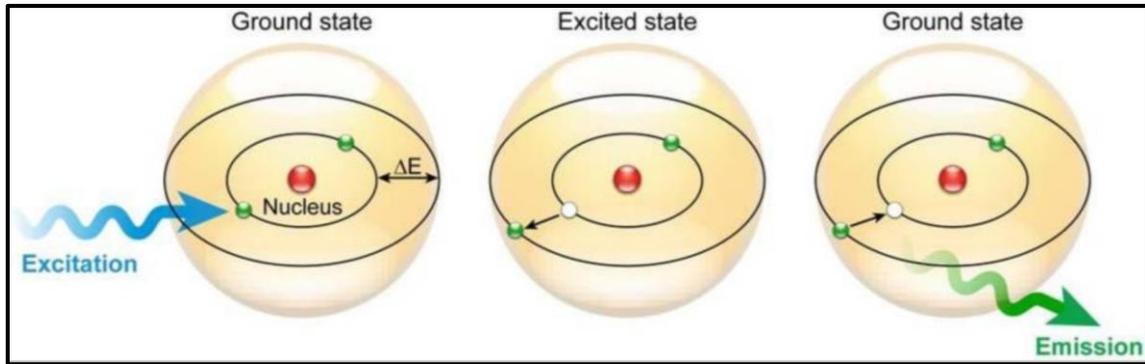


Figura Anexa F 8 Principio de fluorescencia, modelo clásico de Bohr. La absorción de un cuanto de luz (azul) hace que un electrón se mueva a una órbita de mayor energía "estado excitado" durante un tiempo determinado, cuando el electrón vuelve a su órbita original y el fluorocromo disipa el exceso de energía emitiendo un fotón (verde). Fuente: Ishikawa-Ankerhold, Ankerhold, Drummen, (2012)

Los compuestos que muestran propiedades fluorescentes generalmente se denominan sondas o tintes fluorescentes y, de hecho, el término "fluorocromo" es el más apropiado.

A menudo, "fluorocromo" y "fluoróforo" se usan de manera indiscriminada. Sin embargo es importante hacer una distinción entre uno y otro, ya que el término fluoróforo se refiere a moléculas que se conjugan covalentemente o por adsorción a macromoléculas biológicas, como ácidos nucleicos, lípidos o proteínas mientras que los fluorocromos se conjugan con moléculas orgánicas (colorantes), iones inorgánicos (p. Ej., Iones lantánidos como Eu, Tb, Yb, etc.), proteínas fluorescentes (p. Ej., Proteína fluorescente verde) y átomos como el mercurio gaseoso (Phillips 2010).

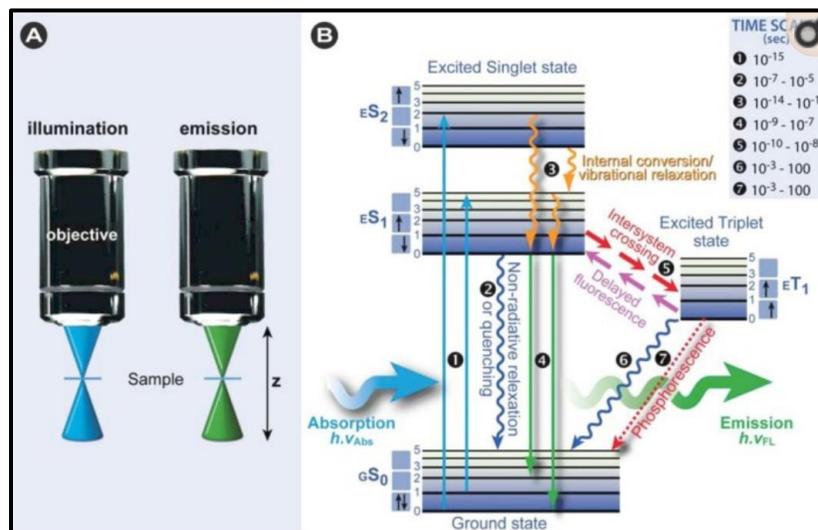


Figura Anexa F 9 Imagen (A), sistema de detección Excitación/Emisión. Imagen (B) Excitación de un solo fotón. Fuente: Ishikawa-Ankerhold, Ankerhold, Drummen, (2012)

La imagen anterior, Imagen (A) muestra la luz emitida o fluorescencia, la cual es detectada a través del objetivo del microscopio confocal. Imagen (B) Diagrama de Jabłoński: un electrón que abandona el estado fundamental GS 0 (singlete electrónico) cuando se absorbe un cuanto de luz (un solo fotón) y se desplaza a un estado excitado más alto, se relaja rápidamente a un estado excitado vibracional más bajo (línea naranja) y por lo tanto pierde energía. Cuando regresa al estado fundamental, disipa la energía restante emitiendo un fotón con una longitud de onda más larga, es decir emisión de fluorescencia. Se muestran los giros de los electrones en los estados singletes (giros antiparalelos pareados o no apareados) en comparación con el estado triplete (giro no apareado, paralelo). Se dice que el cruce entre sistemas de ES 1 \rightarrow ET 1 requiere conversión por giro.

Para lograr que el equipo pueda detectar la emisión de luz correspondiente a cada fluoroforo o fluorocromo es necesario usar fuentes poderosas para excitar las muestras (Figura Anexa F9, imagen A). Se utiliza comúnmente un haz de luz proveniente de un rayo láser que se hace pasar a través del pinhole, posteriormente el haz se canaliza a través del lente objetivo el cual ayuda a enfocar la muestra. La luz emitida por la muestra (Figura Anexa F9, imagen B) es filtrada mediante el pinhole que no permite el paso de la fluorescencia originada por los planos fuera de foco entonces sólo la luz del plano focal es la que podrá ser recibida por el lente objetivo, por lo que será la única que llegue al detector. Inicialmente este tipo de técnica permitía observar claramente un sólo punto por lo cual fue necesario hacer un barrido de la muestra, esto implica un mayor tiempo para obtener una imagen completa.

Wilson, (1984); White, (1987) mencionan que para acelerar la velocidad de obtención de la imagen se utilizan espejos que oscilan sobre la muestra, esto ayuda a que el haz de luz recorra rápidamente sobre la superficie de la muestra. Estos espejos permiten construir la imagen en menos de 1 segundo. Otros equipos utilizan un sistema que permite obtener información de la muestra mediante líneas en lugar de puntos, esto se basa en el uso de rendijas las cuales aceleran el proceso de barrido (Figura Anexa F10). Actualmente estos microscopios se complementan con el procesamiento digital de imágenes dando como resultado la construcción tridimensional de las muestras (Lichtman, 1994).

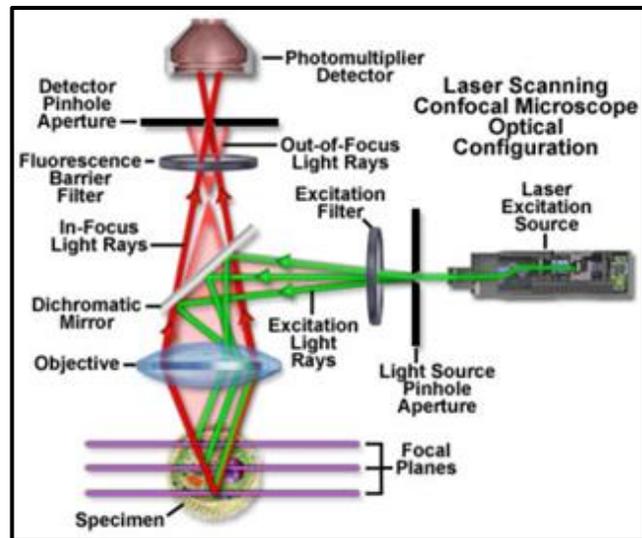


Figura Anexa F 10 Obtención de imagen "barrido" de muestras en microscopia confocal
Fuente: www.olympus-lifescience.com

Existen varias técnicas o modos de trabajo de este equipo, los más utilizados son: La recuperación de fluorescencia después del blanqueo fotoeléctrico (FRAP), la pérdida de fluorescencia relacionada en el fotodecoloramiento (FLIP), la localización de la fluorescencia después del blanqueo fotoeléctrico (FLAP), Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia o Förster (FRET) y las diferentes formas de medir FRET, como el blanqueador aceptor, la emisión sensibilizada, la anisotropía de polarización y la microscopía de imagen de vida de fluorescencia (FLIM) (Ishikawa-Ankerhold, Ankerhold, y Drummen, 2012). Sin embargo existe otra técnica de estudio que es de suma importancia para este estudio particular. El análisis cuantitativo de co-localización (QCA) es un método para estimar el grado de colocación de antígenos en imágenes de microscopía de inmunofluorescencia confocal multicolor. La co-localización se observa cuando se tiñen dos o más antígenos en la misma sección, marcados por los anticuerpos correspondientes con diferentes espectros de excitación y emisión, por lo tanto, se visualizan en diferentes colores, se superponen. Aunque la co-localización es una mera coexistencia de moléculas en una ubicación física muy cercana, puede proporcionar pistas valiosas que aclaran sus características comunes. Sin embargo, la aplicabilidad científica de la co-localización observada en sí misma es limitada porque el ojo la percibe de manera diferente y, por lo tanto, con frecuencia puede ser engañosa (Zinchuk y Zinchuk, 2008), por lo que es necesario

realizar un estudio cuantitativo con ayuda de un software especializado que calcule una serie de coeficientes de co-localización para comprender en detalle la co-localización observada, o incluso realizar un estudio de espectros de emisión para comprobar el fenómeno de co-localización.

FTIR

Como última herramienta con capacidad de proporcionar información para identificar un compuesto e investigar la composición de una muestra, se utilizó FTIR, cuyo particular interés consiste en identificar los cambios en enlaces químicos implicados en la adhesión bacteriana sobre la superficie fúngica, este equipo trabaja con la parte infrarroja del espectro electromagnético como se muestra en la siguiente Figura.

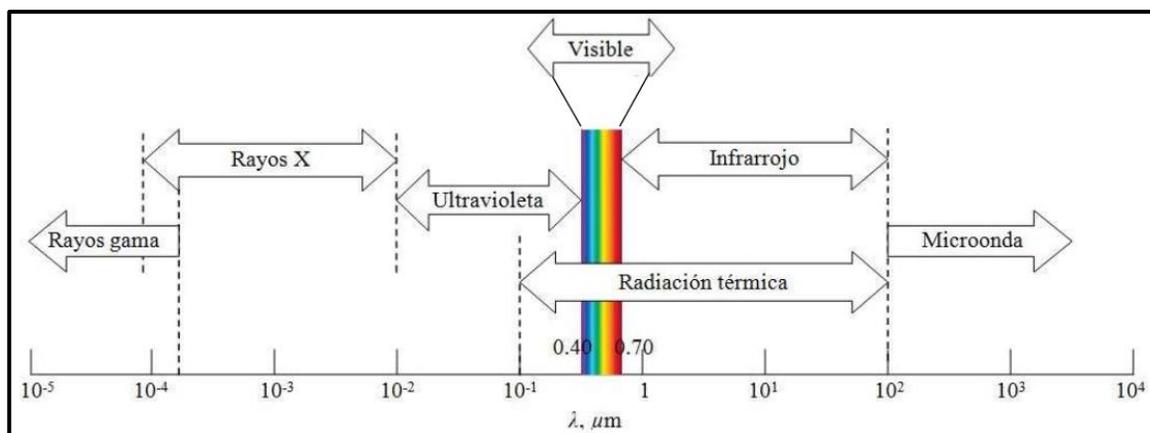


Figura Anexa F 11 Espectro electromagnético y longitudes de onda respectivas a cada región.
Fuente: https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5a43b7c09fdc1

FT-IR cubre un conjunto de técnicas, siendo la más común una forma de espectroscopia de absorción. La radiación infrarroja se encuentra en el intervalo de 13000 y 10 cm^{-1} o, entre 0.77 y $1000\text{ }\mu\text{m}$. El espectro infrarrojo se clasifica en tres intervalos (Mondragón 2017; Quinteiro, 2000): infrarrojo cercano (2.5 a $1\text{ }\mu\text{m}$), infrarrojo medio (25 a $2.5\text{ }\mu\text{m}$) e infrarrojo lejano (100 a $25\text{ }\mu\text{m}$) (Figura Anexa F12), ésta clasificación se basa en las diversas aplicaciones que ofrece la espectroscopia infrarroja, sin embargo el infrarrojo medio representa la longitud a la cual se presentan las vibraciones moleculares primarias y es donde se han encontrado las principales aplicaciones fundamentales, por lo cual en este trabajo se utiliza este intervalo como zona de interés.

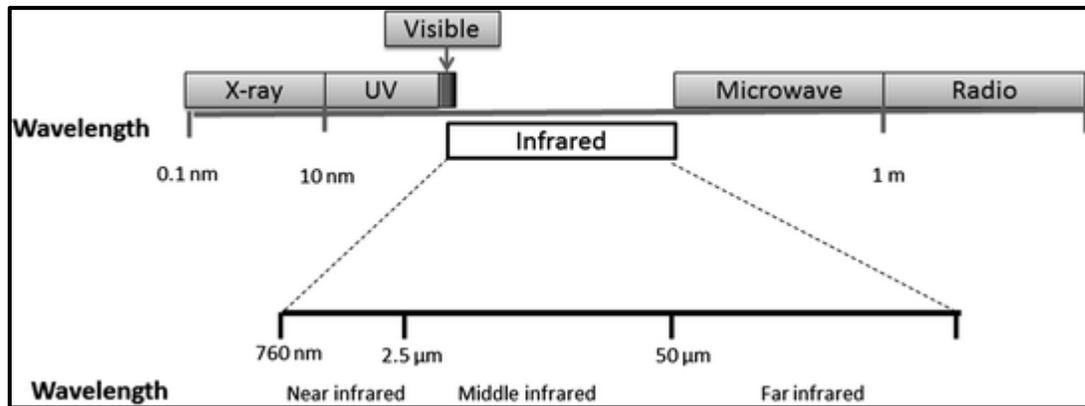


Figura Anexa F 12 Subdivisiones del espectro infrarrojo. Fuente: Priego, (2017)

La espectroscopia es el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética, con la debida absorción y emisión de energía radiante de la materia estudiada. El resultado de la interacción proporciona información útil sobre la sustancia involucrada.

La radiación electromagnética puede interaccionar con la materia de diversas formas por ejemplo reflectándose sobre la muestra, absorbiéndose o transmitiéndose, incluso la radiación electromagnética, puede provocar cambios a nivel atómico y a nivel molecular (Costa 2005).

Por ejemplo a nivel atómico los fotones incidentes pueden excitar a los electrones de los átomos de la muestra, Costa (2005) menciona que en mecánica cuántica un estado excitado de un sistema (como un electrón, núcleo atómico, átomo, o molécula) es cualquier estado cuántico metaestable, que goza de una mayor energía que el estado fundamental es decir, más energía que el mínimo absoluto el cual en este caso puede tratarse de la radiación infrarroja sobre la muestra, posteriormente la energía decae espontáneamente hacia el estado fundamental del sistema, como consecuencia cuando vuelven de su estado excitado a su estado basal, se emite energía en forma de luz.

La radiación electromagnética puede ser absorbida por las moléculas de la muestra provocando una excitación que puede ser de varios tipos: electrónica, rotacional, vibracional o con orientación (Mondragón, 2017). Para que se produzca una vibración en una molécula al incidir sobre ella un haz de energía infrarroja es necesario la presencia de momentos dipolares (Peter-Atkins, 2009). Sí el momento dipolar es nulo no hay absorción de energía infrarroja, caso contrario con solo existir un cambio en el momento dipolo, habrá absorción de energía infrarroja.

En función al tipo de vibración se han descrito más de 6 modos vibraciones que ocurren dependiendo de las relaciones específicas con otros grupos adjuntos, por ejemplo hay vibraciones de tensión o de estiramiento y de flexión o bandeo (Mondragón, 2017).

Por lo tanto, una molécula, cuando se expone a la radiación producida por la emisión térmica de una fuente caliente (una fuente de energía IR), absorbe solo en las frecuencias correspondientes a sus modos moleculares de vibración en la región del espectro electromagnético entre visible (rojo) y Ondas cortas (microondas) (Margarita, y Quinteiro, 2000). Estos cambios en el movimiento vibratorio dan lugar a bandas en el espectro vibratorio; Cada banda espectral se caracteriza por su frecuencia y amplitud (Sacksteder y Barry, 2001).

El interferograma es el nombre del formato de la señal adquirida por un espectrómetro de infrarrojo y es una señal compleja para poder ser analizada. Sin embargo, este formato puede ser trasladado a lo que se conoce como un espectro de infrarrojo, por medio de un algoritmo llamado transformada de Fourier, el cual fue desarrollado en el año de 1965, y desde ese entonces hasta la fecha con el desarrollo de los sistemas computacionales (hardware y software) ha sido la fuerza impulsora para la amplia aplicación de los espectrómetros de infrarrojo (Margarita y Quinteiro 2000; Naumann et al., 1991; Dilek et al. 2009). La región del espectro situada entre 4000 y 1400 cm^{-1} (región de grupo funcional), es de gran utilidad para la identificación de la mayoría de los grupos funcionales presentes en las moléculas orgánicas. Las absorciones que aparecen en esta zona, provienen fundamentalmente de las vibraciones de estiramiento. La zona situada entre 1400 y 600 cm^{-1} (zona de huella dactilar), es por lo general, compleja, debido a que en ella aparece una combinación de vibraciones de alargamiento, así como de flexión (Smith, 2011). Cada compuesto tiene una absorción característica en esta región, por esta razón a esta parte del espectro se denomina como la región de las huellas dactilares (Naumann, 1998).

El espectro de infrarrojo es un dibujo compuesto por bandas o picos, en donde en el eje de las abscisas (o de las X) están representados todos los valores del intervalo de longitud de onda del infrarrojo medio, ya sea en número de onda (cm^{-1}) o de longitud de onda (nanómetros). Mientras que en el eje de las ordenadas (o de las Y) están representados los valores de la intensidad de absorción o transmisión. Cada pico en un espectro de infrarrojo representa un específico tipo de vibración. Por lo tanto, se puede decir que el espectro es una

representación de los estados excitados producidos al hacer un barrido en todo el intervalo de longitudes de onda en el infrarrojo medio.

16. Anexo G

Presentación en congresos.

ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES FÍSICOQUÍMICAS Y ECOLÓGICAS EN LOS MECANISMOS DE ANTAGONISMO ENTRE HONGOS OCRATOXIGÉNICOS PRESENTES EN CEREZAS DE CAFÉ Y BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Josue Uriel Amador Hernandez^a, Roberto Lazzarini Lechuga^b, Angélica Román Guerrero^a, Isabelle Gaime-Perraud^c, Gabriela M. Rodríguez Serrano^a, Gerardo Saucedo Castañeda^a

^a Depto. de Biotecnología, ^b Depto. Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, ^c Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Francia
ibqi.uriel@live.com.mx, saucedo@xanum.uam.mx

Resumen

El objetivo de este trabajo es limitar el desarrollo del hongo *Aspergillus carbonarius* y la producción de ocratoxina A en frutos de café, con la aplicación de bacterias lácticas del género *Lactobacillus*. Para este propósito, se estudian los mecanismos involucrados en el antagonismo entre ambos microorganismos. Primero se determinó que tipo de interacción presentan ambos microorganismos al estar en un mismo hábitat, utilizando microscopía de campo claro se encontró que la interacción predominante es la adhesión bacteriana sobre la superficie de la spora fúngica, este fenómeno inhibe la germinación de la spora fúngica. Por otra parte, se estudió el potencial Z de ambos microorganismos para determinar si la adhesión se da por un fenómeno electroquímico, el resultado fue que ambos microorganismos tienen cargas negativas de (-2 a -20 mV) en pH de 2 a 7, por lo que la adhesión no se explica por un fenómeno electroquímico. Considerando la teoría DLVO se evaluó el efecto de $AlCl_3$ 0.007M para alterar la fuerza iónica del medio y así modificar la carga superficial de los microorganismos a valores positivos, el resultado fue que al agregar $AlCl_3$ la carga de la bacteria y el hongo se vuelven positivas con magnitudes de 22 y 16.4 mV, respectivamente. Por lo que será posible favorecer una atracción electroquímica entre ambos microorganismos para fomentar el biocontrol del hongo micotoxigénico. Otro mecanismo de adhesión es por adhesinas que será analizado con microscopía confocal, pero como primer paso se comprobó que los blancos (medios de cultivo y microorganismos) no autofluorescen.

Introducción

En la actualidad más de 80 países cultivan el café en sus diferentes tipos, de los cuales poco más de 50 países lo exportan, esto se traduce en que el café es uno de los principales productos aportadores de divisas (8.6 billones de pesos en 2012) a los países relacionados en su cultivo, procesamiento y comercio, además de generar más de 3 millones de empleos, por lo que el café es considerado un producto de gran importancia en el comercio mundial.

Sin embargo, durante más de 50 años se han detectado la presencia de micotoxinas producidas por microorganismos del género *Aspergillus*, que contaminan, diversos alimentos, no solo el café. El problema se agrava en el procesamiento por vía seca [1]. Las micotoxinas están, asociadas a diversos trastornos de tipo neurotóxico, genotóxico, teratogénico, nefrotóxico, entre otras [2], por lo que, es considerado un problema de salud pública. Por lo anterior, se ha propuesto el uso de bacterias del género *Lactobacillus* como microorganismos antagónicos ya que tiene la capacidad de producir biomoléculas como ácidos orgánicos, péptidos, exopolisacáridos capaces de limitar el desarrollo del hongo micotoxigénico [3]

Metodología

Para el estudio de interacción entre ambos microorganismos se utilizaron portaobjetos con dos cavidades, inoculados con una suspensión de esporas de *Aspergillus* (1×10^6 esp/ml) y un 10% v/v de suspensión de bacterias lácticas, posteriormente se visualizó en un microscopio óptico OLYMPUS modelo BX40F4. En el caso del estudio de potencial Z, una vez crecidos los microorganismos se procedió a eliminar los medios de cultivo centrifugando las esporas a 10,000 rpm durante 5 min a 4 °C y las bacterias a 6000 rpm durante 5 min a 4°C retirando el medio por decantación. Posteriormente, se resuspendieron los microorganismos en los buffers a estudiar, seguidamente se llevó a cabo la lectura en el equipo Zetasizer nano series (nano-ZS). Para la evaluación del efecto de $AlCl_3$ 0.007M se utilizó la misma técnica con la única diferencia que al retirar el medio de cultivo se volvió a resuspender los microorganismos en la solución de $AlCl_3$ 0.007M. Por último, para la evaluación de autofluorescencia se prepararon medios de cultivo PDA y MRS como lo recomienda el fabricante para posteriormente crecer al hongo y la bacteria respectivamente; bajo las siguientes condiciones, hongo: incubado 30°C durante 14 días, bacteria incubado a 30°C durante 24h en condiciones anaerobias. Posteriormente, las muestras fueron visualizadas usando microscopía confocal.

Resultados

La Figura 1 muestra los resultados de potencial Z (carga superficial) en unidades de mV, en función del pH. Se observa que al aumentar el pH el valor del potencial negativo aumenta, siendo el mismo comportamiento para ambos microorganismos. De igual manera se muestra el efecto del electrolito $AlCl_3$ sobre la carga superficial de los microorganismos, se observa un cambio en la carga superficial de ambos microorganismos pasando de valores negativos a positivos.

La Figura 2, muestra las micrografías realizadas con microscopía confocal a 3 diferentes longitudes de onda de excitación y emisión. Se observa que ningún microorganismo presenta auto fluorescencia. Lo cual sugiere que esta técnica será muy útil para evaluar las interacciones bacteria hongo filamentoso.

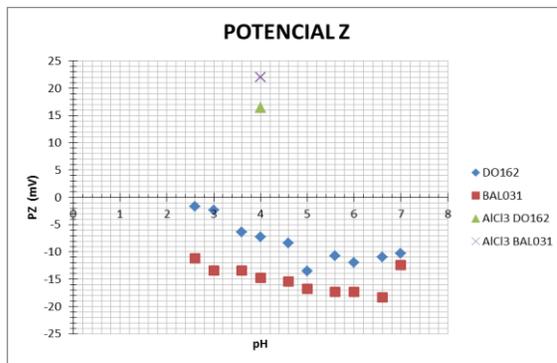


Figura 1. Potencial Z en función del pH y el efecto del $AlCl_3$ sobre el potencial Z

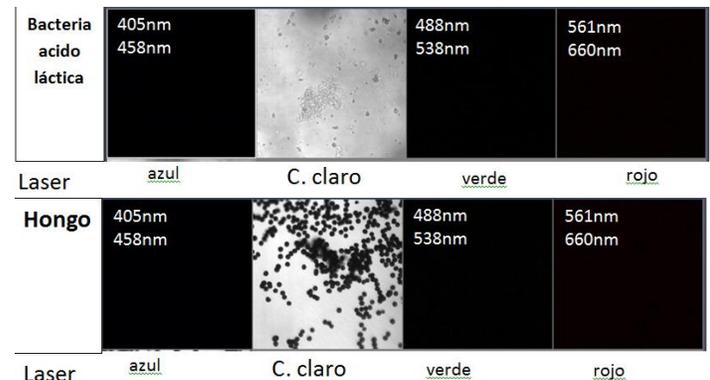


Figura 2. Micrografías de microscopía confocal y campo claro de bacterias lácticas y hongos micotoxigénicos evaluando el efecto de autofluorescencia.

Conclusiones

La carga superficial de ambos microorganismos es negativa y esto no explica la adhesión por fenómeno electroquímico, el electrolito $AlCl_3$ 0.007M es efectivo para modificar el potencial Z a valores positivos.

Ningún microorganismo y medio de cultivo presentan auto fluorescencia lo que hace ideal para visualizar estructuras muy particulares de cada microorganismo, como adhesinas, marcadas con trazadores fluorescentes usando técnicas inmunoquímicas.

Referencias

1. - Hongyin Zhang, Maurice Tibiru Apaliya, Gustav K. Mahunu, Liangliang Chen, Wanhai Li, “Control of ochratoxin A-producing fungi in grape berry by microbial antagonists: A review”, *Trends in Food Science & Technology*, 2016
2. - Irène Ahou Kouadio, Louis Ban Koffi, Jean Gnopo Nemlin, Mireille Bretin Dosso, “Effect of Robusta (*Coffea canephora* P.) coffee cherries quantity put out for sun drying on contamination by fungi and Ochratoxin A (OTA) under tropical humid zone (Côte d’Ivoire)”, *Food and Chemical Toxicology*, 2012.
3. - Nora Laref, Bettache Guessas and Mebrouk Kihal, “Antifungal Compounds Production in Different Temperatures, pH and on Modified MRS Agar by Lactobacillus Strains” *Journal of Biological Sciences*, 13: 94-99. 2013.



AMIDIQ
Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química (AMIDIQ)
Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A:

JOSUE URIEL AMADOR HERNANDEZ, Roberto Lazzarini Lechuga, Angélica Román Guerrero, Isabella Gaime-Perraud, Gabriela Maria Rodríguez Serrano, Gerardo Saucedo Castañeda

Por la presentación del trabajo:

ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES FISIQUÍMICAS Y ECOLÓGICAS EN LOS MECANISMOS DE ANTAGONISMO ENTRE HONGOS OCRATOXIGÉNICOS PRESENTES EN CEREZAS DE CAFÉ Y BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

ID: 448

“La Ingeniería Química como motor de la innovación”

XXIX ENCUENTRO NACIONAL DE LA AMIDIQ

Dr. Juan Gabriel Segovia Hernández
PRESIDENTE DEL COMITÉ ORGANIZADOR

Dr. Angélica Román Guerrero
PRESIDENTE NACIONAL AMIDIQ

Dr. Tomás Viveros García
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO

San José del Cabo, B.C.S., México 1 al 4 de Mayo de 2018

Campus Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas
Departamento de Ingeniería Química

ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE LA ADHESIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS SOBRE ESPORAS DE *A. carbonarius* COMO MECANISMO DE BIOCONTROL.

Josue Uriel Amador Hernandez^a, Roberto Lazzarini Lechuga^b, Angélica Román Guerrero^a, Isabelle Gaimé-Perraud^c, Gabriela M. Rodríguez Serrano^a, Gerardo Saucedo Castañeda^a

^a Depto. de Biotecnología, ^b Depto. Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, ^c Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Francia
ibqi.uriel@live.com.mx, saucedo@xanum.uam.mx

Resumen

El objetivo de este trabajo es estudiar en parte, los mecanismos para limitar el desarrollo de *Aspergillus carbonarius* y su producción de ocratoxina A en cereza de café, con bacterias lácticas. Para este propósito, se estudió la interacción entre ambos microorganismos mediante microscopía electrónica de barrido y se encontró que las bacterias se adhieren sobre la superficie de las esporas con la consecuente inhibición de su germinación. Para explicar en parte los mecanismos involucrados en este fenómeno, se utilizó la microscopía de fuerzas atómicas que permitió determinar la rugosidad superficial ($R_a = 54.06-153.71$ nm) de las esporas de *Aspergillus carbonarius*. Este fenómeno de adhesión también puede ser explicado mediante la interacción con moléculas específicas, por lo que se realizó un estudio de caracterización química superficial, al estar en contacto ambos microorganismos, por espectroscopia infrarroja para determinar las biomoléculas que participan en la adhesión pueden ser proteínas, polisacáridos y lípidos principalmente. Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan información para explicar en parte lo que sucede en entre la interacción bacteria-espora, sin perder de vista que la adhesión está en función de distintos factores.

Introducción

El café es una importante fuente de divisas, aporta un aproximado de 25 000 millones de dólares a nivel mundial. Más del 90% de la producción de café tiene lugar en los países en desarrollo, en su mayoría de América del Sur [1], por lo que el café es considerado un producto de gran importancia en el comercio mundial. Sin embargo, durante más de 50 años se han detectado la presencia de micotoxinas producidas por microorganismos del género *Aspergillus*, que contaminan, diversos alimentos, no solo el café. En este último, la presencia de ocratoxina A (OTA), el problema se agrava en el procesamiento por vía seca o natural [2]. Las micotoxinas, como la OTA, están, asociadas a diversos trastornos de tipo neurotóxico, genotóxico, teratogénico, nefrotóxico, entre otras [3], por ello, su presencia en alimentos es considerada un problema de salud pública. Con este antecedente, se propuso el uso de bacterias del género *Lactobacillus* como microorganismos antagónicos ya que tiene la capacidad de producir biomoléculas como ácidos orgánicos, péptidos, exopolisacáridos, entre otros, capaces de limitar el desarrollo del hongo micotoxigénico y la producción de la OTA [4]

Metodología

El estudio de rugosidad en microscopía de fuerzas atómicas (AFM) se utilizaron esporas de *A. carbonarius* las cuales fueron fijadas con glutaraldehído durante 24 h y se lavaron con

amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4. Posteriormente se adicionó tetraóxido de osmio como último fijador y se realizó una deshidratación celular con concentraciones crecientes de etanol (30-100%), posteriormente las células deshidratadas se colocaron en cápsulas de celulosa, para su posterior secado con CO₂ al punto crítico. Una vez secas las esporas fueron adheridas con ayuda de cinta doble carbón a un porta muestras de 25 mm tipo PIN y se recubrió con oro 60s x 4 tiempos, y se analizó en AFM modo tapping. Para la preparación de muestras en espectroscopia infrarroja se cultivaron las bacterias lácticas en medio MRS durante 24 h y las esporas de *A.carbonarius* en medio PDA durante 7 días, ambos a 30°C. Posteriormente se preparó un co-cultivo de bacterias lácticas (1x10⁷ cel/ml) y esporas (1x10⁷ esp/ml) en solución isotónica estéril. Se agregó 0.5-1ml del co-cultivo en portaobjetos de 25.4 x 76.2mm, se dejó secar el líquido a temperatura ambiente durante 24, posteriormente se realizó el análisis en infrarrojo a longitud de onda media (1500-4000 cm⁻¹).

Resultados

Los parámetros de rugosidad estimados donde Ra= 54nm (promedio aritmético de los valores absolutos de las alturas) y Rrms =72nm (promedio de las desviaciones cuadráticas respecto a la altura media) representan la rugosidad superficial respectiva a la superficie de esporas fúngicas determinado en AFM. La Figura 1 muestra el espectrograma característico de la composición química superficial de bacterias, lácticas, esporas fúngicas y la interacción bacteria-espora, analizadas en la región media del espectro infrarrojo. La Figura 2, representa el análisis de componentes principales de los espectros infrarrojos estudiados

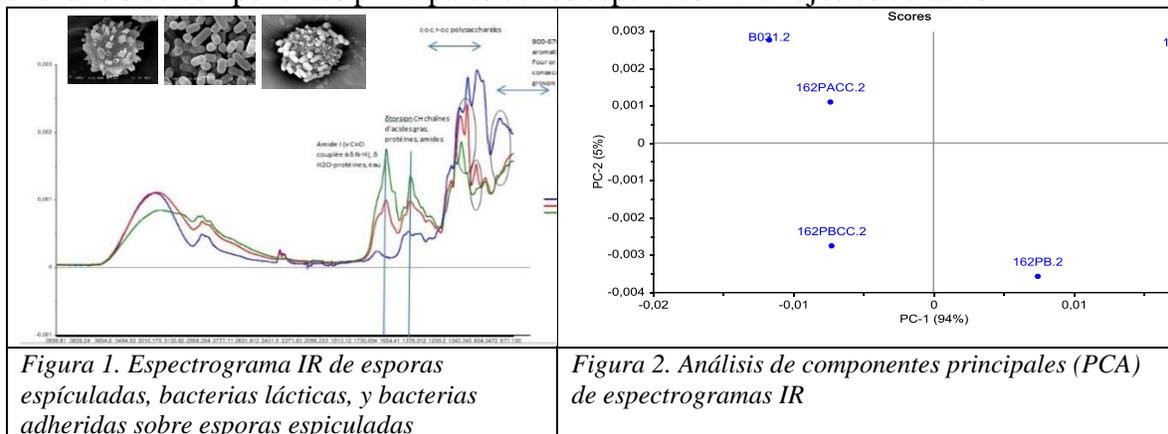


Figura 1. Espectrograma IR de esporas espiculadas, bacterias lácticas, y bacterias adheridas sobre esporas espiculadas

Figura 2. Análisis de componentes principales (PCA) de espectrogramas IR

Conclusiones

La rugosidad superficial de las esporas se estimó como Ra = 54 , se considera que es una superficie rugosa que puede favorecer la aglomeración bacteriana; sin embargo las propiedades de la célula bacteriana juegan un papel fundamental en la adhesión y de ellas depende que el anclaje sea reversible o irreversible y esto es de suma importancia ya que de esto depende el biocontrol, es así que con ayuda de espectroscopia infrarroja se pudo detectar cambios en enlaces químicos respectivos a proteínas superficiales, polisacáridos y ácidos grasos cuando las bacterias están adheridas sobre la superficie de la espora fúngica. Estos resultados son apoyados mediante el análisis de componentes principales, lo que implica que estas moléculas están implicadas en la adhesión superficial entre ambos microorganismos, por lo que esta información puede ayudar a determinar el mecanismo antagónico que llevan a cabo las bacterias y contribuir a generar una solución tecnológica.

Referencias

1. - Ponte, Stefano, "La revolución de Latte. Regulación, mercados y consumo en la cadena global del café", *Desarrollo mundial*, 30: 1099-1122, 2017.
2. - Hongyin Zhang, Maurice Tibiru Apaliya, Gustav K. Mahunu, Liangliang Chen, Wanhai Li, "Control of ochratoxin A-producing fungi in grape berry by microbial antagonists: A review", *Trends in Food Science & Technology*, 2016.
3. - Irène Ahou Kouadio, Louis Ban Koffi, Jean Gnopo Nemlin, Mireille Bretin Dosso, "Effect of Robusta (*Coffea canephora* P.) coffee cherries quantity put out for sun drying on contamination by fungi and Ochratoxin A (OTA) under tropical humid zone (Côte d'Ivoire)", *Food and Chemical Toxicology*, 2012.
4. - Nora Laref, Bettache Guessas and Mebrouk Kihal, "Antifungal Compounds Production in Different Temperatures, pH and on Modified MRS Agar by *Lactobacillus* Strains" *Journal of Biological Sciences*, 13: 94-99. 2013.





Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00260
Matrícula: 2163802062

ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES FÍSICOQUÍMICAS Y ECOLÓGICAS EN LOS MECANISMOS DE ANTAGONISMO ENTRE HONGOS OCRATOXIGÉNICOS PRESENTES EN CEREZAS DE CAFÉ Y BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 17 del mes de julio del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO
MTRO. ROBERTO CARLOS LAZZARINI LECHUGA
DRA. ISABELLE GAIME PERRAUD
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

JOSUE URIEL AMADOR HERNANDEZ
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA
DE: JOSUE URIEL AMADOR HERNANDEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO

VOCAL

MTRO. ROBERTO CARLOS LAZZARINI LECHUGA

VOCAL

DRA. ISABELLE GAIME PERRAUD

SECRETARIA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO