



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

TIPIFICACIÓN FENOTÍPICA Y
MOLECULAR DE CEPAS DE
Streptococcus spp. Y *Enterococcus* spp.
AISLADOS DE POZOL PROCEDENTE DE
VILLAHERMOSA TABASCO MÉXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

**LUIS ANTONIO BECERRIL
SÁNCHEZ**

Tutora: Dra. María del Carmen Wachter Rodarte



MÉXICO, D. F. SEPTIEMBRE 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS.

En el desarrollo de este proyecto de tesis fue muy importante la participación y el apoyo de diferentes personas que aportaron sus conocimientos, material biológico y la crítica equilibrada para enriquecer mi formación como estudiante de la maestría en ciencias bioquímicas.

Para mi directora de tesis, la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte por aceptarme como su alumno, por sus constantes enseñanzas, la gran confianza que tuvo en mí, el apoyo incondicional hacia el proyecto de tesis y su invaluable amistad.

Para la Dra. Gloria Díaz Ruiz por su asesoría en temas metodológicos y sus valiosas opiniones.

Para la Dra. Teresita Sainz Espuñes por la contribución de las cepas de origen clínico, y sus valiosas críticas y reflexiones.

Para el Dr. Carlos Eslava Campos por su asesoría metodológica, su contribución en material biológico y de laboratorio, pero principalmente por su amable y sensible crítica al trabajo de tesis que fue una importante aportación a mi formación.

Para la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch y la Dra. Bertha González Pedrajo que formaron parte del Comité tutorial que durante cuatro semestres evaluó el trabajo experimental y contribuyó a incrementar mis capacidades profesionales con su labor crítica.

Para el grupo de investigadores que formaron parte del jurado, citados en el presente documento, que revisó el escrito de tesis en forma y fondo mismos que contribuyeron de manera notable en la mejora de la tesis y sobre todo en aportarme sus evaluaciones, críticas y reflexiones que estimularon un crecimiento profesional importante.

Para el CONACYT por otorgarme una beca durante el posgrado y la CEP-UNAM que aportó recursos mediante el Programa de Fomento a la Graduación.

ÍNDICE.

	Página
RESUMEN.	5
1. INTRODUCCIÓN.	6
1.1. Antecedentes históricos.	6
1.2. Características fenotípicas del género <i>Streptococcus</i> .	8
1.3. Características fenotípicas del género <i>Enterococcus</i> .	9
1.4. Filogenia de <i>Streptococcus</i> y <i>Enterococcus</i> .	9
1.5. Especies y grupos de especies en <i>Streptococcus</i> .	10
1.6. Identificación de las especies de <i>Streptococcus</i> .	10
1.7. Hábitat y enfermedades asociadas a <i>Streptococcus</i> .	10
1.8. Factores de virulencia en el género <i>Streptococcus</i> .	13
1.8.1. Adhesinas.	13
1.8.2. Enzimas.	14
1.8.3. Antifagocitosis.	14
1.8.4. Super-antígenos y otros componentes tóxicos.	15
1.9. Especies y grupos de especies en el género <i>Enterococcus</i> .	15
1.10. Identificación de las especies de <i>Enterococcus</i> .	16
1.11. Hábitat y enfermedades causadas por enterococos.	17
1.12. Factores de virulencia en el género <i>Enterococcus</i> .	19
1.12.1. Citolisinas.	19
1.12.2. Proteasas.	20
1.12.3. Superóxido extracelular.	20
1.12.4. Adherencia a los tejidos del hospedero.	20
1.13. Resistencia a los antibióticos en <i>Streptococcus</i> y <i>Enterococcus</i> y otras bacterias ácido lácticas asociadas a los alimentos.	21
1.13.1. Aspectos generales.	21
1.13.2. Perfiles de la resistencia a antibióticos en <i>Streptococcus</i> y <i>Enterococcus</i> y otras bacterias ácido lácticas.	23
1.14. <i>Streptococcus</i> y <i>Enterococcus</i> en alimentos fermentados.	25
1.15. Aspectos generales del pozol.	27
1.16. Microbiología del pozol.	28
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	31

3. OBJETIVOS.	32
3.1. Objetivo general.	32
3.2. Objetivos particulares.	32
4. HIPÓTESIS.	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS.	34
5.1. Obtención del material biológico.	35
5.2. Cepas control.	35
5.3. Procesamiento de la masa de maíz y aislamiento de las cepas fermentadoras de nixtamal para elaborar pozol.	35
5.4. Purificación de los aislados.	36
5.5. Selección de cepas puras.	36
5.6. Conservación de las cepas aisladas.	36
5.7. Criterio de selección de cepas puras.	37
5.8. Extracción de ADN.	37
5.9. Cuantificación y evaluación de la pureza del ADN total de las cepas seleccionadas.	38
5.10. Detección del ADN total de las cepas seleccionadas extraídas de pozol	38
5.11. Amplificación del gen ribosomal 16S para cepas puras aisladas de pozol.	39
5.12. Análisis de restricción del gen ADNr 16S (ARDRA).	40
5.13. Análisis de datos del ARDRA.	40
5.14. Selección y procesamiento de cepas para secuenciar la región V1 del gen ADNr 16S.	41
5.15. Identificación de las cepas seleccionadas.	42
5.16. Prueba de sensibilidad a los antibióticos por difusión con discos a las cepas de <i>Streptococcus</i> y <i>Enterococcus</i> aisladas de pozol y cepas de origen clínico.	43
5.17. Interpretación de los resultados de la prueba de sensi-discos en las cepas de <i>Streptococcus</i> y <i>Enterococcus</i> y de origen clínico.	44
5.18. Prueba de hemólisis a las cepas de <i>Streptococcus</i> y <i>Enterococcus</i> aisladas de pozol y de origen clínicas en agar MRS-sangre.	44
5.19. Interpretación de los resultados de la prueba de hemólisis a las cepas de los géneros <i>Streptococcus</i> y <i>Enterococcus</i> aisladas de pozol y de origen clínico.	45

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	46
6.1. Aislamiento y selección de cepas bacterianas fermentadoras de pozol.	46
6.2. Obtención del ADN de las cepas seleccionadas.	51
6.3. Amplificación del gen ADNr 16S de las cepas puras seleccionadas y aisladas de pozol y de cepas control.	51
6.4. Restricción del gen ADNr 16S de las cepas seleccionadas aisladas de pozol y cepas control.	54
6.5. Agrupamiento e identificación de las cepas puras seleccionadas de pozol y cepas control.	63
6.6. Prueba de resistencia a los antibióticos y de hemólisis a las cepas aisladas de pozol pertenecientes a los géneros <i>Streptococcus</i> y <i>Enterococcus</i> .	75
7. CONCLUSIONES.	88
8. RECOMENDACIONES.	89
9. REFERENCIAS.	90
ANEXOS.	94
Anexo 1. Amplificados del gen ADNr 16S de cepas seleccionadas y aisladas de pozol.	94

RESUMEN.

Cepas de *Streptococcus* y de *Enterococcus* constituyen un componente importante de la microbiota de alimentos fermentados artesanales y/o industrializados. No obstante, se encuentran asociados con una gran variedad de síndromes clínicos y se ha demostrado que fungen como reservorios de genes de resistencia a los antibióticos. Se utilizaron los medios selectivos MRS-Almidón y KF para aislar colonias en diferentes tiempos de fermentación (0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 horas). Se seleccionaron un total de 80 cultivos puros provenientes de ambos medios selectivos. Se agruparon las cepas usando el método de “ARDRA” (Amplified 16S Ribosomal DNA Restriction Analysis), con las enzimas *Hinf I* y *Hae III* y como controles las cepas de origen clínico [CL1 (*S. pyogenes*), CL2 (*E. faecalis* 29212) y CL3 (*E. faecalis* 51299)] procedentes de la colección “ATCC” (American Type Culture Collection) y cepas previamente aisladas de pozol, [R1 (*Streptococcus infantarius* 25124), R2 (*S. macedonicus* A-45201), R3 (*Enterococcus sulfureus* A-36202)]. Se identificaron mediante secuenciación de la región V1 del gen ribosomal 16S 40/80 cepas aisladas de pozol. Se obtuvieron cepas de seis géneros diferentes en las siguientes proporciones y porcentajes: *Streptococcus* 28/40 (70%), *Enterococcus* 2/40 (5%), *Lactococcus* 4/40 (10%), *Lactobacillus* 2/40 (5%), *Leuconostoc* 3/40 (7.5%), *Weissella* 1/40 (2.5%). Los resultados de la prueba de sensibilidad, mostraron que las cepas de los géneros *Streptococcus* fueron multiresistentes a tres grupos de antimicrobianos y *Enterococcus* solo a dos grupos de antibióticos, y en ambos géneros el 100% de las cepas fueron resistentes a por lo menos un antibiótico. La prueba de hemólisis detectó a la cepa número 11 con probable actividad alfa-hemolítica que se identificó como *Streptococcus bovis*, en las restantes no se registró actividad. Además, aporta el hallazgo de tres especies no reportadas previamente en la microbiota del pozol (*Enterococcus italicus*, *Lactobacillus pantheris* y *Weissella cibaria*), y elementos al análisis acerca del uso de bacterias ácido lácticas presentes en un alimento de carácter tradicional y artesanal como el pozol fundamentalmente de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*, como cultivos iniciadores, cultivos de protección, mejoradores de la calidad sensorial de alimentos, suplementos alimenticios, probióticos o cualquier uso biotecnológico. Es fundamental valorar la presencia de genes de resistencia a los antibióticos y de virulencia, así como, el papel que juegan en la dispersión de dichos genes hacia otras bacterias.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes históricos.

Los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* tienen características fenotípicas que comparten y que al paso del tiempo han jugado un papel esencial en la clasificación y controversia de la misma, ya que por más de cien años ambas jerarquías taxonómicas fueron agrupadas como *Streptococcus* (Facklam, 2002; Hardie *et al.*, 1997). Los taxónomos argumentaron que son bacterias Gram-positivas, esféricas u ovoides en pares o en cadenas, no presentan esporulación, anaerobias facultativas, negativas a catalasa, homofermentativas y tienen ciertos requerimientos nutricionales complejos (Franz *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 1997). Por ello la taxonomía clásica los agrupó como un solo género. Ahora en nuestros días claramente se ha demostrado que pertenecen a géneros distintos y que tienen una distancia filogenética determinada (Burne *et al.*, 2007; Facklam, 2002; Hardie *et al.*, 1997). Precisamente, para poder entender cómo se llegó a establecer su posición taxonómica, es importante conocer su contexto histórico.

A más de cien años de que Billroth en 1874 observó por primera vez una formación de bacterias en forma de cocos en heridas de humanos y Rosenbach en 1884 las clasificara como el género *Streptococcus*, y a la vez asignó la primera especie, *Streptococcus pyogenes* (aislada de humanos) (Facklam, 2002; Hardie *et al.*, 1997). Los avances en el estudio y descripción de los estreptococos para principios del siglo XX, fueron provechosos, gracias al desarrollo tecnológico y científico que descubrieron su valor clínico y económico (Franz *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 1997). Las técnicas más notables e innovadoras para su tiempo, comprenden el análisis y conocimiento de distintos tipos de reacciones hemolíticas experimentadas por diferentes bacterias cultivadas en sangre-agar, estudios de cuales carbohidratos son utilizados como sustrato para realizar la fermentación, pruebas fisiológicas y morfológicas, detección de carbohidratos antigénicos en extractos ácidos de la pared celular y diversas pruebas de serología (Efstratiou, 2000; Facklam, 2002; Hardie *et al.*, 1997). Por lo tanto, en 1903 Thiercelin y Jouhaud propusieron el género *Enterococcus* para una bacteria Gram-positiva potencialmente patógena encontrada y aislada del intestino humano, fue lo que marcó el inicio de una larga controversia de la ubicación taxonómica de la naciente

jerarquía, ya que posteriormente para 1906 Andrewes y Harder transfirieron a los enterococos al género *Streptococcus* (Hardie *et al.*, 1997). Años más tarde, en 1933 Lancefield demostró que hay estreptococos que causan una hemólisis completa ó β -hemólisis y que poseen un determinado grupo de antígenos en particular, los cuales sirvieron como plataforma taxonómica para las primeras clasificaciones intra-género (Hardie *et al.*, 1997; McMillan *et al.*, 2007).

Sherman en 1937 publicó la primera clasificación ampliamente aceptada por la comunidad científica de la época. En el esquema incorporó como caracteres evaluados, la presencia de grupos antigénicos de Lancefield, como una de 10 características que separaron al género en cuatro divisiones designadas como: “pyogenic”, “viridans” “lácticas” y “enterococos”. Los estreptococos piogénicos agrupan a todas aquellas especies que infectan a los humanos y otros animales, los cuales fueron fuertemente β -hemolíticas y contenía un grupo antigénico de Lancefield específico. Entre las especies incluidas se encuentran *Streptococcus pyogenes* (grupo A de Lancefield), *S. mastitidis* (grupo B), *S. equi* (grupo C) y estreptococos de los grupos F, G, E y H. En contraste, los grupos de antígenos de Lancefield no fueron útiles para clasificar a la división de los “viridans”, por lo tanto, se basaron por completo en características bioquímicas y fisiológicas. Entre las especies se encuentran *S. salivarius*, *S. equinus*, *S. bovis* y *S. termophilus*. En la división de las lácticas se ubican bacterias involucradas en la fermentación de productos de la leche y la producción de lácteos, así mismo de fuentes cotidianas, las especies que destacan, *S. lactis* y *S. cremoris*. Por último los enterococos que se encuentran conformados por células de origen fecal como, *S. faecalis*, *S. liquefaciens*, *S. zymogenes*, *S. durans* (Efstratiou, 2000; Franz *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 1997). Es relevante señalar, que Sherman hizo una notación importante, que las especies integrantes de la última división citada, presentaron marcadas diferencias en comparación con las especies de las divisiones restantes, en relación a parámetros fisiológicos importantes como lo son, tolerancia a crecer en altas y bajas temperaturas, crecimiento en medios ricos en NaCl y alcalinos, punto de muerte térmica, resistencia al azul de metileno (Facklam, 2002; Franz *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 1997). Observaciones que anticiparon por casi cincuenta años la eventual separación de los enterococos del género *Streptococcus*.

En la octava edición del Manual de Bergey's de determinación bacteriológica en la década de los 70's el género fue dividido en cuatro grupos (I-IV), los cuales incluyen 21 especies nombradas, omitiendo la clasificación de Sherman en su designación original mencionada en el presente escrito. No obstante, pruebas de crecimiento y tolerancia, reacciones hemolíticas, grupos de Lancefield, reacciones bioquímicas permanecieron como criterios importantes en la clasificación (Efstratiou, 2000; Facklam, 2002; Hardie *et al.*, 1997). Jones en 1978 escribió una revisión del género e incluyó 21 especies nombradas por Deibel y Seeley en 1974, células del grupo serológico T, U y V, el grupo de estreptococos orales referidos como *S. mutans*, aerotolerantes y especies estrictamente anaerobias de Holdeman y Moore (1974) (Hardie *et al.*, 1997; McMillan *et al.*, 2007). Las especies anaerobias comprendieron *S. intermedius*, *S. constellatus*, *S. morbillorum*, *S. hansenii*, *S. pleomorphus* (Tabla 1).

A partir del avance y aplicación de técnicas en biología molecular, tales como secuenciación de ADN, análisis de secuencias homólogas (hibridación ADN-ADN), estudios de homología del gen ADNr 16S que aporta gran información concerniente a las distancias y relaciones genéticas dentro y entre pequeños grupos de especies de *Streptococcus* (Facklam, 2002; McMillan *et al.*, 2007; Wachter, 1995). Es así como se ha logrado hasta nuestros días un avance considerable en la taxonomía bacteriana, sin dejar de tomar en cuenta marcadores bioquímicos, fisiológicos y fenotípicos importantes. Es por ello, que a mitad de los 80's marcó la transición en la clasificación de los streptococos, en 1983 Briede y Sneath propusieron la división del género en "pyogenics", "parapyogenics", "pneumococos", "termofílicas", "viridans", "paraviridans", "enterococos" y "lácticas". Es hasta 1984 y 1985 que Kilpper-Balz separó claramente al género *Streptococcus* en dos géneros resultantes más: *Enterococcus* y *Lactococcus* y para 1987 fue ampliamente aceptado (Facklam, 2002; Hardie *et al.*, 1997).

1.2. Características fenotípicas del género *Streptococcus*.

Se trata de procariontes Gram-positivas, en forma de cocos, se observan al microscopio en pares o en cadenas de cocos, son inmóviles, no forman esporas, facultativamente anaerobias (algunas requieren CO₂), quimioautótrofos, quimiorganótrofos, con complejos requerimientos nutricionales, metabolismo fermentativo (L+), ácido láctico como el producto más importante de la fermentación de la glucosa, catalasa negativas,

así como, poseen diversos peptidoglucanos incluyendo: Lys- Ala₁₋₂, Lys- Ala₁₋₃, Lys- Ala₂₋₃, Lys- Ala₂(Ser), Lys-Thr-Ala, Lys-Thr, Gly, Lys-Thr₅-Ala (Ser) y Lisina directa. En la cadena grande de ácidos grasos, predominan cadenas lineales ó del tipo monoinsaturados. No se produce pirrolidonilarilamidasa en la mayoría de las especies del género. La relación de G+C se encuentra alrededor del 36 al 46% (Burne *et al.*, 2007; Efstratiou, 2000; Facklam, 2002; McMillan *et al.*, 2007).

1.3. Características fenotípicas del género *Enterococcus*.

Son células Gram-positivas, generalmente ovoides, no presentan esporulación, se pueden observar solitarias, en pares ó en cadenas cortas, algunas especies son móviles, anaerobias facultativas, quimiorganótrofas, con requerimientos nutricionales complejos, ácido láctico como el principal producto de la fermentación. Son bezidina y catalasa negativas y solo algunas especies producen pseudocatalasa. La gran mayoría de las especies son capaces de crecer entre 10° y 40°C, en un pH de 9.6, concentraciones de 5 y 6.5 % de NaCl, así como sobrevivir a 60°C hasta por 30 minutos. Se caracterizan taxonómicamente por poseer grupos de Lancefield antigénicos D, con la notable excepción de *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*. La pared celular de los enterococos contienen peptidoglucanos de Lysina-D-Aspargina (excepto *E. faecalis*) y de la membrana se derivan grandes cadenas de ácidos grasos en los que predominan cadenas lineales monoinsaturadas. Aunque algunos presentan anillos ácidos de ciclopropano, la pirrolidonilarilamidasa es producida por la mayoría de las especies, el porcentaje de G+C entre 38 y 45% (Burne *et al.*, 2007; Hardie *et al.*, 1997; Pérez-Pulido *et al.*, 2006; Yousif *et al.*, 2005).

1.4. Filogenia de *Streptococcus* y *Enterococcus*.

Una vez que las técnicas en biología molecular se aplicaron al estudio de la secuencia del gen que codifica para la subunidad 16S del ARNr, los resultados del análisis aportaron grandes datos a la genealogía de los procariontes. Es por ello que contrario a lo que se pensaba de la histórica cercanía entre los estreptococos y enterococos, se pudo establecer que ambos géneros se encuentran genealógicamente separados. *Streptococcus* se encuentra filogenéticamente más cerca con *Lactococcus* y

Enterococcus con *Aerococcus*, *Vagococcus*, *Dolosigranulum*, *Carnobacterium* y *Abiotrophia* (Hardie *et al.*, 1997).

1.5. Especies y grupos de especies en *Streptococcus*.

Existen alrededor de 50 especies descritas dentro del género, y en la mayoría de las clasificaciones se reconocen seis grupos como resultado del análisis de comparación de las secuencias 16S ADNr (Facklam, 2002; Hardie *et al.*, 1997; Wachter, 1995). Las especies más representativas de cada grupo se presentan en la tabla 1.

1.6. Identificación de las especies de *Streptococcus*.

Aunque no existe un esquema de identificación ordinario para poder identificar a los estreptococos, el uso de pruebas de sustrato cromogénico ó fluorogénicos que detectan enzimas, pruebas de bioquímica tradicional tales como fermentación de carbohidratos, hidrólisis de aesculina y arginina y la producción de acetoína ha sido particularmente útil para identificar a las especies de la división “viridans” (Efstratiou, 2000; Hardie *et al.*, 1997; McMillan *et al.*, 2007). Cabe mencionar que los análisis basados en la secuencia del ADN que codifica para la subunidad pequeña de 16S ARNr, aportan una base importante en la identificación de especies, así como las pruebas de hibridación de oligonucleótidos. Análisis moleculares que si bien han resultado muy útiles y con gran sensibilidad, tienen como limitación en este caso en particular que no se tiene la certidumbre de identificar a todas las especies del género (Facklam, 2002; Hardie *et al.*, 1997; Wachter, 1995).

1.7. Hábitat y enfermedades asociadas a *Streptococcus*.

Los estreptococos son típicamente encontrados en las membranas mucosas de la boca en humanos y hocico en animales, tracto respiratorio superior, tractos intestinal y genitourinario, así como también en la piel de humanos y ciertos animales (Churchward, 2007; Cunningham, 2000; Efstratiou, 2000; Hardie *et al.*, 1997; McMillan *et al.*, 2007).

Los estreptococos son reconocidos como agentes patógenos en humanos, con la presencia de especies altamente virulentas y responsables de la mayoría de las enfermedades, tales como *S. pyogenes*, *S. agalactiae* y *S. pneumoniae* que son particularmente notables como causantes de serias infecciones agudas en el humano

(Churchward, 2007; Cunningham, 2000; Efstratiou, 2000; García *et al.*, 2006; Hardie *et al.*, 1997; McMillan *et al.*, 2007). Diferentes especies están frecuentemente involucradas en endocarditis infecciosa, abscesos y entre otros padecimientos. Algunas especies consideradas poco virulentas, como el grupo de *S. mitis*, el cual puede convertirse en un agente patógeno altamente agresivo en individuos inmunocomprometidos, dando como consecuencia un incremento en la septicemia ó en el síndrome de distrés respiratorio adulto (Churchward, 2007; Cunningham, 2000; Hardie *et al.*, 1997).

El grupo del *S. anginosus* (también conocido como del grupo *S. milleri*) está comúnmente asociado con abscesos en varias partes del cuerpo, incluyendo la boca, cerebro, hígado y entre otros órganos (Churchward, 2007; Cunningham, 2000; Fernández *et al.*, 2002; Hardie *et al.*, 1997). Así como especies del grupo de *S. mutans* y *S. sobrinus* están directamente implicados en caries dental. En el caso de *S. pyogenes* la infección aguda puede estar seguida por complicaciones subsecuentes, tales como fiebre reumática y glomerulonefritis (Churchward, 2007; Cunningham, 2000; Efstratiou, 2000; García *et al.*, 2006; Hardie *et al.*, 1997; McMillan *et al.*, 2007).

Uno de los enigmas de las enfermedades en humanos causadas por los estreptococos, es que muchas de las especies potencialmente patógenas, pueden ser encontradas como parte de la microbiota residente, tanto como comensales ó colonizadores transitorios sin causar aparentes efectos en la salud del hospedero (Allgaier *et al.*, 2001; Cunningham, 2000; Hardie *et al.*, 1997). Un dato importante que nos ayuda a entender el potencial patógeno que tienen los estreptococos, es el incremento en el número de reportes de diferentes aislados de neumococos identificados en EE.UU y en otras partes del mundo, donde se hace notar la resistencia a la penicilina y a otros antibióticos, lo cual constituye un alto riesgo en la salud pública (Allgaier *et al.*, 2001; Cunningham, 2000; Hardie *et al.*, 1997; Mathur *et al.*, 2005).

Tabla 1. Grupos y especies comúnmente reconocidas en el género *Streptococcus*.

Grupos*	Especies incluidas	Designaciones alternativas ^{&}
Pyogenic	<i>S. pyogenes</i> <i>S. agalactiae</i> <i>S. canis</i> <i>S. dysgalactiae</i> <i>S. equi</i> <i>S. hyointestinalis</i> <i>S. iniae</i> <i>S. parauberis</i> <i>S. porcinus</i> <i>S. uberis</i>	Pyogenicos
Mitis	<i>S. gordonii</i> <i>S. mitis</i> <i>S. oralis</i> <i>S. parasanguis</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>S. sanguis</i>	Oral
Salivarius	<i>S. salivarius</i> <i>S. thermophilus</i> <i>S. vestibularis</i>	Oral
Anginosus	<i>S. anginosus</i> <i>S. constellatus</i> <i>S. intermedius</i>	Oral
Mutans	<i>S. mutans</i> <i>S. cricetus</i> <i>S. downei</i> <i>S. macacae</i> <i>S. rattus</i> <i>S. sobrinus</i>	Oral
Bovis	<i>S. bovis</i> <i>S. alactolyticus</i> <i>S. equinus</i>	Otros estreptococos

* Kawamura *et al.*, 1995; Hardie *et al.*, 1997; Poyart *et al.*, 1998.

1.8. Factores de virulencia en el género *Streptococcus*.

Los factores de virulencia del grupo A (grupo antigénico A de Lancefield) se encuentran mejor estudiados que aquéllos del grupo B (grupo antigénico B de Lancefield), debido a que han sido fácilmente identificados en especies patógenas tales como, *S. pyogenes* en comparación con oportunistas como lo estreptococos del grupo B (Allgaier *et al.*, 2005; Biare *et al.*, 2004; Churchward, 2007; Mathur *et al.*, 2005).

1.8.1. Adhesinas.

En su mayoría se trata de proteínas de superficie que son mediadoras de la adhesión entre el patógeno y células humanas ó proteínas sanguíneas. *S. pyogenes* posee adhesinas expuestas en superficie llamadas MSCRAMM`s. Estas incluyen proteínas M, proteínas relacionadas con M (las cuales tienen una secuencia similar a las proteínas M), F1 y F2 (proteínas de unión a fibronectinas) y Epa (proteína de unión a colágeno). Las proteínas M y similares a M se unen a proteínas de la matriz extracelular, como colágeno y fibonectina y proteínas sanguíneas, tales como el factor H, IgA, IgG y fibrinógeno (Cunningham, 2000; Mathur *et al.*, 2005; McMillan *et al.*, 2007). La unión hacia los anticuerpos se lleva a cabo cuando las proteínas M de superficie bacteriana se unen a la porción Fc de los anticuerpos, de tal modo que el sitio de unión al antígeno se encontraría alejado de la superficie de la bacteria. La adhesión en las proteínas que conforman la matriz extracelular, puede ayudar al patógeno a sujetarse del tejido al cual infectará, por lo tanto, deben considerarse antifagocíticas y como adhesinas (Allgaier *et al.*, 2001; Cunningham, 2000; Hardie *et al.*, 1997; McMillan, 2000). Las proteínas M son las mejor estudiadas de las adhesinas y probablemente son las más importantes. Las proteínas M son antigénicamente muy variables (existen alrededor de 80 serotipos diferentes), esto hace que sean proteínas poco atractivas para la realización de vacunas, a menos que se identifiquen regiones de la proteína altamente conservadas (Allgaier *et al.*, 2001; Churchward, 2007; Cunningham, 2000; McMillan *et al.*, 2007). Así mismo se conoce que dichas proteínas juegan un papel importante en enfermedades reumáticas del corazón, ya que pueden causar una respuesta autoinmune que dañe las válvulas del órgano (Allgaier *et al.*, 2001; Churchward, 2007; Cunningham, 2000; Hardie *et al.*, 1997).

1.8.2. Enzimas.

Se conocen una variedad de proteínas extracelulares que interactúan con proteínas sanguíneas ó células sanguíneas. Estas incluyen a dos hemolisinas, estreptolisina O (SLO) y estreptolisina S (SLS), las cuales lisan células rojas sanguíneas por medio de la formación de poros en la membrana celular, ocasionando la muerte (Allgaier *et al.*, 2001; Churchward, 2007; Cunningham, 2000). Debemos recordar que las pruebas de hemólisis fueron utilizadas para apoyar las primeras clasificaciones del género *Streptococcus* (Hardie *et al.*, 1997). Las hemolisinas generan grandes zonas claras alrededor de las colonias en crecimiento en placas de sangre-agar (beta-hemólisis). En contraste con otros grupos de estreptococos que no son hemolíticos ó forman halos grisáceos en las placas de sangre-agar (alfa-hemólisis) (Allgaier *et al.* 2001; Biare *et al.*, 2004; Churchward, 2007; Cunningham, 2000; McMillan *et al.*, 2007).

1.8.3. Antifagocitosis.

La actividad antifagocítica de las proteínas M ha sido mencionado junto con su muy probable papel como adhesina. Pero es importante mencionar que las bacterias con dichos factores de virulencia, se cubren con proteínas del propio huésped, mismas que también se unen con al factor H, desencadenándose una cascada de eventos que previenen la activación de C3b del sistema de complemento (Allgaier *et al.*, 2001; Biare *et al.*, 2004; Churchward, 2007; Cunningham, 2000; Hardie *et al.*, 1997). Otros factores que impiden la fagocitosis, es la formación de una cápsula compuesta de ácido hialurónico, que es un componente de la matriz extracelular de los humanos. Por lo tanto la cápsula no solo previene la fagocitosis, también logra tener un “camuflaje” que le permite pasar inadvertida por el sistema inmune (Allgaier *et al.*, 2001; Churchward, 2007; Cunningham, 2000; McMillan *et al.*, 2007). La peptidasa C5a que puede prevenir la migración de los neutrófilos hacia el sitio de infección, ya que disminuye la concentración de la proteína C5a, la cual guía a los neutrófilos a su sitio blanco (Allgaier *et al.*, 2001; Biare *et al.*, 2004; Churchward, 2007). Un factor llamado inhibidor estreptococal del complemento (Sic), está incorporado en la membrana y ataca el complejo del complemento según experimentos *in vitro*, por lo tanto, impide la repuesta del sistema inmune (Churchward, 2007; Cunningham, 2000; McMillan *et al.*, 2007). La importancia de las proteínas Sic es evidente en la patogenicidad de los estreptococos,

ya que durante una epidemia ó la colonización de cualquier tejido, la proteína se encuentra de forma hipervariable, evidenciando que el polipéptido tiene múltiples variables funcionales. Tales variaciones pueden incrementarse por la presión del sistema inmune, por consecuencia, puede cambiar sus antígenos de superficie, facilitando los brotes epidémicos causados por estreptococos del grupo A (Churchward, 2007; Cunningham, 2000).

1.8.4. Súper- antígenos y otros componentes tóxicos.

La producción de súper-antígenos llamados Spe, de los cuales se conocen siete variantes de SpeA-J (excluyendo las letras D, E é I). SpeA parece ser el súper-antígeno más importante y es producido por tipos de bacterias recientemente emergentes que causan el síndrome de choque-tóxico, que son altamente invasivas y letales (Biare *et al.*, 2004; Churchward, 2007; Cunningham, 2000). SpeB es una cisteína-proteasa que puede estar involucrada en la dispersión de las bacterias en los tejidos, destruyendo la matriz extracelular y células, lo cual permite a los estreptococos (no son móviles) difundirse a través del tejido hacia nuevos sitios (Churchward, 2007; Cunningham, 2000).

1.9. Especies y grupos de especies en el género *Enterococcus*.

Se han propuesto más de 20 especies que conforman el género (Tabla 2) (Hardie *et al.*, 1997). Así mismo, debido a la transferencia de *S. faecalis* y *S. faecium* hacia el género *Enterococcus*, el estatus de *E. seriolicida* fue conflicto en algún tiempo, ahora dicha especie ha sido clasificada como *Lactococcus garvieae* (Hardie *et al.*, 1997). La clasificación de otras especies como *E. flavescens* se encuentra en incertidumbre y muy relacionado con *Et. casseliflavus* y la fuerte reducción en el número de especies dentro del género fué a causa de la transferencia de *E. solitarius* hacia el género *Tetragenococcus* (Burne *et al.*, 2007; Hardie *et al.*, 1997).

La comparación en las secuencias de 16S ADNr ha revelado que la mayoría de las especies dentro del género *Enterococcus* se ubican en 4 grupos de especies: *Ent. faecium*, *Ent. avium*, *Ent. gallinarum* y *Ent. Cecorum* (Burne *et al.*, 2007; Hardie *et al.*, 1997).

Tabla 2. Especies del género *Enterococcus* válidamente descritas y algunas propiedades fisiológicas.

Especies	Crecimiento a:		Crecimiento en presencia de:				Hidrolisis de esculina	Grupo D antigénico
	10° C	45° C	pH 9.6	6.5% NaCl	40% Bilis	0.04% Ac. Sódico		
<i>E. asini</i>	(+)	(+)	n.d	-	+	n.d	+	+
<i>E. avium</i>	V	+	+	V	V/+	n.d	+	+
<i>E. casseliflavus</i>	+	+	+	V/+	+	+	+	+
<i>E. cecorum</i>	-	+	(+)	-	(+)	-	+	+
<i>E. columbae</i>	-	n.d	n.d	-	(+)	-	+	-
<i>E. dispar</i>	+	-	n.d	+/-	+	-	+	-
<i>E. durans</i>	+	+	+	+	+	+	+	(+)
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecium</i>	+	+	+	+	+	+	+	V
<i>E. flavescens</i>	V/-	V/+	n.d	+	+	+	+	+
<i>E. gallinarum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. haemoperoxidus</i>	+	-	n.d	+	+	+	+	+
<i>E. hirae</i>	+	+	+	+	+	+	+	V
<i>E. malodoratus</i>	+	-	+	+	+	n.d	+	+
<i>E. moraviensis</i>	+	-	n.d	+	+	+	+	+
<i>E. mundtii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. porcinus</i>	+	+	n.d	+	n.d	n.d	+	+
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	+	+/-	V/+	n.d	+	-
<i>E. raffinosus</i>	(+)	+	+	+	V/+	n.d	+	n.d
<i>E. ratti</i>	+	+	n.d	+	n.d	n.d	+	(+)
<i>E. saccharolyticus</i>	+	+	n.d	(+)	+	n.d	+	-
<i>E. solitarius</i>	+	+	n.d	+	+	n.d	+	+
<i>E. sulfureus</i>	+	-	n.d	+	+	n.d	+	-
<i>E. villorum</i>	n.d	n.d	n.d	+	+	+	+	n.d

n.d= no determinado; (+)=conducta débil; V= variable; +/- = ambos reportes en la literatura.

1.10. Identificación de las especies de *Enterococcus*.

Al igual que los estreptococos, la identificación de las especies se realizan usando métodos bioquímicos comerciales y estandarizados que incluyen una combinación de enzimas, además de la aplicación de pruebas bioquímicas tradicionales. Asimismo, el

análisis de la secuencia genómica del gen ADNr 16S es altamente recomendable para la identificación intraespecífica del género (Franz *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 1997; Kayser, 2003).

1.11. Hábitat y enfermedades causadas por enterococos.

Los enterococos se encuentran típicamente en el trato intestinal y heces de humanos y de una amplia variedad de animales (Franz *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 1997; Mathur *et al.*, 2005). En el humano, se encuentra junto con otras 450 especies de bacterias aeróbicas y anaeróbicas como parte normal de la microbiota intestinal y en la mayoría de los individuos se encuentran en gran número (10^5 - 10^7 UFC por mL de muestra), cifras más pequeñas son contabilizadas en secreciones orofaríngeas, en piel y especialmente en el área perianal (Franz *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 1997; Pérez-Pulido *et al.*, 2006). Algunas especies han sido aisladas del suelo, alimentos, agua y plantas, de las cuales se destaca su capacidad para crecer y sobrevivir en un amplio rango de condiciones ambientales que son inusuales para un gran número de eubacterias, incluyendo temperaturas extremas y ciertas concentraciones salinas, que le permiten tener una distribución casi ubicua (Franz *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 1997; Kayser, 2003; Pérez-Pulido *et al.*, 2006). Son bacterias consideradas muy importantes en el ambiente, alimentos y en la microbiología clínica (Franz *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 1997; Mathur *et al.*, 2005; Pérez-Pulido *et al.*, 2006). Particularmente en alimentos son fundamentales en la fabricación de productos fermentados tales como quesos, salsas, entre muchos otros, contribuyendo a la cocina local y su posterior herencia en la región (Franz *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 1997; Mathur *et al.*, 2005; Pérez-Pulido *et al.*, 2006). Asimismo pueden ser usados exitosamente como probióticos (Franz *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 1997).

Previo a la identificación de múltiples líneas resistentes a antibióticos en los 70's los enterococos se consideraban bacterias no patógenas, con la excepción de especies causantes de endocarditis. Actualmente se han identificado como causantes de infecciones clínicas (Franz *et al.*, 2003; Mathur *et al.*, 2005; Pérez-Pulido *et al.*, 2006). Es importante tomar en cuenta antes de una terapia con antibióticos, que los enterococos poseen resistencia natural a ciertos medicamentos como la cefalosporina o la fluoroquinolona. En este contexto puede ocurrir septicemia por enterococos (Franz *et*

al., 2003; Mathur *et al.*, 2005; Pérez-Pulido *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007; Robredo *et al.*, 2000).

En humanos hay dos especies responsables de la mayoría de las infecciones, por un lado *E. faecalis*, que es la especie predominante con el 80 al 90% de los casos clínicos y que pueden ser aislados de casi el 100% de muestras fecales y por último *E. faecium* con 5 a 10% de prevalencia, aunque existen datos recientes que indican números más grandes, particularmente en cepas multi-resistentes (Franz *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 1997; Kayser, 2003; Mathur *et al.*, 2005; Pérez-Pulido *et al.*, 2006). Sin embargo, existen especies menos comunes como *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus* y *E. hirae*, involucrados en enfermedades ubicadas en otros sitios del cuerpo, como la vagina y cavidad oral (Hardie *et al.*, 1997; Kayser, 2003).

Ordinariamente la frecuencia de enterococos como agente causal de enfermedades en pacientes hospitalizados ocupa un segundo y tercer lugar en EE.UU, sin duda, es un dato que nos manifiesta la ponderación del género en la salud pública. A menudo ocasionan infecciones intra-abdominales y pélvicas, debido a que usualmente son polimicrobianas (Hardie *et al.*, 1997; Kayser, 2003; Pérez-Pulido *et al.*, 2006). Se conoce que *E. faecalis* es responsable de una porción significativa de casos de endocarditis bacteriana, alrededor de 5 a 20% en EE.UU (Kayser, 2003; Lopes *et al.*, 2005). Por otro lado, algunas especies del género se encuentran asociadas a infecciones prenatales, sistema nervioso central y en ocasiones en el tracto respiratorio, aunque esto se observa muy rara vez (Fernández *et al.*, 2002; Kayser, 2003; Lopes *et al.*, 2005). Es importante mencionar, que los enterococos tienen una gran capacidad para intercambiar elementos extracromosomales, los cuales pueden codificar para factores de virulencia y resistencia a los antibióticos (Franz *et al.*, 2003; Mathur *et al.*, 2005; Pérez-Pulido *et al.*, 2006). Esto se observa claramente ya que existe un incremento en la dificultad de tratar farmacológicamente a los pacientes con especies y grupos de especies resistentes a ciertos antibióticos (Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003; Mathur *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2005). En bacteremias nosocomiales, se estima que los enterococos participan en un 6-7% de todas las bacterias aisladas de sangre. Las vías de entrada incluyen el trato urinario, infecciones intra-abdominales, heridas de quemaduras, infecciones de pie diabético o catéteres intravasculares (Hardie *et al.*, 1997; Kayser, 2003; Lopes *et al.*, 2005).

1.12. Factores de virulencia en el género *Enterococcus*.

Se conoce poco sobre los factores que contribuyen a la habilidad de los enterococos para causar enfermedades en el humano. Los determinantes de la virulencia conocidos hasta ahora que tienen un papel en la patogénesis son ciertas moléculas secretadas y por otros conocidos como factores de adherencia. Estudios con *E. faecium* han mostrado que la resistencia a antibióticos tiene un papel muy importante en la patogénesis de enfermedades por enterococos (Franz *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 1997; Kayser, 2003; Lopes *et al.*, 2005).

1.12.1. Citolisinas.

El factor de virulencia mas importante en *E. faecalis* parece ser la citolisina. La capacidad citolítica de los enterococos se observa *in vitro* como una zona transparente en agar sangre. Este fenotipo de muchas líneas de *E. faecalis* está determinado por el operón de citólisis, localizado en plásmidos transmisibles y ocasionalmente en el cromosoma (Franz *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 1997; Kayser, 2003). Las citolisinas causan la ruptura de una gran variedad de membranas, incluyendo eritrocitos y otras células eucarióticas (Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003). La determinación de la secuencia nucleotídica del operón citólisis ha revelado un complejo genético que codifica 5 marcadores (Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003; Yousif *et al.*, 2005). En muchos modelos de infección, se ha encontrado que las citólisis contribuyen a la toxicidad y letalidad. Por ejemplo, se ha observado que favorece la aparición de los enterococos en torrente sanguíneo de ratones infectados experimentalmente (Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003; Lopes *et al.*, 2005). En un experimento, dos cepas de *E. faecalis* isogénicas tanto citolíticas como no citolíticas fueron inyectadas intraperitonealmente en ratones y el número de bacterias que aparecieron en torrente sanguíneo fue significativamente mayor en ratones con la cepa positiva a citolisinas (Kayser, 2003). En humanos las citolisinas también contribuyen a la patogénesis. En un estudio, cepas citolíticas fueron determinadas en bacteremia por análisis de regresión lineal para ser asociados con un incremento de cinco veces en el riesgo de muerte comparado con infecciones causadas por cepas no citolíticas (Kayser, 2003; Lopes *et al.*, 2005).

1.12.2. Proteasas.

Hace cuatro décadas aproximadamente, se purificó y caracterizó una metaloproteasa de aproximadamente 30 kDa (Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003). Se sugirió un potencial de virulencia a esta proteasa por el hecho de que su producción era característica en *E. faecalis* aislado en pacientes de cirugía y neurocirugía intensiva (Kayser, 2003). En otro estudio, 54% de los enterococos aislados de pacientes infectados produjeron esta enzima comparada con unos 12% y 14% de aislados de pacientes hospitalizados no infectados y voluntarios sanos, respectivamente. Estos estudios epidemiológicos, no obstante, solo pueden sugerir la asociación de la producción de la proteasa con la virulencia (Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003; Lopes *et al.*, 2005).

1.12.3. Superóxido extracelular.

Estudios sugieren que algunas cepas de *E. faecalis*, generan superóxido extracelular. Cuando *E. faecalis* se aísla de pacientes con endocarditis y bacteremia y se comparan con aislados de voluntarios sanos, en promedio la producción de superóxido fue 60% mayor entre los aislados de sangre que en las líneas comensales (Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003; Lopes *et al.*, 2005).

1.12.4. Adherencia a los tejidos del hospedero.

La adherencia a los tejidos del hospedero es el primer paso en el proceso de infección. Para comensales gastrointestinales como los enterococos, las adhesinas que promueven la unión a receptores de la mucosa intestinal son determinantes para la colonización (Franz *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 1997; Kayser, 2003; Lopes *et al.*, 2005; Pérez-Pulido *et al.*, 2006; Yousif *et al.*, 2005). Sin moléculas específicas de adhesión los enterococos serían eliminados por la movilidad normal del intestino (Franz *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 1997; Kayser, 2003; Lopes *et al.*, 2005). Se ha sugerido que la sustancia de agregación así como una proteína extracelular de superficie tienen un papel muy importante en la adherencia (Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003; Lopes *et al.*, 2005). La sustancia de agregación es una proteína feromona-inducible de superficie que *E. faecalis* codifica a través de plásmidos y expresados en respuesta a la inducción de la feromona. La proteína es capaz de unirse a la llamada sustancia de unión de las células receptoras, promoviendo la formación de agregados acoplados de células

donadoras positivas al plásmido con receptores negativos al plásmido durante la conjugación *in vitro*, la sustancia de agregación es capaz de mediar la adhesión en una variedad de superficies de células eucariotas, como las células tubulares de riñón en cultivo (Franz *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 1997; Kayser, 2003). Dicha sustancia también se ha demostrado que promueve la internalización de los enterococos en células de intestino humanos *in vitro*. Estudios recientes en el modelo de endocarditis han demostrado que la sustancia de agregación junto con la sustancia de unión pueden conllevar a la destrucción de tejido pulmonar y miocárdico (Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003). La sustancia de agregación también promueve la supervivencia intracelular de *E. faecalis* dentro de los neutrófilos al evitar o retrasar la fusión del fagosoma con los lisosomas para formar fagolisosomas (Kayser, 2003)

1.13. Resistencia a antibióticos en *Streptococcus* y *Enterococcus* y otras bacterias ácido lácticas asociadas a los alimentos.

1.13.1. Aspectos generales.

Alrededor de 60 años que los antibióticos se utilizaron por primera vez como tratamiento para enfermedades microbianas. Desde entonces la mayor amenaza a su uso ha sido el desarrollo de resistencia en bacterias patógenas. La magnitud del problema se incrementa significativamente, dado que las bacterias tienen la capacidad de transferir la resistencia de manera horizontal (Burne *et al.*, 2007; Cunningham, 2000; Esfratiou, 2000; Toomey *et al.*, 2010). Diversos estudios en ratones muestran que la transferencia genética ocurre ampliamente *in vivo* entre bacterias del tracto intestinal, así como entre bacterias del tracto intestinal y bacterias patógenas (Burne *et al.*, 2007; Mathur *et al.*, 2005; Toomey *et al.*, 2010).

El desarrollo de la resistencia está basada principalmente en dos factores, la presencia de genes de resistencia y la presión selectiva por el uso de los antibióticos (Cunningham, 2000; Mathur *et al.*, 2005; Hummel *et al.*, 2007). La resistencia a un determinado antibiótico puede ser intrínseca a una especie o género de bacteria (resistencia inherente o natural) que resulta en la habilidad de sobrevivir en la presencia de un agente antimicrobiano, gracias a un factor inherente del organismo y no es transferible de manera horizontal (Mathur *et al.*, 2005). En contraste, la resistencia

adquirida está presente en algunas especies susceptibles al antibiótico en consideración y puede ser transferido de forma horizontal entre bacterias.

La resistencia adquirida a agentes antimicrobianos puede surgir a partir de mutaciones del genoma bacteriano o a través de la adquisición de genes adicionales que codifiquen para algún mecanismo de resistencia. Estos cambios genéticos modifican las funciones de defensa de las bacterias al modificar el sitio blanco del fármaco por la alteración de la permeabilidad de la membrana, la activación de enzimas que degradan el antibiótico (β -lactamasas, aminoglucósido acetyl-nucleotidil y fosforil- transferasas), sistemas de eflujo dependiente-ATP insertados en la membrana (transporte activo de antibióticos) (Burne *et al.*, 2007; Lopes *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2005; Mathur *et al.*, 2005). La resistencia a antibióticos puede ser transferida de manera vertical u horizontal en las comunidades microbianas naturales. La diseminación vertical está mediada por un proceso clonal de una línea resistente particular. Para la horizontal se han identificado tres mecanismos para la transferencia de genes: la transformación natural, que involucra la incorporación de ADN libre del medio extracelular; conjugación, que es un mecanismo dependiente del contacto para la transferencia de ADN que ocurre en muchos géneros de bacterias y la transducción, una transferencia mediada por bacteriófagos. La evolución de la resistencia en comunidades microbianas se potencializa por la transferencia horizontal de genes en las especies y géneros por acción de los plásmidos conjugativos, los transposones, los integrones y elementos de inserción, así como por los bacteriófagos líticos y temperados (Burne *et al.* 2007; Cunningham, 2000; Mathur *et al.*, 2005; Pérez-Pulido *et al.*, 2006; Toomey *et al.*, 2010). Un solo antibiótico no sólo puede seleccionar para resistencia de ese fármaco en particular, sino que también puede estar involucrado en la resistencia a otros compuestos estructuralmente relacionados, por ejemplo, la resistencia a tetraciclina por el gen *tet* (M) también incluye resistencia a oxitetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina y minociclina (Burne *et al.*, 2007; Kayser, 2003; Mathur *et al.*, 2007). Cuando los antibióticos de diferentes clases comparten el mismo sitio de acción y éste es modificado por la acción de un gen de resistencia, se manifiesta; por ejemplo, resistencia combinada a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B por los genes *erm* (Burne *et al.*, 2007; Cunningham, 2000; Franz *et al.*, 2003; Mathur *et al.*, 2005). Además, una serie de plásmidos han sido identificados como portadores de genes

múltiples de resistencia, lo que resulta en co-transferencia (Burne *et al.*, 2007; Cunningham, 2000; Kayser, 2003; Mathur *et al.*, 2005).

1.13.2. Perfiles de la resistencia a antibióticos en *Streptococcus* y *Enterococcus* y otras bacterias ácido lácticas.

Es necesario conocer cuál es la resistencia intrínseca de las bacterias ácido lácticas (LABs por sus siglas en inglés, Lactic acid bacterial) para reconocer la adquirida, existen reportes de algunas cepas de enterococos resistentes *per se* a cefalosporinas y a bajas concentraciones de clindamicina y aminoglicósido. Así como, de lactobacilos, pediococos y *Leuconostoc* spp que mostraron resistencia a vancomicina de manera natural, una característica que es útil para separarlas de otras bacterias Gram-positivas. Algunos lactobacilos tienen resistencia natural a bacitracina, cefoxitina, ciprofloxacina, nitrofurantoina, norfloxacina, estreptomina, sulfadiacina, teicoplanina, trimetoprim/sulfametoxazol y vancomicina (Lopes *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2005; Mathur *et al.*, 2005; Pérez-Pulido *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007). Temmerman *et al.* (2002), evaluaron 55 productos probióticos europeos utilizando el método de difusión de discos y detectaron resistencia para kanamicina en 79%, vancomicina en 65%, tetraciclina en 26% penicilina G en 23%, eritromicina en 16% y cloranfenicol en 11% y un total de 68,4 % mostró resistencia múltiple en 187 aislados (Franz *et al.*, 2003; Mathur *et al.*, 2005).

El perfil de resistencia para enterococos (*E. faecium*) aislados de alimentos ó de pacientes son muy variables. La cepa 68 de *E. faecium* se emplea como probiótico tanto en humanos como en animales y es susceptible a eritromicina (15 µg), framicitina (100 µg), estreptomina/penicilina (35 µg), gentamicina (10 µg), penicilina, tetraciclina (30 µg), y cloranfenicol (30 µg). Es naturalmente resistente a kanamicina (30 µg), estreptomina (10 µg) y oxacilina (5 µg) (Kayser, 2003; Mathur *et al.*, 2005). Citak *et al.* (2004) estudiaron en el queso blanco de pavo la resistencia de *Enterococcus* detectando resistencia a estreptomina, eritromicina, oxacilina y vancomicina en concentraciones mínimas inhibitorias (MIC, por sus siglas en inglés, minimal inhibitory concentration) (Mathur *et al.*, 2005).

Algunas cepas investigadas de *Lactococcus lactis* fueron sensibles a MIC de amikacina, ampicilina, cefalosporinas de primera generación, cloramfenicol, eritromicina,

gentamicina, imipenem, oxacilina, penicilina, pepiericilina, sulfonamida, tetraciclina, trimetroprim/sulfametoxazol y vancomicina. Una menor susceptibilidad se observó a carbenicilina ciprofloxacina, dicloxacilina y norfloxacina. Recientemente se ha descubierto una serie de proteínas en *L. lactis* subs. *Lactis* MG1363, una de estas es un transportador tipo ABC (*Imr A*) y otras una fuerza de protones dependiente de un transportador de fármacos (*Imr P*). Ambos son responsables de la resistencia a altas concentraciones de bromuro de etídio, sin embargo, los sustratos naturales se desconocen (Mathur *et al.*, 2005; Pérez-Pulido *et al.*, 2006).

En otro estudio con 31 cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que son componentes de cultivos de yogurt, mostraron resistencia intrínseca a micostatina, ácido nalidixico, neomicina, polimixina B, trimetoprim, colimicina, sulfametoxazol y sulfonamidas. Susceptibles a cloxacilina, dihidroestreptomicina, doxiciclina, furadantina, novobiocina, oleandomicina, oxacilina y estreptomicina en MIC. Muchas cepas de *L. plantarum*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. leishmannii*, *L. acidophilus* portan resistencia intrínseca a vancomicina que es debido a la presencia de D-alanina: enzimas relacionadas a la D- alanina ligasa (Burne *et al.*, 2007; Mathur *et al.*, 2005).

En otro estudio siete cepas de *L. acidophilus* se examinaron para la sensibilidad de varios agentes quimioterapéuticos en MIC y se encontró sensibilidad a novobiocina, cloranfenicol, ampicilina, eritromicina, oxitetraciclina y clorotetraciclina mientras que todos fueron resistentes a norfloxacina y ácido nalidixico (Mathur *et al.*, 2005).

En 50 cepas de *Streptococcus thermophilus* de cultivos de yogurt mostraron resistencia variable a niveles de colimicina, gentamicina, kanamicina, micostatina, ácido nalidixico, neomicina, polimixina B, trimetoprim/sulfametoxazol, estreptomicina y sulfonamidas (Cunningham, 2000; Mathur *et al.*, 2005). En otro estudio realizado por Aslim y Beyatli (2004), se evaluaron los patrones de resistencia y la carga de plásmidos. Diferentes cepas de *S. thermophilus* fueron resistentes a gentamicina el 79%, penicilina G el 64% y susceptible a cloranfenicol el 94% y tetraciclina el 88%, sin embargo, no se estableció ninguna correlación entre la resistencia y la presencia de plásmidos (Cunningham, 2000; Esfratiou, 2000; Mathur *et al.*, 2005).

1.14. *Streptococcus* y *Enterococcus* en alimentos fermentados.

Las cepas de estos dos géneros se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente, especialmente en las superficies mucosas del hombre y de animales, incluyendo el tracto gastrointestinal, pero algunas se encuentran en plantas, suelo, agua, productos lácteos y otros alimentos (Hardie *et al.*, 1997; Pérez-Pulido *et al.*, 2006).

Cepas de *Streptococcus* y de *Enterococcus* constituyen un componente importante de la microbiota de alimentos fermentados, como los quesos artesanales del sur de Europa, salsas, bebidas y carnes, entre otros, con un papel importante en la producción de aromas durante la maduración. Se han reportado también como productores de bacteriocinas y con actividad probiótica (Franz *et al.*, 2003; Galvez *et al.*, 1998). En general, las bacterias ácido lácticas se utilizan ampliamente como probióticos o como cultivos iniciadores y tienen el potencial de servir como hospederos para los genes de resistencia, con el riesgo de transferirlos a otras bacterias ácido lácticas así como patógenas (Burne *et al.*, 2007; Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2000; Mathur *et al.*, 2005). En los últimos años se ha prestado mayor atención a las bacterias presentes en alimentos como vehículos de los genes de resistencia a antibióticos (Franz *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2005; Mathur *et al.*, 2005; Hummel *et al.*, 2007).

Diversos estudios proponen que las bacterias que se encuentran en los alimentos, y la microbiota comensal pueden ser un reservorio de genes de resistencia, similares a las encontradas en patógenos de humanos y son de gran importancia para conocer cómo se mantienen y se dispersan los genes de resistencia a antibióticos a través de las poblaciones bacterianas (Burne *et al.*, 2007; Franz *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 1997; Mathur *et al.*, 2005; Toomey *et al.*, 2010). La mayor amenaza asociada con estas bacterias es que pueden transferir dichos genes a bacterias patógenas. Tales organismos podrían encontrarse en varios alimentos y productos alimenticios conteniendo altas densidades de bacterias no patógenas como resultado de su proceso natural de producción (Cunningham, 2000; Mathur *et al.*, 2005; Pérez-Pulido *et al.*, 2006; Toomey *et al.*, 2010).

En particular, los productos fermentados de consumo diario y las carnes frías que no se someten a calentamiento antes de su consumo, son un vehículo para la transmisión de resistencia, entre la microbiota nativa del animal y la del tracto gastrointestinal del

humano. Los productos fermentados de la leche utilizan cultivos iniciadores lácticos, mismos que entran en nuestros intestinos en grandes cantidades e interactúan con la microbiota intestinal (Burne *et al.*, 2007; Franz *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 1997; Mathur *et al.*, 2005).

La presencia de estreptococos fecales (*E. faecalis* y *E. faecium*) en alimentos indica contaminación fecal y entonces la posible presencia de patógenos; sin embargo, algunas cepas forman parte importante de la microbiota de algunos alimentos fermentados (Franz *et al.*, 2003; Hardie *et al.*, 1997; Pérez-Pulido *et al.*, 2006).

En 1998 la organización para el proyecto de Reservorios de Resistencia a Antibióticos (ROAR, por sus siglas en inglés) se formó para promover los estudios de la selección y dispersión de la resistencia a antibióticos de bacterias no patógenas en el humano, durante la producción de alimentos y procesos de agricultura así como en el ambiente. Aunque muchas bacterias ácido lácticas (LABs) asociadas con los alimentos, han adquirido el estatus de “considerado generalmente como seguro” (GRAS, por sus siglas en inglés), existe el riesgo potencial para la salud debido a la transferencia de genes con resistencia a antibióticos de reservorios LABs a bacterias nativas de la microbiota del tracto gastrointestinal, y bacterias patógenas (Mathur *et al.* 2005; Pérez-Pulido *et al.*, 2006). La cadena alimenticia puede ser considerada como la vía principal de transmisión de la resistencia a antibióticos entre bacterias (Mathur *et al.*, 2005; Jonsson *et al.*, 2006; Hummel *et al.*, 2007; Toomey *et al.*, 2010).

El incremento en el número de infecciones por enterococos y estreptococos en décadas recientes, ha despertado la preocupación sobre la transferencia de cepas presentes en varios alimentos ó el tratamiento de enfermedades gastrointestinales con probióticos que contienen dichas bacterias que podrían resultar en infecciones con este organismo, y por lo tanto convertirse en un riesgo para la salud (Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003; Toomey *et al.*, 2010). Queda claro que los enterococos y estreptococos utilizados en la industria alimentaria no deben contener factores de virulencia ni de resistencia, lo cual disminuye el riesgo para la salud de los consumidores. Por lo tanto, el empleo de cepas bacterianas en la tecnología de alimentos, deben ser evaluadas cuidadosamente antes de su uso (Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003; Martin *et al.*, 2005).

1.15. Aspectos generales del pozol.

Desde épocas prehispánicas, en el sureste de México, se consume una bebida ácida y refrescante que se conoce como pozol y está elaborada a partir del nixtamal (maíz hervido en agua con cal). Para su consumo se prepara suspendiendo en agua masa de nixtamal fermentada, y se bebe adicionada de sal, pimienta, azúcar, miel o chiles secos por diversas poblaciones indígenas y mestizas de los estados de Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas y Oaxaca. Existen variantes en los diferentes estados productores, por ejemplo: en Tabasco y Chiapas, se prepara pozol con un aroma especial, añadiendo la planta “islaur” o “isaúl” en el agua en que se bate la masa; en Oaxaca se conoce como “pozonque” y en Tabasco existe una modalidad llamada “chorote”, que se obtiene por fermentación de la masa de maíz con cacao molido. En la región de Chinantla, Oaxaca, agregan a la bebida cacao tostado y molido o cenizas de carbón de encino; en la región mixe, se prepara el pozol con “cocolmécatl” (bejuco silvestre y cacao molidos) y en Yucatán, suelen agregarle coco (Cañas *et al.*, 1993; Escalante *et al.*, 2001; Wachter, 1995).

Para la elaboración del pozol se utilizan 3 tipos de maíz: blanco, amarillo y negro, seguido de la cocción del maíz en agua con cal (nixtamalización) la cual termina cuando el hollejo se puede eliminar fácilmente al frotar el grano con los dedos y el tiempo varía entre 60 y 120 minutos, a continuación se lava para eliminar el material extraño y granos podridos que darían mal aspecto, se frota con las manos para desprender la cascarilla y por segunda vez se cuece en agua hasta que reviente el grano, el tiempo de cocción varía entre 3 y 8 horas y el grado de reventado determina la consistencia final del pozol. Posteriormente, se remoja durante toda la noche y en el caso del pozol indígena se incluye el agua del penúltimo lavado del nixtamal (en frío); el pozol mestizo se remoja con el agua del reventado (en caliente), a continuación se muele el nixtamal y se amasa, inmediatamente después se forman bolas a mano. Resulta importante mencionar que durante la molienda y la elaboración de la bola se observan focos potenciales de inoculación microbiana para la fermentación. Las temperaturas de las bolas de masa, varía de acuerdo con el tipo de proceso por el cual fueron obtenidas. La del pozol indígena es a temperatura ambiente, que es la misma a la que se mantiene el nixtamal desde su lavado. En el caso del mestizo, la temperatura varía dependiendo del tiempo de remojo del maíz reventado; el maíz se deja en remojo en la misma agua

caliente en la que se llevó a cabo la cocción, pero en algunos casos se retira del fuego y en otros se deja sobre la brasa. Así la temperatura interna de las bolas terminales fluctúa de 20 a 27°C y la externa de 20 a 24°C. La forma y el peso pueden variar desde ovalada o redonda con un peso desde 15 g hasta 1 kg, las cuales se envuelven en hojas de plátano, platanillo y hoja blanca, no obstante, es común encontrarlas en el mercado cubiertas con bolsas de plástico. Mismas que se dejan fermentar, algunas a temperatura ambiente por unas horas o durante 4 a 5 días, aunque los chamulas y los lacandones las dejan dos o más semanas y consumen el pozol enmohecido (Cañas *et al.*, 1993; Wachter, 1995; Wachter *et al.*, 2000; Escalante *et al.*, 2001).

La fermentación de la masa de nixtamal, se lleva a cabo en estado semisólido, con la intervención de una microbiota compleja compuesta por diferentes grupos de bacterias, mohos y levaduras. Actualmente se sabe que la fermentación presenta ventajas, como, la mejora en la digestibilidad del sustrato, el incremento en el valor nutricional, la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos y sus toxinas o la eliminación de sabores y texturas desagradables (Cañas *et al.*, 1993; Phister *et al.*, 2004; Wachter, 1995).

1.16. Microbiología del pozol.

Particularmente las bacterias ácido lácticas tienen un papel muy importante en la fermentación del pozol la cual se considera de tipo natural, ya que la realiza la microbiota original proveniente de la masa de nixtamal durante el proceso de elaboración de la masa. No obstante, la mayoría de los microorganismos presentes en el maíz se eliminan durante la nixtamalización, se tienen registros que la molienda y el amasado son las principales fuentes de inóculo de bacterias ácido lácticas como de bacterias indeseables (Escalante *et al.*, 2001; Illana *et al.*, 2002; Rivera-Noriega *et al.*, 2001; Wachter, 1995).

En las primeras horas de fermentación *Lactococcus* y *Leuconostoc* parecen ser los géneros dominantes. En contraste, éstos representan a los géneros menores al final de la fermentación, cuando *Lactobacillus* domina el proceso (Ampe *et al.*, 1998; Escalante *et al.*, 2001; Illana *et al.*, 2001).

En la periferia de la bola de pozol, donde el oxígeno no es una limitante se ha encontrado la mayor actividad microbiana y metabólica, en comparación con el centro

de la bola. Especies del género *Leuconostoc* parecen ser predominantes en la periferia y del género *Lactobacillus* predominan en el centro (Ampe *et al.*, 1998; Ampe *et al.*, 1999).

Existen trabajos clásicos que dieron la pauta para comenzar a entender la complejidad y riqueza de la microbiota del pozol como es el caso de Salinas que en 1958, aisló *Bacillus cereus* y *Paracolobactrum aeroginoides* (Wacher, 1995). Posteriormente, Ulloa y Herrera en 1972, aislaron *Agrobacterium azotophilum* y *Acromobacter pozolis*. En 1974 Fuentes *et al.*, reportaron a *Escherichia coli var. neapolitana* y *Pseudomonas mexicana* (Wacher, 1995).

La caracterización de la microbiota del pozol tiene un gran auge y como consecuencia se han aislado una gran variedad de bacterias principalmente ácido lácticas (Phister *et al.*, 2004). En 1995 Nuraida *et al.*, encontraron en pozol de Chiapas, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis*. Asimismo, determinaron que *Leuconostoc* predomina en la fermentación de la bola.

En 1995 Wacher, caracterizó bacterias ácido lácticas en pozol, mediante el uso de técnicas bioquímicas convencionales, reportó la presencia de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*, de este último señaló su relevancia en la fermentación debido a su predominio y al carácter amiláceo del sustrato. La aplicación de técnicas de biología molecular ha sido una herramienta fundamental y de considerable sensibilidad en la búsqueda y caracterización de la microbiota del pozol (Ampe *et al.*, 1999; Escalante *et al.*, 2001; Nuraida *et al.*, 1995; Sainz *et al.*, 2005). Se destacan la obtención de la cuantificación de los taxa microbianos, por medio de hibridación cuantitativa de ARNr 16S y determinación de la huella microbiana mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, por sus siglas en inglés). Existen reportes que las bacterias ácido lácticas constituyen entre el 90 y 97% de la microbiota activa del pozol, y predominan con un 25 al 50% las especies del género *Streptococcus*, seguidas de *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, y bacterias de los géneros *Leuconostoc* y *Weissella*. Asimismo, se determinó que la actividad microbiana fue mayor en la periferia de la bola de pozol que en el centro (Ampe *et al.*, 1998; Ampe *et al.*, 1999). En el 2001 Escalante *et al.*, por medio del análisis de secuencias del gen ADNr 16S, obtenidas por amplificación de ADN total extraído del pozol, identificaron 14 secuencias únicas correspondientes a *Streptococcus suis*, *Lactobacillus plantarum*.

Lactococcus lactis, *L. casei*, *L. alimentarium*, *L. delbrueckii* y *Clostridium* spp. Por lo tanto, las bacterias ácido lácticas constituyen el grupo principal dentro de las bacterias Gram positivas del pozol. Es importante mencionar que en el 2000 Ben Omar y Ampe, mediante DGGE propusieron que las especies del género *Streptococcus* son muy importantes en la fermentación del pozol, ya que en ciertas etapas del proceso pueden llegar a constituir hasta el 75% del total de la microbiota e identificaron a *Lactobacillus delbrueckii* y *Enterococcus sacharolyticus*. Otros estudios recientes destacan que las bacterias ácido lácticas que tienen mayor actividad amilolítica son, *Streptococcus bovis*, *Enterococcus sulfureus* y *Lactococcus lactis*, dentro de las cuales predominó *S. bovis*. De acuerdo con lo anterior, se piensa que las bacterias lácticas amilolíticas, son fundamentales en la fermentación de sustratos amiláceos (Díaz *et al.*, 2003). Para el caso del pozol, esto es particularmente importante, ya que se demostró que la nixtamalización elimina la mayor parte de mono y disacáridos, de tal modo que el almidón queda como fuente principal de carbono (Wacher, 1995). En un estudio que empleó la técnica de DGGE, se registró que en pozol con 5 días de fermentación, la banda más intensa perteneció a *Streptococcus bovis*, que se observó en todas las etapas de la fermentación, asimismo, se identificaron *Lactobacillus pentosus*, *L. casei*, *L. fermentum* y *W. paramesenteroides*. Así como también *Acetobacter* spp, *Bacillus subtilis* y *Bacillus minimum*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Bifidobacterium minimum* y *Sphingomonas* spp (Ampe *et al.*, 1999; Ben Omar *et al.*, 2000). Rivera-Noriega en el 2001 reportó a *Bacillus cereus*, *B. mycoides* y *B. lentus*. Por otra parte, es importante mencionar el hallazgo de cepas de *Escherichia coli* con factores de virulencia aisladas del pozol, con serotipos pertenecientes a los grupos 018, 088, 08, 011, 020 y 0173 (Sainz *et al.*, 2001).

A diferencia de otros alimentos fermentados amiláceos en los que predominan bacterias del género *Lactobacillus*, durante la fermentación del pozol predominan bacterias lácticas de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* (Ampe *et al.*, 1999; Ben Omar *et al.*, 2000; Morlon-Guyot *et al.*, 1998). Mismos que forman parte de la microbiota natural en otros alimentos fermentados, como quesos artesanales, carnes, salsas, entre otros alimentos, sin embargo, varias especies de dichos géneros se han reportado como causantes de enfermedades en humanos (Burne *et al.*, 2007; Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003; Pérez-Pulido *et al.*, 2006; Robredo *et al.*, 2000).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Cepas de *Streptococcus* y de *Enterococcus* constituyen un componente importante en la fermentación de maíz nixtamalizado para preparar pozol, no obstante, diferentes especies de estos géneros, se encuentran asociadas con una gran variedad de síndromes clínicos, y se ha demostrado que cuando forman parte de la microbiota de alimentos fermentados artesanales y/o industrializados pueden fungir como reservorios de genes de resistencia a los antibióticos y de virulencia. Asimismo, es ampliamente conocido el uso de bacterias ácido lácticas de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* en la industria de los alimentos (Klein, 2003; Kastner *et al.*, 2006; Hummel *et al.*, 2007; Toomey *et al.*, 2010).

El presente estudio pretende conocer el perfil de resistencia a antibióticos de cepas de enterococos y estreptococos aisladas de masa nixtamalizada para preparar pozol y su actividad hemolítica, una vez que no existen estudios al respecto en cepas de dichos géneros aisladas de pozol. Con el fin de aportar elementos al análisis, en las implicaciones en seguridad alimentaria al utilizar bacterias ácido lácticas presentes en un alimento de carácter tradicional y artesanal, como cultivos iniciadores, cultivos de protección, mejoradores de la calidad sensorial de alimentos, suplementos alimenticios, probióticos o cualquier uso biotecnológico, y generar un antecedente que motive investigaciones futuras las cuales profundicen en la problemática.

3. OBJETIVOS.

3.1. OBJETIVO GENERAL:

- I. Tipificar fenotípica y molecularmente cepas de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* aisladas de masa nixtamalizada para preparar pozol procedente de Villahermosa, Tabasco, México. Con el fin de aportar evidencias al análisis acerca de su uso en la industria alimentaria.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

- I. Aislar cepas bacterianas de la masa nixtamalizada durante la fermentación de pozol procedente de Villahermosa Tabasco, México a partir de medios de cultivo selectivos.
- II. Agrupar las cepas aisladas de pozol y cepas control mediante el análisis de la amplificación y restricción del gen ribosomal 16S (ARDRA).
- III. Identificar taxonómicamente cepas aisladas de pozol de cada grupo mediante la secuenciación de la región V1 del gen ribosomal 16S para seleccionar las pertenecientes a los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*.
- IV. Conocer la resistencia a los antibióticos y actividad hemolítica de las cepas de *Streptococcus* y *Enterococcus* aisladas de pozol.

4. HIPÓTESIS.

PUESTO QUE LAS CEPAS DE LOS GÉNEROS *STREPTOCOCCUS* Y *ENTEROCOCCUS* SON PREDOMINANTES EN LA FERMENTACIÓN DE POZOL **ENTONCES** SE PODRÁN AISLAR, AGRUPAR, IDENTIFICAR Y CONOCER LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS Y LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

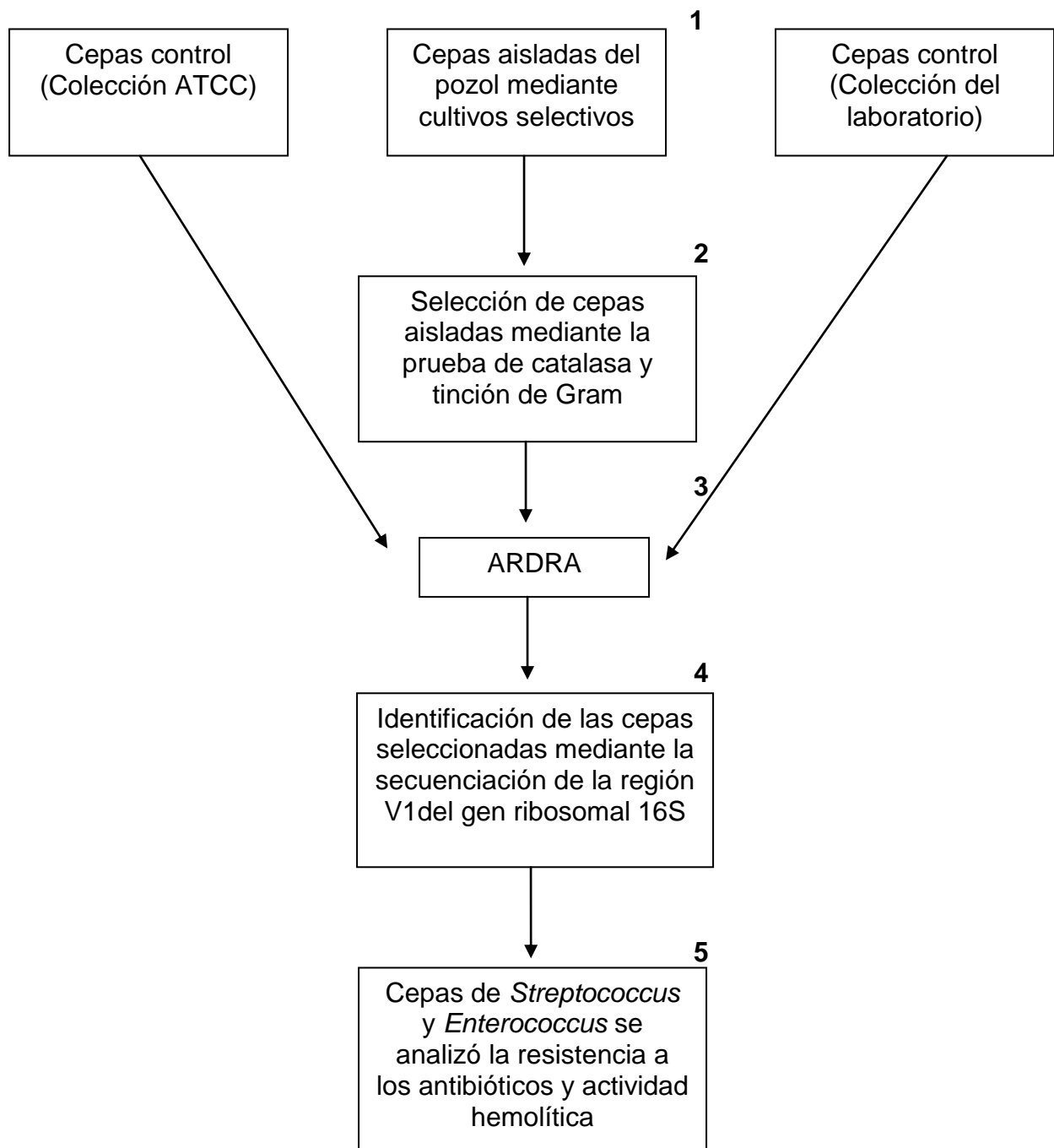


Figura 1. Estrategia experimental simplificada en 5 bloques.

5.1. Obtención del material biológico.

El 17 de Septiembre del 2007 se obtuvo una muestra fresca (del día) de 2,500 gramos de masa de maíz nixtamalizado (mestizo) en refrigeración, procedente de Villahermosa Tabasco para elaborar pozol. El mismo día se procesó la muestra en el laboratorio 324 del conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

5.2. Cepas control.

Se seleccionaron seis cepas pertenecientes a los géneros diana (*Streptococcus* y *Enterococcus*), las cuales se encuentran plenamente caracterizadas e identificadas. Provenientes de la colección microbiológica del grupo de trabajo del laboratorio L- 324, se seleccionaron tres cepas [**R1** (*Streptococcus infantarius* 25124), **R2** (*S. macedonicus* A-45201), **R3** (*Enterococcus sulfureus* A-36202)] conservadas en glicerol al 20% a -70° C. Asimismo, se eligieron tres cepas patógenas de origen clínico [**CL1** (*S. pyogenes*), **CL2** (*E. faecalis* 29212) y **CL3** (*E. faecalis* 51299)] se obtuvieron del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM Xochimilco, del laboratorio en el cual es responsable la Dra. Teresita Sainz, estas cepas provenían de la colección ATCC (American Type Culture Collection), se encontraban en placas de agar-sangre y posteriormente se resembraron en caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe), asimismo se conservaron en glicerol al 20 % a -70° C en alícuotas de 1.5 mL.

5.3. Procesamiento de la masa de maíz y aislamiento de las cepas fermentadoras de nixtamal para elaborar pozol.

Bajo condiciones asépticas dentro de una campana de flujo laminar se elaboraron 8 bolas de nixtamal de 250 gramos, cada una envuelta con hojas de plátano. Mismas que se etiquetaron para dejarse fermentar en una incubadora (VWR1550) a 32° C en diferentes tiempos (0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 horas).

Bajo las mismas condiciones, cada una de las muestras en los diferentes tiempos de fermentación se diluyeron 25 gramos de pozol en 225 mL de peptona pancreática (Oxoid) al 0.1% (dilución 1:10), en bolsas de "stomacher" ambos estériles, posteriormente se homogenizaron 60 segundos a velocidad normal en un STOMACHER 400 SEWARD. Además, del homogenizado resultante que representó la

primera dilución 10^{-1} , se tomó una muestra de 1 mL la cual se vertió en tubos de tapón de rosca con 9 mL de peptona pancreática (Oxoid) estéril, y así sucesivamente hasta llegar a la dilución 10^{-9} (diluciones 1:10). Inmediatamente después, se tomaron 100 μ L de cada una de las diluciones seleccionadas (10^{-5} – 10^{-9}), mismos que se inocularon en placas de agar con medios selectivos MRS-Almidón (Oxoid) estéril y KF (Kenner Fecal-Oxoid) por triplicado y, finalmente se incubaron a 32°C durante 48 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se seleccionaron las placas que tenían entre 30 y 300 colonias aproximadamente y donde no se observó sobrelapamiento de las mismas, de las cuales se realizó un conteo en placa. Las placas de agar MRS-A y de medio KF seleccionadas se sellaron en los bordes con parafilm y se conservaron temporalmente en refrigeración a 3°C.

5.4. Purificación de los aislados.

De las placas seleccionadas del medio MRS-A y KF por cada tiempo de fermentación (8 tiempos) se eligieron 10 colonias con tamaños distintos y con halo de hidrólisis (para el caso del MRS-A), y las colonias de color rojo y de tamaños diferentes para el KF, se procuró en ambos casos tomar una muestra diversa de las colonias presentes. Posteriormente se inoculó cada colonia seleccionada por separado en placas de agar MRS y se incubaron a 32° C durante 48 horas.

5.5 Selección de cepas puras.

De cada colonia purificada e inoculada en el medio MRS, se realizó la tinción de Gram y la prueba de catalasa utilizando peróxido de hidrogeno (J.T.Baker). Se seleccionaron todas aquellas colonias que mostraron el fenotipo esperado (Gram positivo y catalasa negativa). Así mismo se determinaron arbitrariamente diferentes clases de morfotipos en las bacterias observadas en un microscopio óptico (Olympus) con el objetivo de inmersión 100X.

5.6. Conservación de las cepas aisladas.

De las colonias previamente aisladas del pozol, purificadas en el medio MRS y seleccionadas mediante la tinción de Gram y la prueba de catalasa se procedió a conservarlas en caldo MRS (Oxoid) con glicerol (J.T.Baker) al 20% en ultra congelación

a -70°C (largo plazo), y en agar APT (Difco) semisólido con carbonato de calcio (J.T.Baker) en refrigeración a 3°C (mediano plazo).

5.7. Criterio de selección de cepas puras.

Con el fin de manejar menor cantidad de cepas y tomar una muestra considerable para el estudio, se seleccionaron un total de 80 cultivos puros provenientes de ambos medios selectivos (40 MRS-A y 40 KF) se respetaron las mismas frecuencias encontradas en cuanto a diversidad morfológica (Tabla 3). Por lo tanto, de las cepas conservadas en medio MRS líquido (Oxoid) con glicerol (J.T. Baker) al 20% en ultracongelación a -70° C, se reactivaron en caldo APT (Difco) de 24 a 48 horas de incubación a 30° C dependiendo de qué tan evidente fue el crecimiento de los cultivos.

Tabla 3. Numero de cepas seleccionadas de ambos medios selectivos.

Morfotipos	#Cepas seleccionadas	
	MRS-A	KF
Típica. Ovoide	23/58%	13/33%
Típica Redonda	14/35%	25/61%
Ligeramente bacilares	2/5%	2/5%
Bacilar (no muy alargada)	1/1.2%	Ninguna
Total	40	40

5.8. Extracción de ADN.

Se llevó a cabo utilizando el procedimiento fenol-cloroformo (Ausbel *et al.*, 2005). De las cepas seleccionadas provenientes tanto del medio MRS-A como del KF, y las cepas de referencia se reactivaron en caldo APT de 24 a 48 horas de incubación a 30° C dependiendo de qué tan evidente fuera el crecimiento de los cultivos. Las cepas control patógenas se resembraron en el mismo medio bajo las mismas condiciones.

Posteriormente se colocó una muestra de 1.5 mL en tubos “eppendorf” de cada cultivo y se centrifugó 10 minutos a 12,000 rpm, se decantó el sobrenadante y se resuspendió con 500 µL de amortiguador TES 10X (Tris base 0.05M, EDTA 0.005M pH8,

NaCl 0.05M), después se le adicionó 20 μ L de una solución de lisozima (20 mg/ μ L), se agitó vigorosamente la muestra y se incubó a 37° C por un periodo de 45 minutos. Posteriormente, se le agregaron 8 μ L de pronasa (20 mg/ μ L) y 8 μ L de RNAsa (20 mg/ μ L), se agitaron vigorosamente las muestras y se incubaron a 65° C por 1 h. A continuación se adicionaron 120 μ L de SDS al 10 %, incubándose nuevamente a 65° C por 10 minutos, transcurrido este tiempo se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se le añadieron 600 μ L de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitaron vigorosamente hasta formar una emulsión blanca y se centrifugó por 10 minutos a 14,000 rpm. Se obtuvieron 3 fases de las cuales se recuperó la fase superior (que contiene el ADN) transfiriéndose a un microtubo limpio (procedimiento que se realizó dos veces), se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto a -20° C, agitando suavemente, después, se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante por decantación y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente por 24 horas. Por último, se resuspendió el precipitado en 50 μ L de agua desionizada estéril y se incubó a 55° C por 1 h. Las muestras de ADN se almacenaron a -20°C hasta su uso.

5.9. Cuantificación y evaluación de la pureza del ADN total de las cepas seleccionadas.

Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm. Para calcular la concentración de ADN, se tomó en cuenta que cada unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 μ g/mL de ADN de doble cadena, así como el factor de dilución y el factor de corrección para una celda de cuarzo de 15 μ L. La pureza del ADN se valoró midiendo la absorbancia a 280 nm con la misma muestra para obtener el coeficiente $\lambda_{260}/\lambda_{280}$, que debe ser cercano a 1.8 (Ausbel *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2001).

5.10. Detección del ADN total de las cepas seleccionadas extraídas de pozol.

Se realizó una electroforesis al ADN (90 V/45 min.) extraído de las cepas seleccionadas en gel de agarosa al 1% (p/v) y amortiguador TBE 1X (Tris base 0.05M, ácido bórico 0.01M, EDTA 0.001M pH8). Para ello, los gels fueron teñidos con una solución de

bromuro de etidio (10 mg/mL) y visualizados por iluminación con luz ultravioleta (Ausbel *et al.*, 2005) en el equipo Fluor-S (BIORAD).

5.11. Amplificación del gen ribosomal 16S para cepas puras aisladas de pozol.

El gen ADNr 16S se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), utilizando el cebador hacia adelante pH y el cebador hacia atrás pA para bacterias (Rodas *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2001) (Tabla 4). La amplificación por PCR se llevó a cabo en 50 µL de la mezcla de reacción compuesta por 10 mM de dNTP's, 20 pmol de cada cebador, 1 U de *Taq* polimerasa y 75 ng de ADN molde, agregando agua desionizada estéril hasta el volumen final de 50 µL. La amplificación se llevó a cabo utilizando un termociclador (Biometra, Tpersonal) bajo las condiciones mostradas en la tabla 5 (Rodas *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2001).

Tabla 4. Cebadores utilizados para amplificar el gen 16S RNA en bacterias.

Cebador	Posición	Secuencia	Orientación
pH	1540–1521	5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3'	Hacia adelante
pA	9–28	5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'	Hacia atrás

(Rodas *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2001).

Tabla 5. Condiciones de PCR para amplificar el gen 16S RNA en bacterias.

	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
Desnaturalización	1	94	5
Desnaturalización		94	0.5
Alineamiento	35	56	0.5
Elongación		72	1
Elongación	1	72	5

(Rodas *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2001).

La detección de los amplicones de 1.5Kb, se llevó a cabo por electroforesis (85V/90 min.) en gel de agarosa al 1.8 % (p/v) y TBE 1X (base, ácido bórico, EDTA 0.001M pH 8) los cuales fueron teñidos en una solución de bromuro de etidio (10 mg/mL) y visualizados por iluminación con luz ultravioleta en el equipo Fluor-S (BIORAD) (Ausbel *et al.*, 2005).

5.12. Análisis de restricción del gen ADNr 16S (ARDRA).

Los amplicones del gen ADNr 16S obtenidos de las cepas aisladas de pozol y cepas control, se sometieron a digestión mediante las enzimas *Hae III* (Invitrogen) y *Hinf I* (Fermentas) (Tabla 6) estas fueron seleccionadas basados en el número de sitios de corte, mediante el programa REBASE (www.rebase.ncbi.com/rebase/rebase.html).

La detección de los fragmentos de la restricción del gen ADNr 16S, se realizó por electroforesis (55V / 120 min.) en gel de agarosa al 2.5% (p/v) y TBE 1X (base TRIS, ácido bórico, EDTA 0.001M pH8) los cuales fueron teñidos en una solución de bromuro de etidio (10 mg / mL) y visualizados por iluminación con luz ultravioleta en el equipo Fluor-S de BIORAD (Rodas *et al.*, 2003; Chackravorty *et al.*, 2007).

Tabla 6. Condiciones de restricción.

Reactivos	Volumen (µL)
Amplicones del gen ADNr 16S (1µg / µL)	10
Enzima de restricción (10U / µL)	1
Buffer 10X	1.5
Agua desionizada estéril	2.5
Volumen total de reacción	15

La incubación se realizó a 37° C durante 12 horas.

5.13. Análisis de datos del ARDRA.

Para el análisis de los fragmentos obtenidos de la restricción se construyó una matriz de presencia y ausencia de bandas para cada una de las endonucleasas, misma que se proceso con el programa “Treecon for Windows”, y mediante el agrupamiento por UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) y el modelo de Nei y Li se construyeron los dendrogramas (Rodas *et al.*, 2003; Chackravorty *et al.*, 2007).

5.14. Selección y procesamiento de cepas para secuenciar la región V1 del gen ADNr 16S.

Una vez que se obtuvieron los dendrogramas procedentes de los datos arrojados por el análisis de restricción del gen ADNr 16S (ARDRA), se eligieron 40 cepas de las 80 totales, 20 procedentes del medio MRS-A y 20 del KF (Tabla 7), es importante señalar que se incluyeron cepas de todos los grupos y líneas de ambos dendrogramas.

Tabla 7. Cepas seleccionadas en ambos medios de cultivo.

MRS-A	KF
1	83
3	84
5	89
6	91
8	92
9	93
11	95
17	96
23	97
25	98
33	99
36	105
40	107
43	109
50	112
52	115
53	119
67	130
68	152
71	154

Así mismo, de cada cepa seleccionada se realizó nuevamente y bajo las mismas condiciones la amplificación del gen ADNr 16S, en la cual se utilizó el cebador 3 en lugar del pH (Rodas *et al.*, 2003; Chackravorty *et al.*, 2007) (Tabla 8).

Tabla 8. Cebadores utilizados para amplificar el gen 16S ADNr.

Cebador	Posición	Secuencia	Orientación
pA	9–28	5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'	Hacia atrás
3	1109-1090	5' GTT GCG CTC GTT GCG GGA CT 3'	Hacia adelante

(Rodas *et al.*, 2003; Chackravorty *et al.*, 2007).

Para comprobar la presencia de los amplificados se llevó a cabo la electroforesis (85 V. / 90 min.) en gel de agarosa al 1.8 % (p/v) y TBE 1X (base, ácido bórico, EDTA 0.001M pH 8) se tiñó en una solución de bromuro de etidio (10 mg / mL) y visualizados por iluminación con luz ultravioleta en el equipo Fluor-S (BIORAD).

A partir de la obtención de los amplicones se procedió a su purificación mediante el “Kit purification ADN” de Millipore Inc. siguiendo estrictamente las especificaciones del producto. Después, se determinó la concentración (ng/v) al utilizar como referencia el marcador de concentración Lambda ADN / *Hinf* III “Reading to use” de la marca (Fermentas Life Science) y la presencia de los amplicones purificados mediante una electroforesis (85V; 90 min.) en gel de agarosa al 1.8 % (p/v) y TBE 1X (base, ácido bórico, EDTA 0.001M pH. 8) se tiñó en una solución de bromuro de etidio (10 mg / mL) y visualizados por iluminación con luz ultravioleta en el equipo Fluor-S (BIORAD) (Chackravorty *et al.*, 2007).

Por último, se envió a secuenciar la región V1 de los amplificados del gen ADNr 16S de las 40 cepas seleccionadas en alícuotas de 500ng / 20µL cada una, a la empresa MacroGene Inc.

5.15. Identificación de las cepas seleccionadas.

Las secuencias obtenidas de la región V1 del gen ADNr 16S fueron comparadas con el banco de datos del “GenBank” (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) usando el programa “Blast” (Basic local alignment search tool, por sus siglas en inglés), así mismo se tomaron en cuenta los valores más altos en los registros de la búsqueda para determinar la

identidad de las cepas aisladas de pozol (Chakravorty *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2001).

5.16. Prueba de sensibilidad a los antibióticos por difusión con discos a las cepas de *Streptococcus* y *Enterococcus* aisladas de pozol y cepas de origen clínico.

Una vez identificadas las cepas correspondientes a los géneros *Enterococcus* y *Streptococcus* (30 en total), junto con las de origen clínico (CL1, CL2, CL3) se procedió a reactivarlas en medio líquido APT a 30° C durante 24 horas, dado que se encontraban en crio-preservación a -70° C con glicerol al 20%. Posteriormente, se diluyeron los cultivos con una solución de agua peptonada estéril al 1% hasta que se equiparó la turbidez con el tubo # 5 de McFarland.

Así mismo, de los tubos con los cultivos estandarizados se tomaron alícuotas de 100µL y se inocularon en placas de agar con medio MRS, y con la ayuda de un asa triangular se esparció uniformemente la muestra. Después, se dejaron secar las placas aproximadamente 5 minutos e inmediatamente se colocaron los sensi-discos de la marca BBL de manera equidistante de centro a centro con una separación de 25mm, de tal modo que solo cinco de éstos se acomodaron en las placas, por lo tanto para cada cepa le correspondieron dos placas (Caja 1 y 2), para así completar los diez antibióticos (Tabla 9) a los cuales se sometió cada cultivo. Por último, los cultivos se incubaron 48 horas a 30° C.

Los antibióticos se seleccionaron a partir de las recomendaciones del “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, por sus siglas en inglés) avalado por la organización mundial de la salud, para la evaluación de cepas patógenas bacterianas comunes.

Tabla 9. Lista de antibióticos empleados en el estudio y su concentración mínima inhibitoria (CMI).

Antibióticos [CMI]	
Caja 1	Caja 2
(C) Cloramfenicol [30µg]	(N) Neomicina [30µg]
(CX) Cloxacilina [1µg]	(NET) Netilmicina [30µg]
(E) Eritromicina [15µg]	(P) Penicilina [10 UI*]
(GM) Gentamicina [10µg]	(TE) Tetraciclina [30µg]
(K) Kanamicina [30µg]	(VA) Vancomicina [30µg]

()=Abreviatura del antibiótico,*=Unidades internacionales.

5.17. Interpretación de los resultados de la prueba de sensi-discos en las cepas de *Streptococcus* y *Enterococcus* y de origen clínico.

Transcurrido el tiempo de incubación de las cepas, se procedió en principio a observar a contraluz la presencia o ausencia de halos de inhibición en cada una de las placas y posteriormente, se midieron los halos de todas las cepas y para cada uno de los antibióticos con una regla hasta el límite de la circunferencia donde no hubo crecimiento bacteriano, incluyendo el diámetro del disco.

La interpretación del diámetro de los halos se baso en el documento M100-S17 (M2) del "CLSI" que recomienda y cita el fabricante de los sensi-discos (BBL), del cual se derivan tres parámetros cualitativos:

- 1) Sensible.
- 2) Intermedio.
- 3) Resistente.

Por último, cabe señalar que cada antibiótico tiene sus valores en particular para interpretar sus parámetros.

5.18. Prueba de hemólisis a las cepas de *Streptococcus* y *Enterococcus* aisladas de pozol y de origen clínicas en agar MRS-sangre.

A partir de las cepas identificadas de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* (30 cepas) y las cepas de origen clínico (3 cepas), se sometieron a crecimiento en placas de MRS-sangre de origen bovino al 5%, y se incubaron a 32° C por 48 horas con el propósito de conocer los siguientes fenotipos: a) Alfa hemólisis. Lisis completa de células sanguíneas. b) Beta hemólisis. Lisis parcial de células sanguíneas. c) Gama

hemólisis. No existe lisis de células sanguíneas. Para poder identificar actividad hemolítica en presencia y ausencia de oxígeno, las cepas de 24 horas de incubación se inocularon tanto por el método de estriado como de punción profunda.

5.19. Interpretación de los resultados de la prueba de hemólisis a las cepas de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* aisladas de pozol y de origen clínico.

Una vez que culminó el tiempo de incubación se procedió a revisar las placas de MRS-sangre al 5%, se observó el contorno de cada colonia con el propósito de identificar tres características: a) Un halo transparente alrededor de las colonias lo cual corresponde a una actividad alfa hemolítica. b) Un halo de color verde-parduzco que corresponde a una actividad beta hemolítica. c) Sin cambio alguno en la coloración roja del medio lo que corresponde a una gama hemólisis.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1. Aislamiento y selección de cepas bacterianas fermentadoras de pozol.

Se seleccionaron 10 colonias de cada placa que contenían entre 30 y 300 cepas (Wacher *et al.*, 2000) por cada medio (MRS-Almidón y KF) y de cada uno de los tiempos de fermentación (0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 horas). Posteriormente se realizó un conteo en placa de las mismas (Figura 1). Finalmente se obtuvieron un total de 160 colonias purificadas en medio MRS, las cuales se sometieron a tinción de Gram, prueba de catalasa, y observación bajo microscopio para diferenciar entre morfotipos de las bacterias que conformaron las colonias.

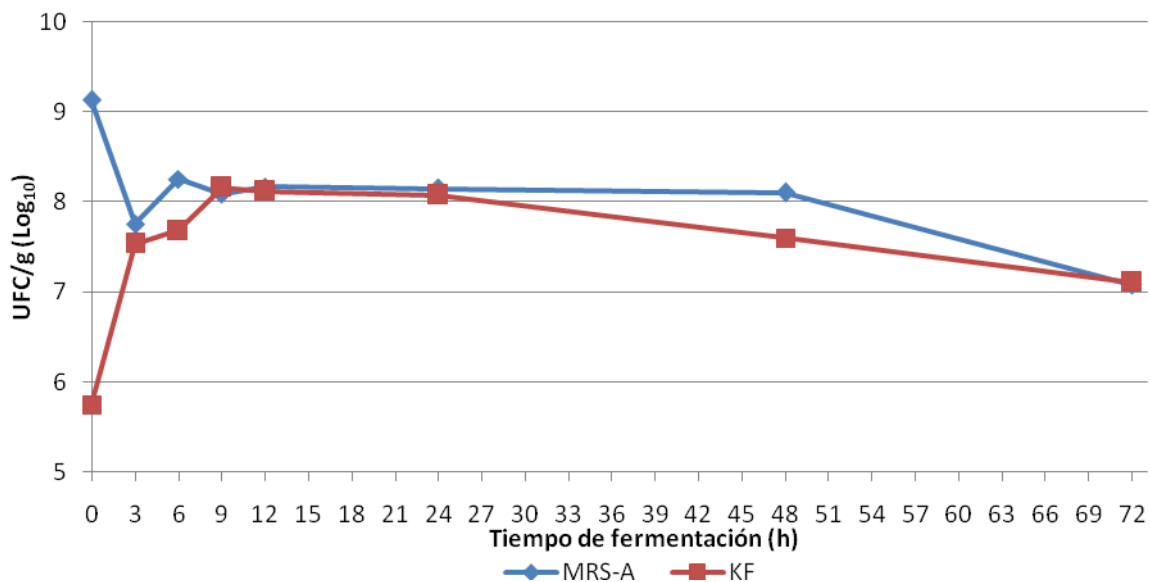


Figura 1. Conteo de colonias aisladas con los medios MRS-A y KF de masa nixtamalizada para preparar pozol en diferentes tiempos de fermentación.

De manera general, se observa que en las primeras horas de la fermentación (0,9 h) se registraron las cuentas más altas en ambos medios de cultivo. Posteriormente, de las 12 a 24 horas se estabilizaron las poblaciones puesto que se obtuvieron cuentas similares en las cepas aisladas en ambos medios, a las 48 horas se observa un evidente decremento de las colonias aisladas con el medio KF y un ligero descenso en las cepas aisladas con el medio MRS-A y a las 72 horas se registró una disminución en el número de colonias en ambos medios (Figura 1).

Lo anterior se puede explicar debido a que en las primeras horas de fermentación de la masa nixtamalizada para elaborar pozol, se encuentran disponibles azúcares simples como la sacarosa, los cuales son aprovechados por la mayoría de las bacterias que conforman a la comunidad (Wacher *et al.*, 2000), una vez que se agota la sacarosa, el almidón es la fuente principal de energía de la cual se alimentan fundamentalmente las bacterias amilolíticas, y por consecuencia se derivó la fase estable (12-24 h) en el conteo de UFC/g. En la parte final de la fermentación (72 h) las fuentes de carbono disminuyen, lo cual afecta la fase de estabilidad disminuyendo el número de UFC/g, y según reportes, en esta etapa el medio se acidifica alrededor de 4.3-4.6 pH lo cual puede disminuir el crecimiento de la microbiota presente (Wacher *et al.*, 2000).

Las colonias aisladas con el medio MRS-A que al aplicarles la tinción de Gram mostraron una coloración azul (Gram positivas) fueron 96.25% (77/80), y el 100% 80/80 de las colonias fueron catalasa negativa (sin emisión de O₂) (Figura 1).

Con respecto a las colonias aisladas con el medio KF 92.5% (74/80) fueron Gram positivas y 95% (76/80) fueron catalasa negativas (Figura 2).

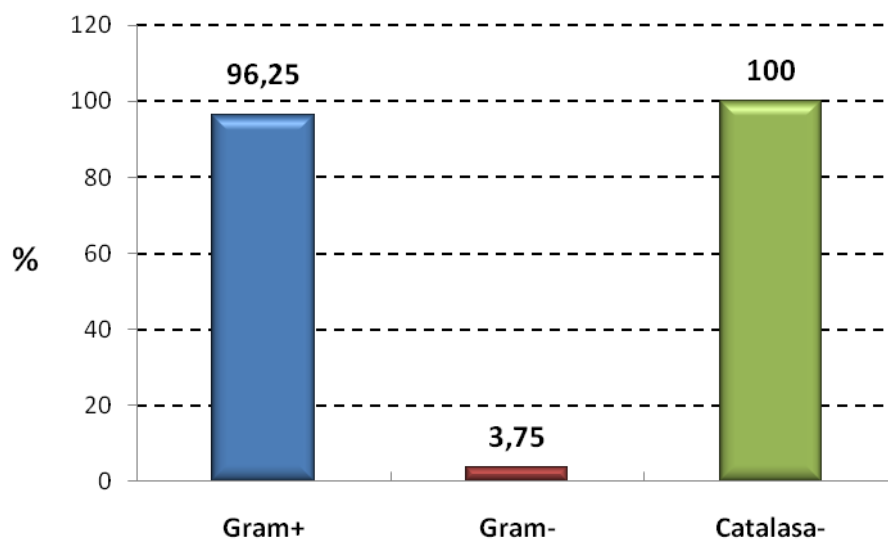


Figura 2. Porcentaje de colonias Gram positivas, negativas y prueba de catalasa, aisladas con el medio MRS-A.

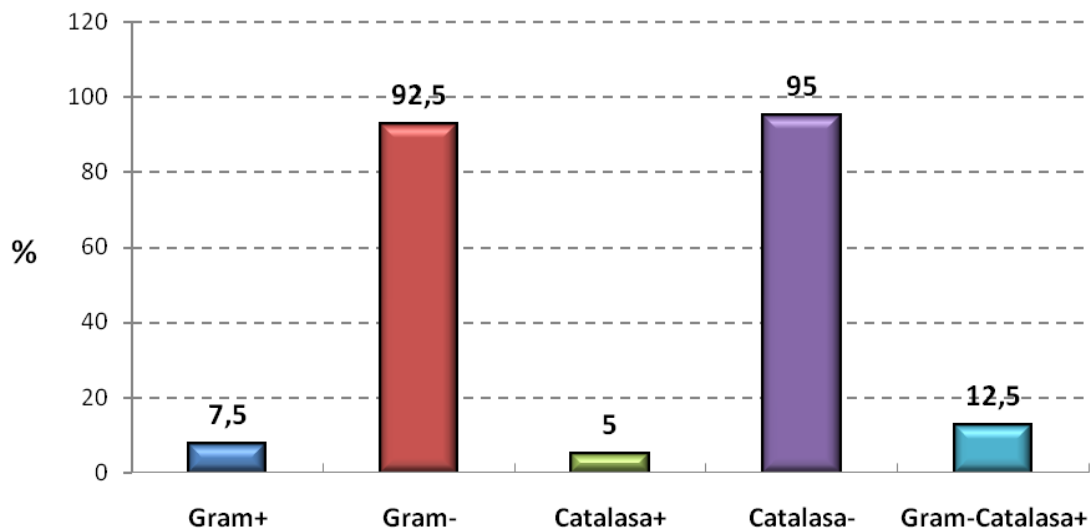


Figura 3. Porcentaje de colonias Gram positivas, negativas y prueba de catalasa, aisladas con el medio KF.

Se observó la morfología microscópica de las 160 cepas aisladas con los medios MRS-A y KF y se clasificaron los morfotipos de manera arbitraria en:

1. **Forma típica ovoide.** Las bacterias se observaron claramente con una tendencia ovoide (**Tipo I**).
2. **Forma típica ligeramente ovoide.** Las bacterias se observaron con una mayor tendencia en su morfología a ser redondas, con una muy ligera percepción a ser ovoides y, en tamaño claramente más pequeñas que el morfotipo anterior (**Tipo II**).
3. **Forma con una tendencia a ser bacilares (Tipo III).**
4. **Forma claramente bacilar.** Sin llegar a ser filamentosas (no muy alargadas) (**Tipo IV**).

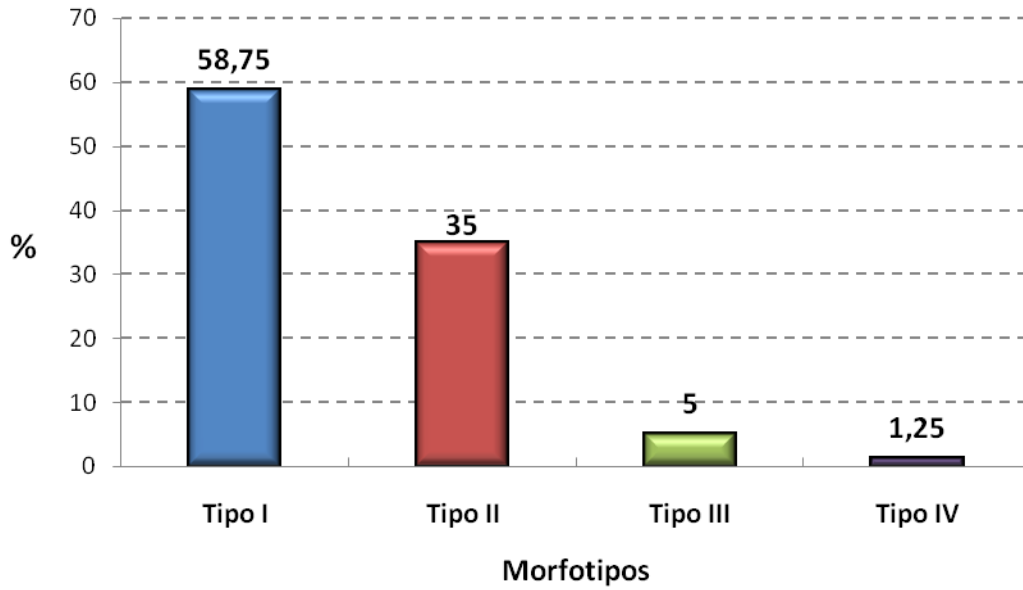


Figura 4. Porcentaje de los morfotipos microscópicos de las colonias aisladas con el medio MRS-A.

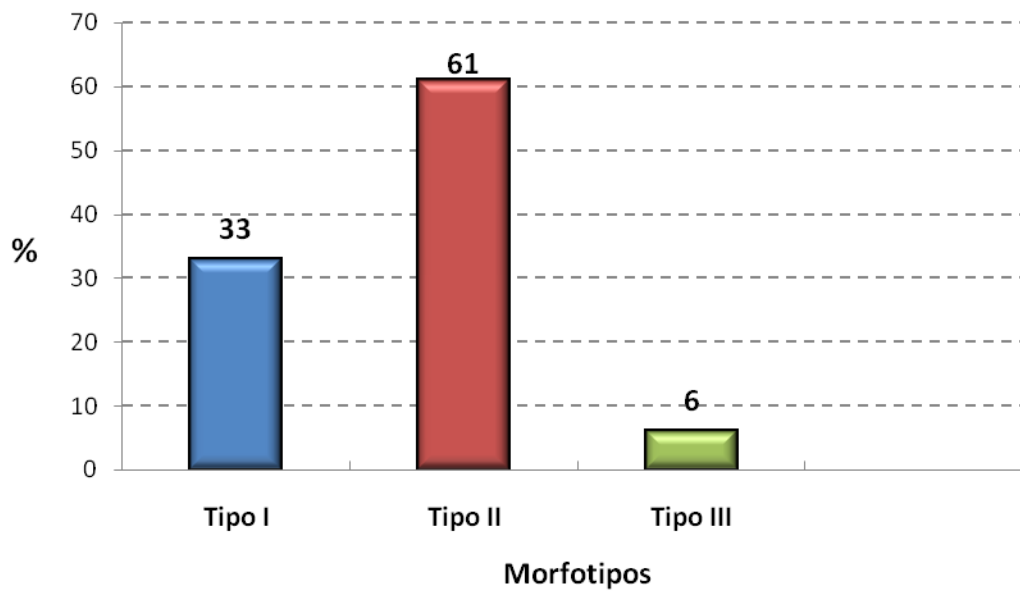


Figura 5. Porcentaje de los morfotipos microscópicos de las colonias aisladas con el medio KF.

Las 80 colonias aisladas de maíz nixtamalizado para preparar pozol mediante el agar MRS-A y que posteriormente se purificaron en agar MRS, mostraron en un 96.2% ser Gram positivas y un 100% catalasa negativas (Figura 2), el porcentaje de colonias restante 3.7% (3/80) que no perteneció al fenotipo esperado se excluyeron del estudio. En relación a los morfotipos microscópicos observados, en términos globales se obtuvo un 93.7% (tipo I + tipo II) de colonias con morfología típica ó característica para los estreptococos (Burne *et al.*, 2007) (Figura 4). Así mismo, se esperó que las colonias seleccionadas correspondieran en su mayoría a especies de estreptococos, una vez que han sido reportadas como una de las bacterias amilolíticas predominantes en la fermentación del pozol (Ampe *et al.*, 1999; Bolaños *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2003; Escalante *et al.*, 2001).

De las 80 colonias aisladas del pozol con el medio KF se registró un 92.5% de colonias Gram positivas y un 95% de catalasa negativa (Figura 3) que representan cifras mayoritarias en cuanto a los fenotipos esperados para el género *Enterococcus*. En términos netos se seleccionaron el 87.5% (70/80) de las colonias (Gram positivas y catalasa negativas), lo cual representa una notable mayoría en comparación con el 12.5% (10/80) (Figura 3) de los fenotipos excluidos (Gram- y catalasa +). La morfología observada al microscopio indicó que un 94% (tipo I + tipo II) de las colonias presentaron características atribuidas a los enterococos (Figura 5) (Burne *et al.*, 2007). Cabe señalar que el morfotipo II predominó en las colonias aisladas con el medio KF en contraste con el morfotipo I que fue mayoría en las cepas aisladas con MRS-Almidón. De tal modo que las colonias que se aislaron a partir del medio KF y seleccionaron por las técnicas antes mencionadas permitió pronosticar la probable existencia de especies del género *Enterococcus*.

Por lo tanto de las 160 colonias aisladas del pozol con los medios selectivos MRS-A y KF, se eliminaron 13 colonias que no correspondieron al fenotipo esperado para los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* en base a la tinción de Gram y la prueba de catalasa; así mismo, la mayoría de las cepas aisladas presentó características fenotípicas propias de los enterococos y estreptococos.

6.2. Obtención del ADN de las cepas seleccionadas.

De las 80 cepas seleccionadas procedentes del medio MRS-Almidón (40) y KF (40) se obtuvo una alícuota de ADN con diferentes concentraciones y purezas. Así mismo se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa para corroborar su presencia.

La concentración de ADN obtenida de las 80 cepas puras aisladas de pozol con los medios MRS-A y KF, fluctuó entre los 400 µg/mL y cantidades cercanas a los 5000 µg/mL, lo cual se consideró suficiente para emplearse como templado en la amplificación del gen ribosomal 16S, una vez que solo se necesitaron 75 ng/µL para cada reacción. En cuanto a los valores de pureza calculados, se observó que aproximadamente la mitad de las alícuotas se ubicaron entre valores de 1.6 y 2.0 en el coeficiente 260nm / 280nm, lo cual indica grados de pureza aceptables, las restantes entre 1.5 y 1.1 probablemente se debió a contaminación proteica (Nocker *et al.*, 2006). No obstante, todas las alícuotas se consideraron útiles para los experimentos posteriores.

6.3. Amplificación del gen ADNr 16S de las cepas puras seleccionadas y aisladas de pozol y de cepas control.

Se obtuvieron los amplicones del tamaño esperado (1527pb) correspondientes al gen ribosomal 16S para las 40 cepas puras seleccionadas y aisladas de pozol con el medio selectivo MRS-A (Figura 7-9).

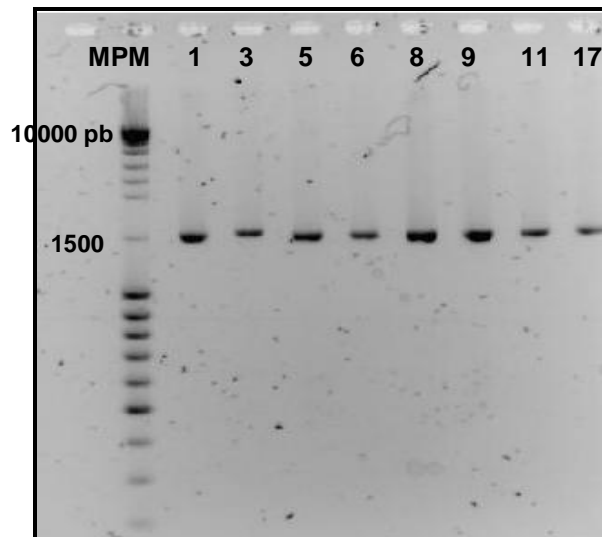


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de productos de PCR del gen ADNr 16S de cepas puras aisladas de pozol con medio MRS-A. Condiciones de electroforesis: 85 V. / 90 min.

Se obtuvieron los amplicones esperados de 1527pb correspondientes al gen ribosomal 16S para las 40 cepas puras seleccionadas y aisladas del pozol con el medio selectivo KF.

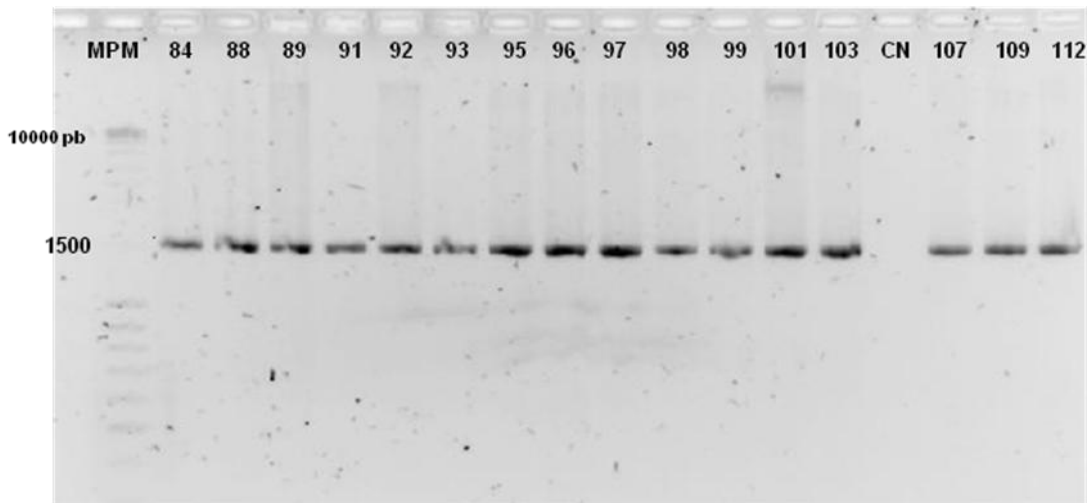


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de productos de PCR del gen ADNr 16S de cepas puras del aisladas con medio KF. Condiciones de electroforesis: 85 V. / 90 min.

Se obtuvieron los amplificados del gen ribosomal 16S de las tres cepas patógenas procedentes del acervo microbiológico (ATCC) y de las cepas referencia previamente aisladas del pozol (Figuras 14-15).

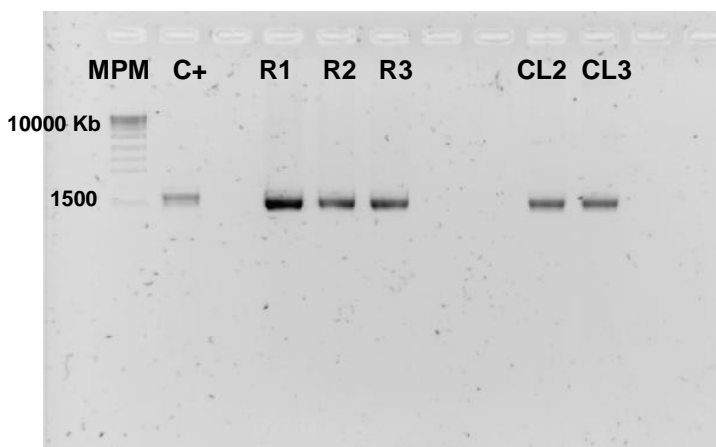


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de los amplicones del gen ADNr 16S de las cepas control (patógenas y referencias), **C+** (Control positivo), **R1** (*Streptococcus infantarius* 25124), **R2** (*S. macedonicus* A-45201), **R3** (*Enterococcus sulfureus* A-36202), **CL2** (*E. faecalis* 29212) y **CL3** (*E. faecalis* 51299). Condiciones de electroforesis: 85V / 90 min.

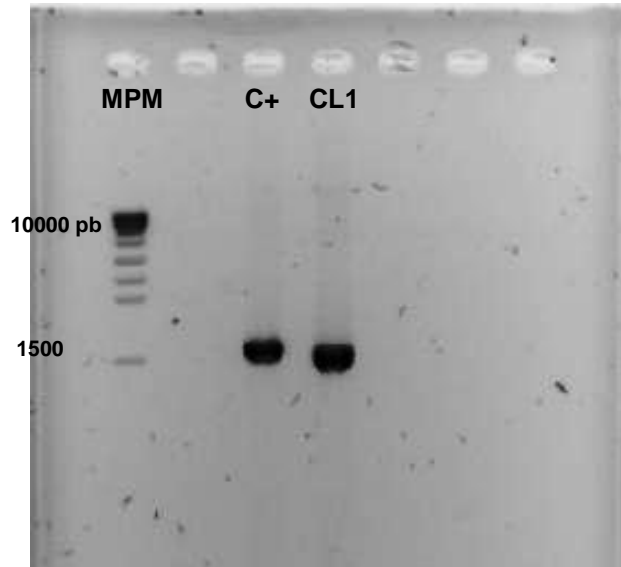


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de los amplicones del gen ADNr 16S de la cepa control *Streptococcus pyogenes* (CL1). Condiciones de electroforesis: 85 V. / 90 min.

Se logró obtener amplificadas de aproximadamente 1.5Kb que corresponden al tamaño del gen ribosomal 16S (Figura 7-15) para todas las cepas aisladas y seleccionadas de pozol, así como las cepas control.

Es importante señalar que la secuencia del gen ADNr 16S es ampliamente utilizada para identificar especies bacterianas, ya que contiene nueve regiones hipervariables que presentan una considerable diversidad en sus secuencias entre diferentes especies procariontas (Chakravorty *et al.*, 2007). Además, el gen es empleado para diversos estudios filogenéticos y agrupamientos mediante el ARDRA de bacterias provenientes de diversos orígenes tanto ambientales como de alimentos (Escalante *et al.*, 2001; Viti *et al.*, 2005).

6.4. Restricción del gen ADNr 16S de las cepas seleccionadas aisladas de pozol y cepas control.

Se generaron fragmentos del gen ADNr 16S de las cepas control, mediante las enzimas de restricción *Hae III* y *Hinf I* (Figuras 16 y 17).

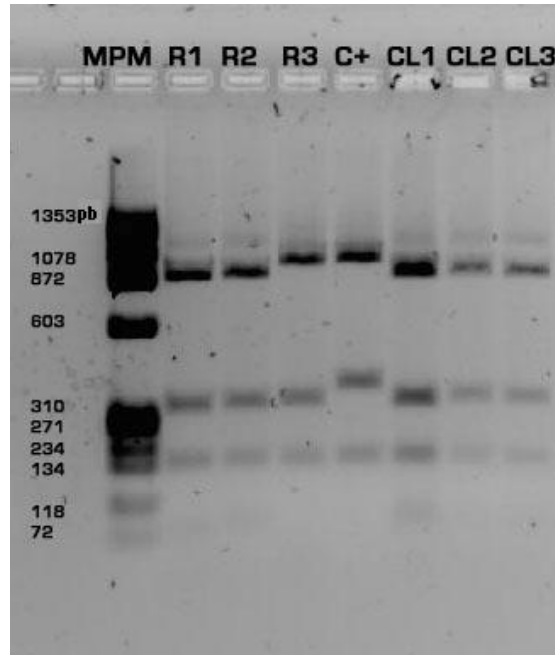


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % a 55 V. / 120 minutos de los fragmentos del gen ADNr 16S generados con la enzima de restricción *Hinf I*. **C+** (Control positivo), **R1** (*Streptococcus infantarius* 25124), **R2** (*S. macedonicus* A-45201), **R3** (*Enterococcus sulfureus* A-36202), **CL1** (*S. pyogenes*), **CL2** (*E. faecalis* 29212) y **CL3** (*E. faecalis* 51299).

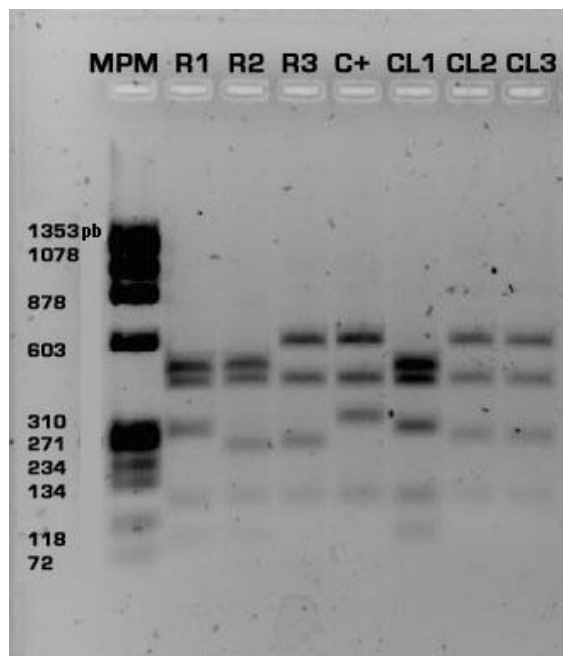


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % a 55 V. / 120 minutos de los fragmentos del gen ADNr 16S generados con la enzima de restricción *Hae III*. **C+** (Control positivo), **R1** (*Streptococcus infantarius* 25124), **R2** (*S. macedonicus* A-45201), **R3** (*Enterococcus sulfureus* A-36202), **CL1** (*S. pyogenes*), **CL2** (*E. faecalis* 29212) y **CL3** (*E. faecalis* 51299). Condiciones de electroforesis: 85 V. / 90 min.

Se realizó la digestión del gen ADNr 16S por medio de las enzimas de restricción *Hinf I* (Figuras 18-23) y *Hae III* (Figuras 24-31) a las 80 cepas puras seleccionadas y aisladas del pozol.

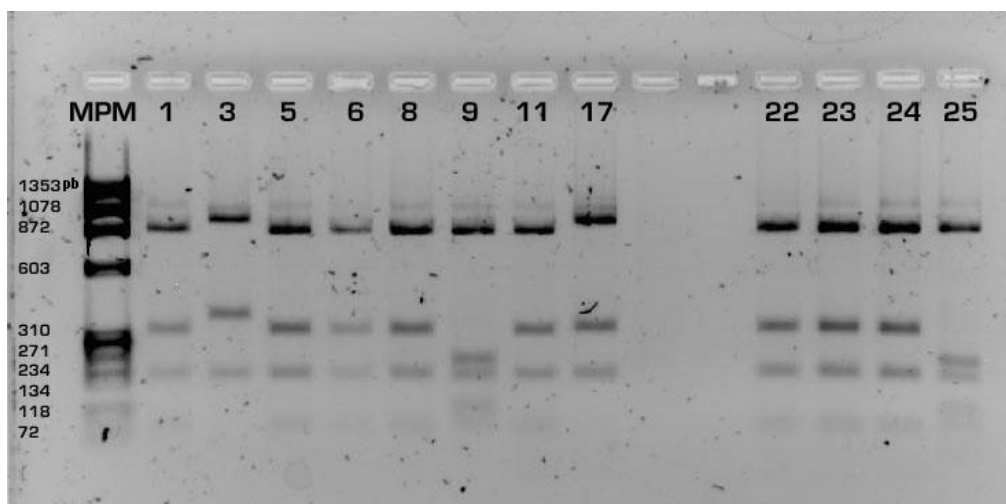


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % a 55 V. / 120 minutos de los fragmentos del gen ADNr 16S generados con la enzima de restricción *Hinf I* de cepas aisladas con el medio MRS-A.

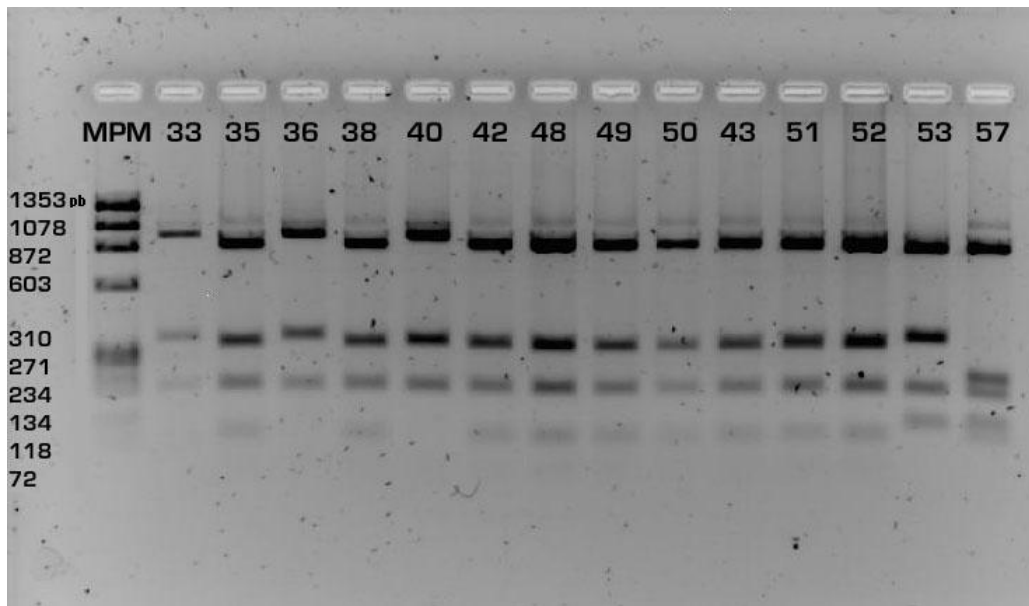


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % a 55 V. / 120 minutos de los fragmentos del gen ADNr 16S generados con la enzima de restricción *Hinf I* de cepas aisladas con el medio MRS-A.

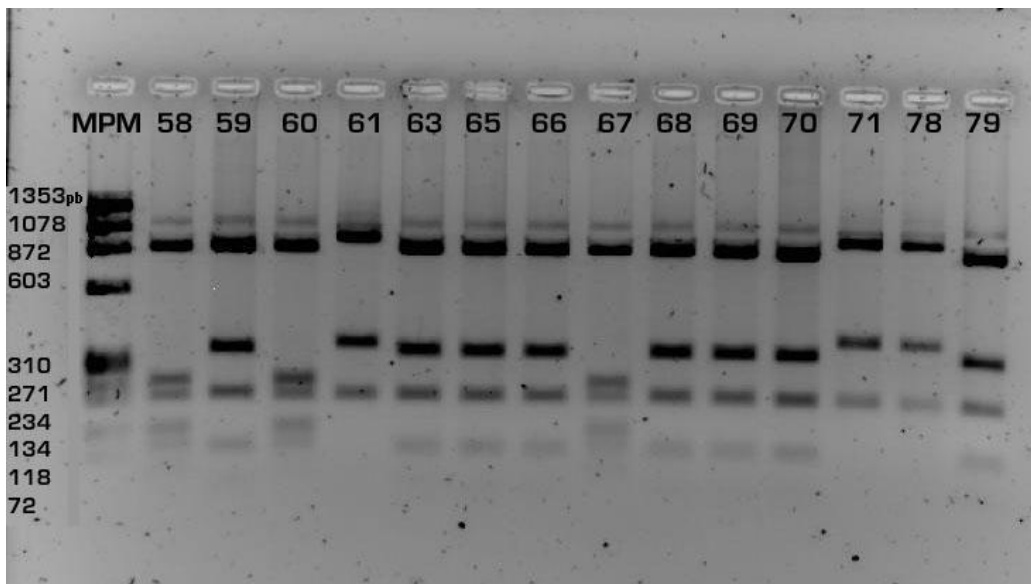


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % a 55 V. / 120 minutos de los fragmentos del gen ADNr 16S generados con la enzima de restricción *Hinf I* de cepas aisladas con el medio MRS-A.

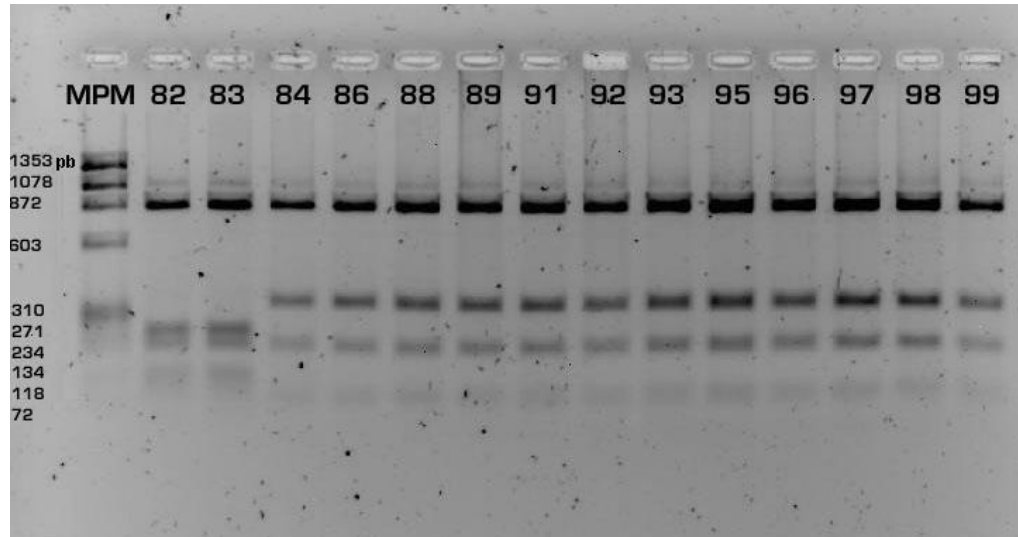


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % a 55 V. / 120 minutos de los fragmentos del gen ADNr 16S generados con la enzima de restricción *Hinf I* de cepas aisladas con el medio KF.

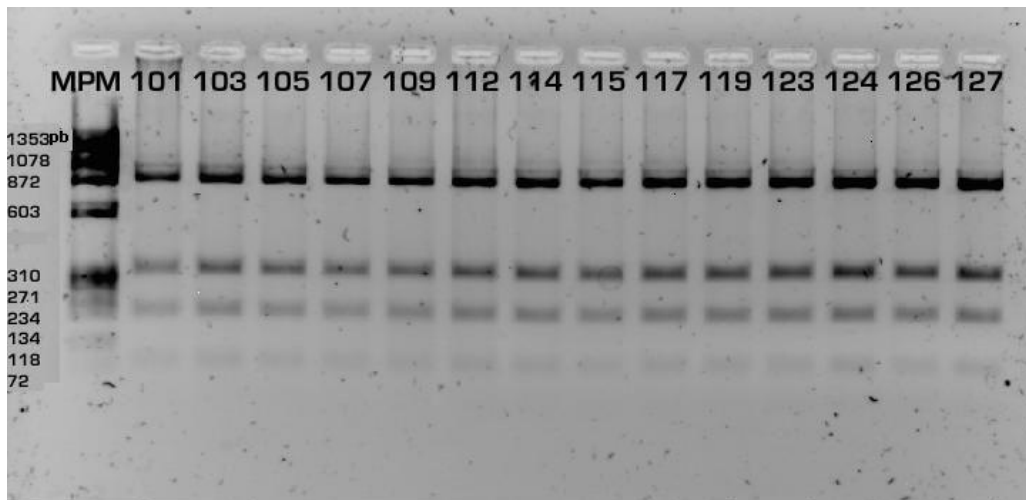


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % a 55 V. / 120 minutos de los fragmentos del gen ADNr 16S generados con la enzima de restricción *Hinf I* de cepas aisladas con el medio KF.

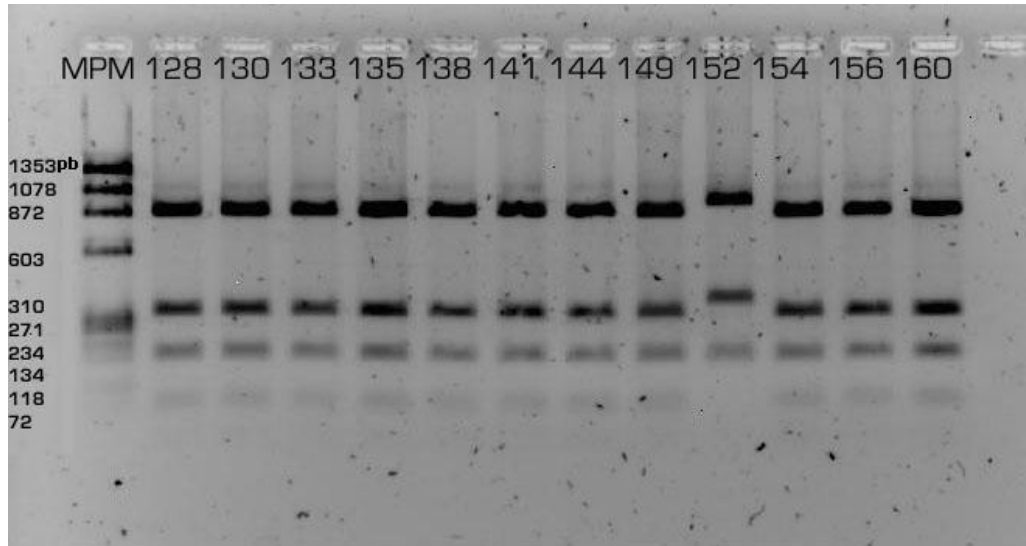


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % a 55 V. / 120 minutos de los fragmentos del gen ADNr 16S generados con la enzima de restricción *Hinf I* de cepas aisladas con el medio KF.

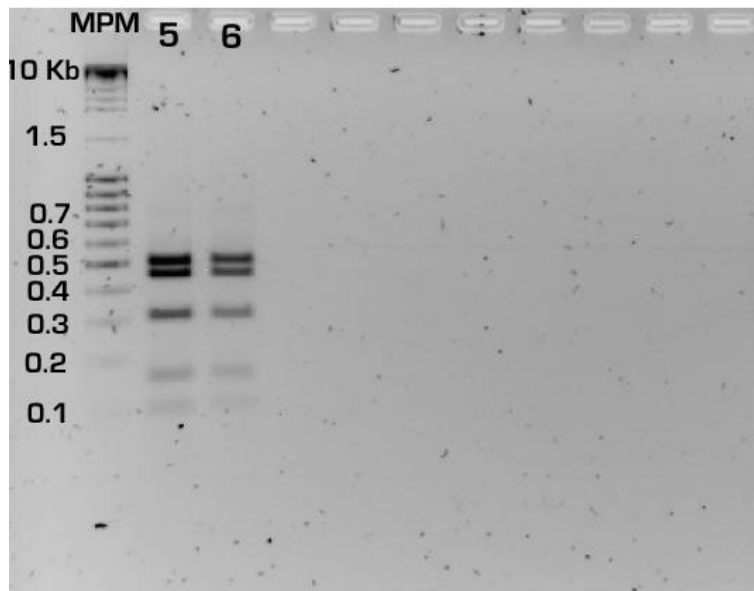


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % a 55 V. / 120 minutos de los fragmentos del gen ADNr 16S generados con la enzima de restricción *Hae III* de cepas aisladas con el medio MRS-A.

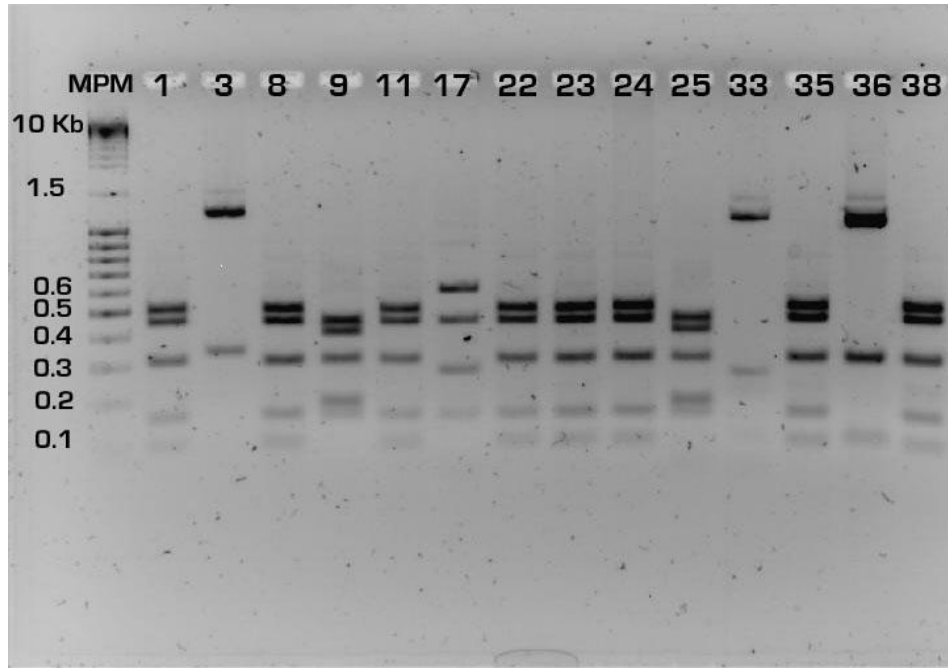


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % a 55 V. / 120 minutos de los fragmentos del gen ADNr 16S generados con la enzima de restricción *Hae III* de cepas aisladas con el medio MRS-A.

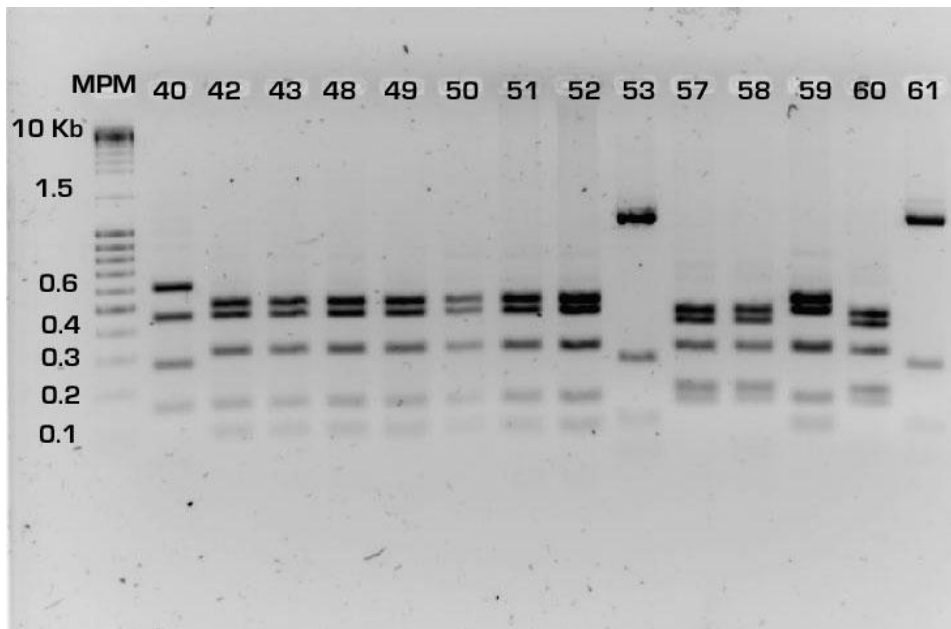


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % a 55 V. / 120 minutos de los fragmentos del gen ADNr 16S generados con la enzima de restricción *Hae III* de cepas aisladas con el medio MRS-A.

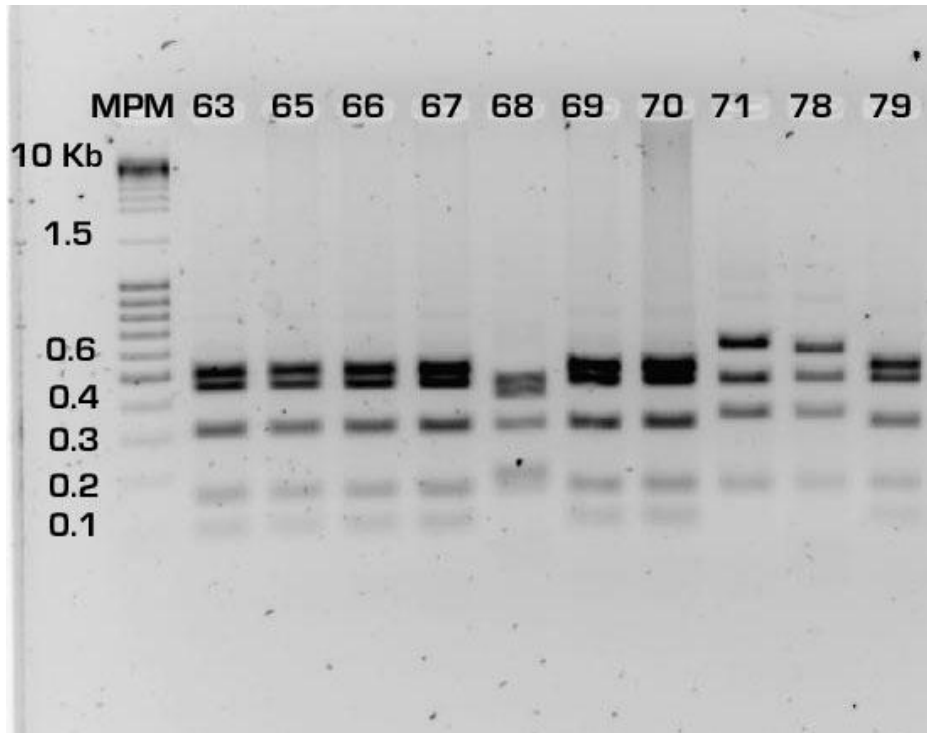


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % a 55 V. / 120 minutos de los fragmentos del gen ADNr 16S generados con la enzima de restricción *Hae III* de cepas aisladas con el medio MRS-A.

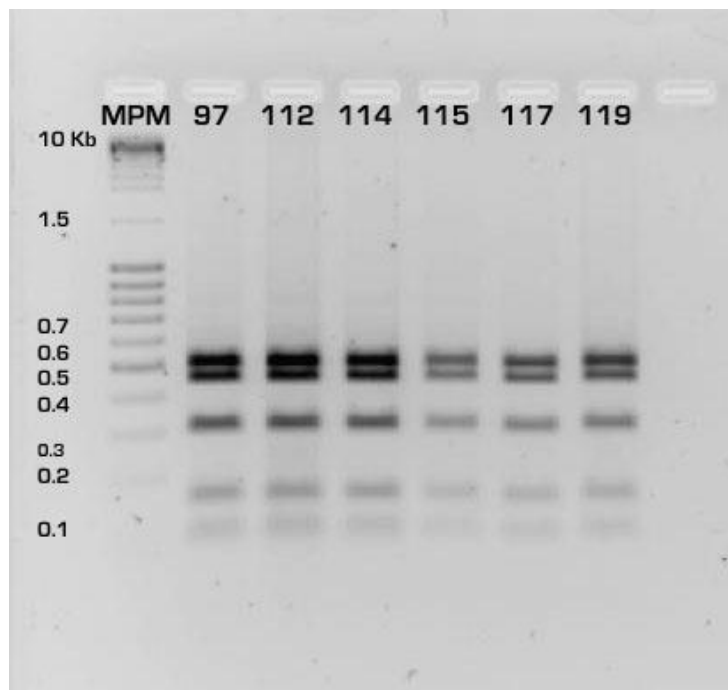


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % a 55 V. / 120 minutos de los fragmentos del gen ADNr 16S generados con la enzima de restricción *Hae III* de cepas aisladas con el medio KF.

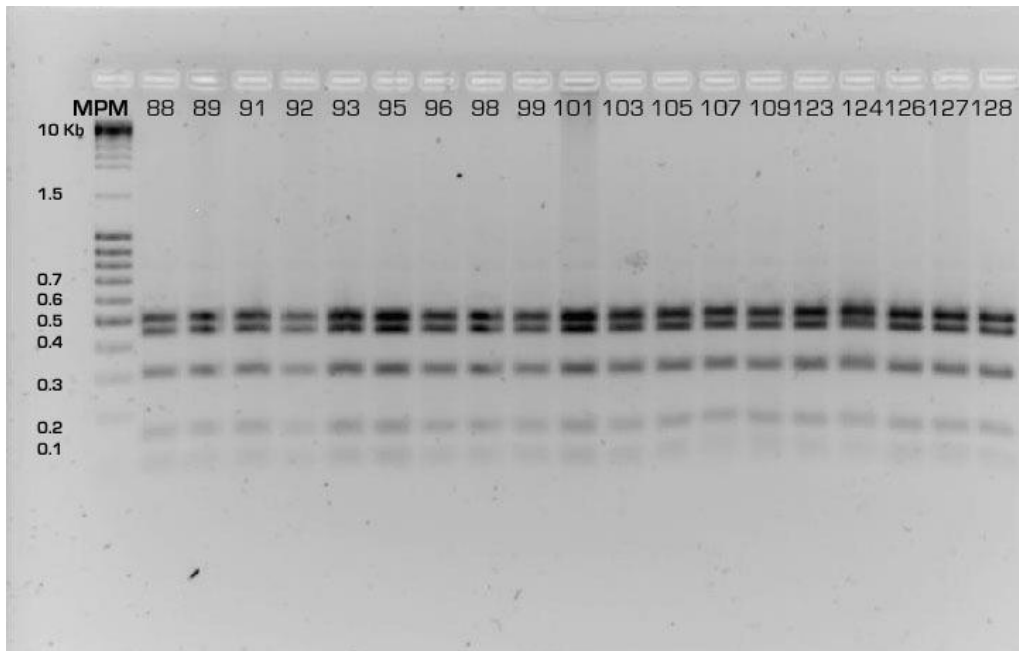


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % a 55 V. / 120 minutos de los fragmentos del gen ADNr 16S generados con la enzima de restricción *Hae III* de cepas aisladas con el medio KF.

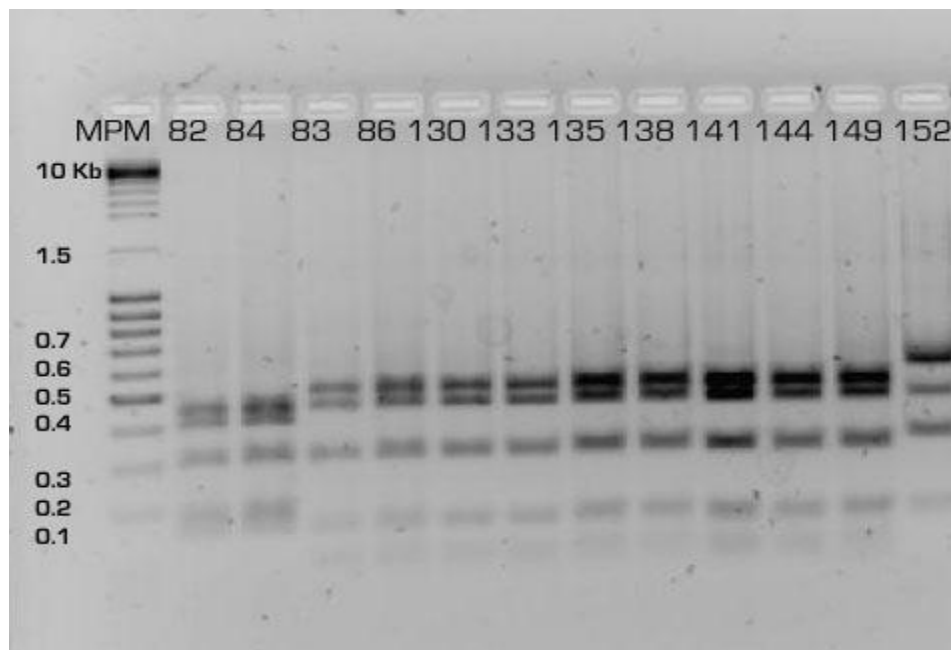


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % a 55 V. / 120 minutos de los fragmentos del gen ADNr 16S generados con la enzima de restricción *Hae III* de cepas aisladas con el medio KF.

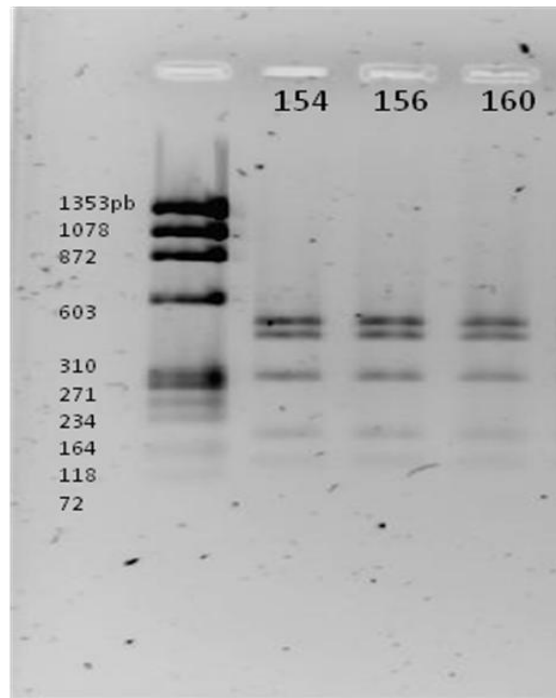


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % a 55 V. / 120 minutos de los fragmentos del gen ADNr 16S generados con la enzima de restricción *Hae III* de cepas aisladas con el medio KF.

El análisis de las 80 cepas puras previamente seleccionadas (40 MRS-A y 40 KF) mostró 13 y 20 fragmentos diferentes del gen ribosomal 16S, generados por las enzimas *Hinf I* y *Hae III* respectivamente (Figuras 12-25), lo cual nos indica que las secuencias de corte que reconoció *Hae III* fueron más frecuentes en comparación con la secuencia de corte de *Hinf I*, sin embargo, en la matriz de presencia y ausencia de fragmentos que se construyó a partir de los datos obtenidos de la digestión, se observaron ocho patrones de restricción diferentes con *Hae III* y siete con *Hinf I*, los cuales aportaron los datos suficientes para generar los dendrogramas mediante el programa "Treecon for Windows" (Van de Peer y Wachter, 1994), para el agrupamiento se utilizó el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, por sus siglas en inglés) basado en el modelo de Nei y Li (1979).

6.5. Agrupamiento e identificación de las cepas puras seleccionadas de pozol y cepas control.

Ya que se contó con un número considerable de cepas (80), se agruparon mediante el método de ARDRA, y con el fin de obtener aislados representativos para secuenciar la región hipervariable V1 e identificar los géneros diana (*Streptococcus* y *Enterococcus*), se seleccionaron al azar el 50% (40/80) de cepas aisladas de maíz nixtamalizado para preparar pozol, pertenecientes a todos los grupos y líneas generados por los dendrogramas a partir de los datos obtenidos de la restricción del gen ribosomal 16S (Figuras 26 y 27), y a la mayoría de los tiempos de fermentación (Tablas 10, 13 y 14). Con excepción de las cepas aisladas con el medio KF pertenecientes a los tiempos 24 y 48 horas, puesto que se ubicaron en los grupos de ambos dendrogramas que congregaron a la mayoría de las cepas (Grupo 1), y por lo tanto, se consideró que la elección de los aislados fue lo suficientemente amplia para monitorear el mismo.

Se identificaron cepas de seis géneros diferentes en las siguientes proporciones y porcentajes: *Streptococcus* 28/40 (70%), *Enterococcus* 2/40 (5%), *Lactococcus* 4/40 (10%), *Lactobacillus* 2/40 (5%), *Leuconostoc* 3/40 (7.5%), *Weissella* 1/40 (2.5%) (Figura 28). Así mismo, se destaca que en la mayoría de las colonias seleccionadas y aisladas de pozol, se identificaron los géneros de interés para el presente estudio (Figura 29).

Tabla 10. Número asignado a las de cepas aisladas de pozol en ambos medios selectivos utilizados.

Tiempos de fermentación (h)	Medios selectivos y número asignado	
	MRS-A	KF
0	1-10	81-90
3	11-20	91-100
6	21-30	101-110
9	31-40	111-120
12	41-50	121-130
24	51-60	131-140
48	61-70	141-150
72	71-80	151-160

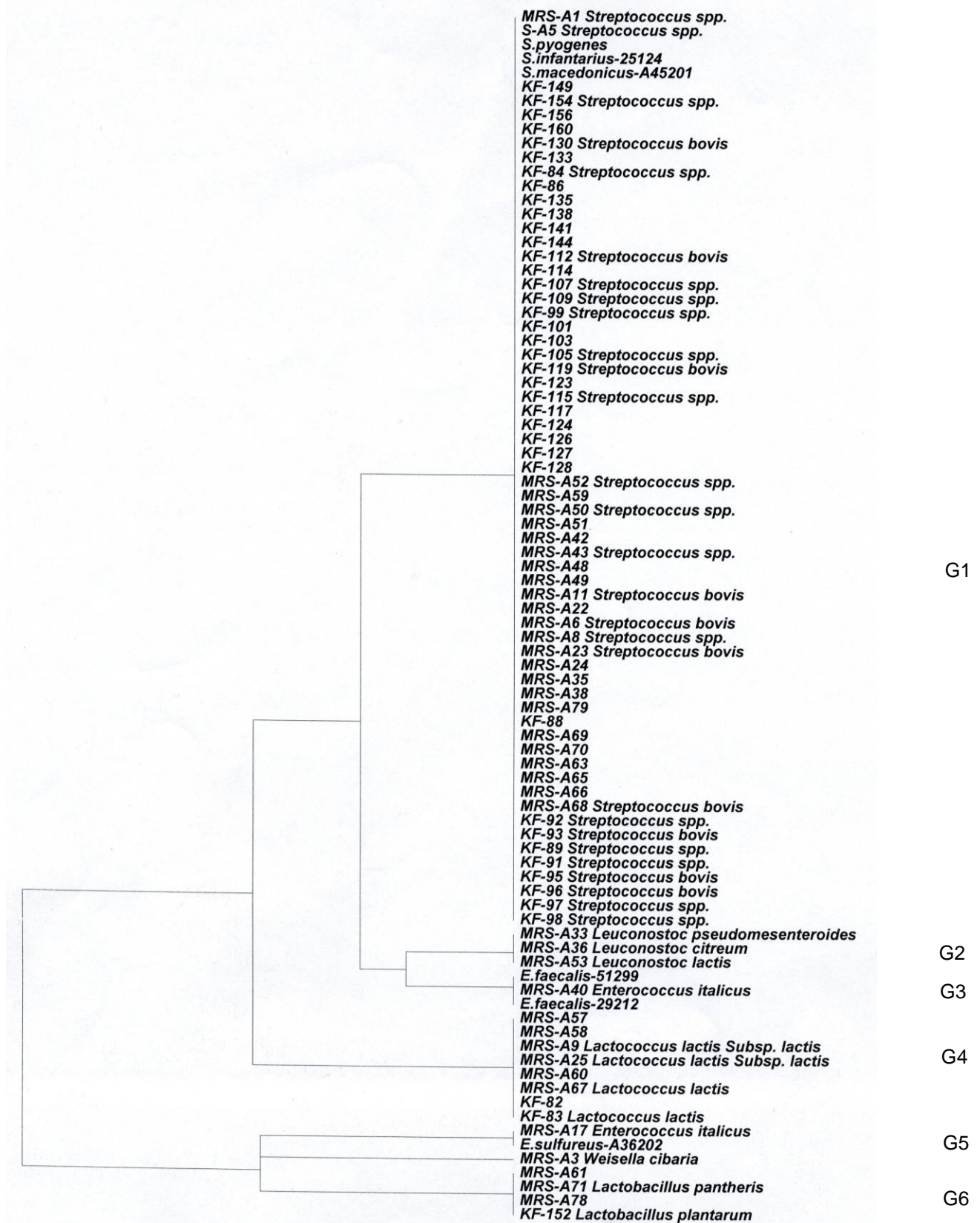


Figura 26. Dendrograma del ARDRA a 80 cepas de pozol basado en el agrupamiento por UPGMA utilizando el modelo de Nei y Li. Se empleó la enzima *Hinf I* para la restricción del gen ribosomal 16S en cepas aisladas de pozol y de referencia.

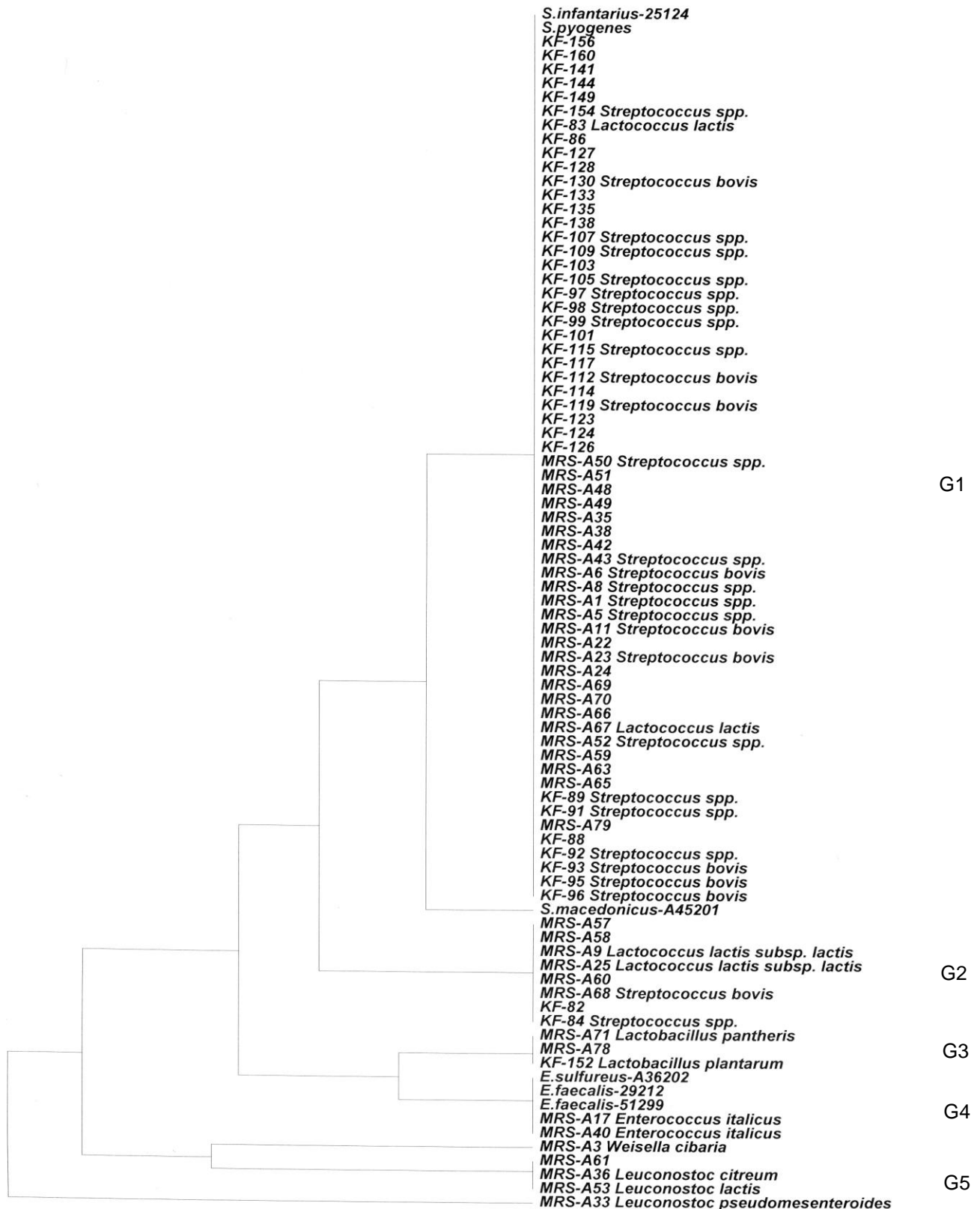


Figura 27. Dendrograma del ARDRA a 80 cepas de pozol basado en el agrupamiento por UPGMA utilizando el modelo de Nei y Li. Se empleó la enzima *Hae III* para la restricción del gen ribosomal 16S en cepas aisladas de pozol y de referencia.

El dendrograma generado a partir de los datos obtenidos con la enzima *Hinf I* (Figura 26) se observan seis grupos y una línea, en los cuales se determinó la identificación de las 40 cepas seleccionadas (Tablas 11 y 12) mediante la secuenciación de la región hipervariable V1 del gen ribosomal 16S y posteriormente se comparó con la base de datos del “GenBank” (Chakravorty *et al.*, 2007).

Se observaron en la electroforesis siete patrones de hidrólisis distintos (Figuras 10,12-17), en los cuales se asignó a cada fragmento un peso molecular en pares de bases aproximado con el fin de distinguir entre fragmentos.

En principio el grupo 1 (G1) el más numeroso con 63/80 cepas aisladas de pozol con los medios MRS-A y KF de las cuales 16 cepas se identificaron como *Streptococcus* spp., 10 como *S. bovis* e incluyó a las cepas control: *Streptococcus infantarius* 25124 (R1), *Streptococcus macedonicus* A 45201(R2), *S. pyogenes* (CL1). Se observó un patrón de restricción de cuatro bandas (1-872pb, 2-350pb, 3-271pb y 4-125pb).

El grupo 2 (G2) que mostró a 3/80 cepas aisladas de pozol con el medio MRS-A identificadas como *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *L. citreum*, y *L. lactis*. El patrón de restricción registró tres bandas (1-1000pb, 2-350pb y 3-234pb). El grupo 3 (G3) ubicó a las cepas control *Enterococcus faecalis* (CL2 y CL3) y *Enterococcus italicus*, la cual no se había reportado como especie que formara parte de la microbiota del pozol hasta el presente trabajo. El patrón de restricción mostró tres bandas (1-1078pb, 2-310pb y 3-234pb). El grupo 4 (G4) congregó a 8/80 cepas aisladas con los medios MRS-A y KF de las cuales 4 se identificaron como *Lactococcus lactis*. Se observaron cinco bandas en el patrón de restricción (1-872pb, 2-271pb, 3-234pb, 4-134pb y 5-72pb).

El grupo 5 (G5) muestra 2 cepas aislada del medio MRS-A de las 80 sujetas a estudio, de las cuales una se identificó como *Enterococcus italicus* (reportada hasta en el presente estudio), y también incluyo a la cepa control *Enterococcus sulfureus* A 36202 (R3). En las cuales se observaron tres bandas en el patrón de restricción (1-1000pb, 2-310pb y 3-250pb). El grupo 6 (G6) ubicó a 4/80 cepas sujetas a estudio aisladas con el medio MRS-A y KF, se identificaron dos de estas como *Lactobacillus plantarum* y *L. pantheris*, esta última no se había reportado como parte de la microbiota del pozol hasta el presente estudio. Se registraron tres bandas en el patrón de restricción (1-900pb, 2-400pb y 3-234pb). Por último, se observa en la línea entre los grupos 5 y 6

que pertenece a 1/80 cepas aisladas de pozol, que ubicó a *Weissella cibaria*, que se aisló con el medio MRS-A, misma que no había sido reportada como parte de la microbiota del pozol, hasta el presente trabajo. La cual registró tres bandas en el patrón de restricción (1-1078pb, 2-350pb y 3-234pb). Es importante mencionar, que de los siete patrones de hidrólisis que se obtuvo con la enzima *Hinf I*, se construyeron el mismo número de agrupamientos en el dendrograma, en el cual se observa una clara separación entre los seis géneros identificados (Figuras 26, 28). Por lo tanto, los resultados apoyan que la enzima *Hinf I* fue apropiada para generar patrones de hidrólisis que discriminaron en diferentes grupos los géneros identificados en el estudio. El dendrograma correspondiente a los datos suministrados por la enzima *Hae III* (Figura 27) consta de cinco grupos y tres líneas, así mismo, se determinó la identidad taxonómica de las 40 cepas seleccionadas (Tablas 11 y 12) mediante la secuenciación de la región hipervariable V1 del gen ribosomal 16S (Chakravorty *et al.*, 2007) y posteriormente se comparó con la base de datos del “GenBank”. Se registraron 8 patrones de hidrólisis diferentes en la electroforesis y a cada fragmento se le asignó un peso molecular en pares de bases aproximado (Figuras 11,18-25), con el propósito de diferenciar entre los fragmentos generados. El grupo 1 (G1) se reconoce como el más grande, consta de 62/80 cepas aisladas de pozol con los medios MRS-A y KF, de las cuales 17 pertenecieron a *Streptococcus* spp. 9 a *S. bovis* y 2 como *Lactococcus lactis*, además, se ubicaron las cepas control *S. infantarius* 25124 (R1) y *S. pyogenes* (CL1). El patrón de restricción mostró cinco bandas (1-550pb, 2-450pb, 3-320pb, 4-180pb y 5-120pb). En el grupo 2 (G2) se encuentran 8/80 cepas aisladas de pozol por ambos medios selectivos, se identificaron 2 de estas como *Lactococcus lactis*, una *Streptococcus* spp. y una *Streptococcus bovis*. Se observaron cinco bandas en el patrón de restricción (1-450pb, 2-400pb, 3-350pb, 4-200pb y 5-150pb). El grupo 3 (G3) lo conformaron 3/80 cepas aisladas de pozol con ambos medios selectivos, una se identificó como *Lactobacillus pantheris* (no se había reportado), y una segunda como *L. plantarum*. Se contaron cuatro bandas en el patrón de restricción (1-600pb, 2-450pb, 3-350pb y 4-200pb). El grupo 4 (G4) ubicó a tres cepas control, *Enterococcus faecalis* (CL2 y CL3), *E. sulfureus* A 36202 (R3) y 2/80 cepas aisladas de pozol con el medio MRS-A, como *Enterococcus italicus* (se reportaron hasta el presente estudio en la microbiota del pozol). Se observaron cuatro bandas en el patrón de

restricción (1-600pb, 2-450pb, 3-300pb y 4-180pb). El grupo 5 (G5) congregó 3/80 cepas aisladas de pozol con el medio MRS-A, y se identificaron a dos como *Leuconostoc citreum* y *L. lactis*. Se registraron tres bandas en el patrón de restricción (1-1100pb, 2-350pb y 3-100pb).

La línea entre el grupo 1 y 2 se ubica la cepa *S. macedonicus* A-45201 (R2), y mostró un patrón de restricción con cinco bandas (1-550pb, 2-450pb, 3-271pb, 4-134pb y 5-118pb). La línea entre los grupos 4 y 5 se identificó a la cepa aislada con el medio MRS-A como *Weissella cibaria* (se reportó hasta el presente estudio) y se contaron dos bandas (1-1200pb y 2-350pb). En la última línea se observa la cepa identificada como *Leuconostoc pseudomesenteroides* aislada con el medio MRS-A. Se registraron dos bandas en el patrón de restricción (1-1200pb y 2-300pb). Es importante mencionar, que los ocho patrones de hidrólisis que se observaron con la enzima *Hae III*, construyeron la misma cantidad de agrupamientos en el dendrograma. Así mismo, se congregaron en los grupos 1 y 2 aislados que no corresponden al mismo género (*Streptococcus* y *Lactococcus*), es decir se obtuvo el mismo patrón de hidrólisis para ambos géneros (Figuras 18-25), lo cual sugiere que la enzima utilizada no fue lo suficientemente útil para separar ambos géneros en diferentes grupos, sin embargo en los grupos y líneas restantes se logró separar aislados de los restantes 4 géneros diferentes hallados en el estudio.

Por lo tanto, entre ambos dendrogramas se registraron diferentes patrones de hidrólisis, en general su topología fue similar, puesto que, los dendrogramas generados a partir de los datos suministrados por la enzima *Hinf I* y *Hae III* se construyeron 7 y 8 agrupamientos respectivamente. Se destaca, el grupo 1 el cual congregó el mayor número de cepas del género *Streptococcus* aisladas de pozol y donde se ubicaron la mayoría de las cepas control (Figuras 27 y 28). Sin embargo, en el dendrograma generado por los datos de la restricción con *Hae III* se detectó que en los grupos 1 y 2 se agruparon cepas de estreptococos y lactococos, lo cual fue inesperado, dado que debieron ubicarse en diferentes grupos, este resultado se puede explicar una vez que los géneros *Streptococcus* y *Lactococcus* se encuentran filogenéticamente muy cercanos, según estudios de genealogía basados en la secuencia del gen ribosomal 16S (Hardie *et al.*, 1997; Hummel *et al.*, 2008). Esto implica que las secuencias del gen ADNr 16S entre *Streptococcus* y *Lactococcus* son muy similares, y por consiguiente, la

enzima *Hae III* no mostró la capacidad de encontrar sitios de corte distintos en cepas de ambos géneros que permitieran generar patrones de hidrólisis diferentes, y por consecuencia, ubicarlos en distintos grupos. Basado en los resultados de los dendogramas, la identificación de las cepas, y lo discutido anteriormente, se consideró pertinente el uso de la enzima *Hinf I* para los objetivos del presente estudio e inadecuado el uso de *Hae III*. No obstante, la enzima *Hae III* logró discriminar entre los géneros sujetos a estudio (*Streptococcus* y *Enterococcus*), *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Weisella* (Figura 27).

En términos netos, la secuenciación de la región V1 del gen ribosomal 16S ampliamente utilizada para identificar cepas de origen bacteriano y diversos estudios taxonomicos (Ogier y Serror, 2008; Chakravorty *et al.*, 2007), y su comparación con secuencias reportadas en el “GenBank”, se obtuvo la identificación de las 40 cepas seleccionadas y aisladas de masa nixtamalizada para preparar pozol (Figuras 26 y 27), con porcentajes de identidad del 99 al 100% en la mayoría de las cepas y en menor medida con 98% de identidad y solo una cepa con el 97% de la misma, con una cobertura de la secuencias al momento de la comparación del 99% en todas las cepas (Tablas 11 y 12).

La secuenciación de la región V1 del gen ribosomal 16S que tiene un tamaño de 30 nucleótidos (69–99), aportó los datos suficientes para identificar especies de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*, en concordancia con estudios anteriores en los cuales determinaron que tal región puede ser útil para identificar especies de dichos géneros (Chakravorty *et al.*, 2007), y además permitió la identificación de otros géneros y especies ya mencionados, por lo que resultó adecuada para los fines del presente estudio.

Es importante mencionar, que no es posible diferenciar entre todas las especies bacterianas utilizando solo una región hipervariable de las nueve (V1-V9) que constituyen el gen ADNr 16S, debido a que exhiben diferentes grados de diversidad en su secuencia, y la secuenciación de la totalidad del gen facilitaría la identificación de los microorganismos, sin embargo, los costos se elevan considerablemente y los resultados tardan en generarse, y los objetivos de las investigaciones pueden ser afectados (Clarridge, 2004; Chakravorty *et al.*, 2007). Es por ello, que en un inicio se sugiere el monitoreo de las regiones hipervariables del gen para la identificación

bacteriana, una vez que existen estudios comparativos entre las regiones y sus ventajas para identificar procariontes, los cuales determinaron que cada segmento hipervariable posee una considerable diversidad en sus secuencias que le confiere gran utilidad para la identificación de un amplio número de especies bacterianas (Van de Peer *et al.*, 1996; Selim *et al.*, 2005; Chakravorty *et al.*, 2007). También, se ha demostrado que la diversidad en la secuencia de las regiones hipervariables es lo más importante para discriminar entre bacterias y no así su tamaño (Becker *et al.*, 2004; Selim *et al.*, 2005; Chakravorty *et al.*, 2007). Un claro ejemplo de lo anterior, es la gran importancia que ha mostrado la PCR en tiempo real, en diagnósticos de tipo médico y estudios de carácter científico que se enfocan en amplificar secuencias cortas de las regiones hipervariables del gen ADNr 16S, para identificar la especie bacteriana y la cantidad de microorganismos en las muestras (Chakravorty *et al.*, 2007).

Por otra parte, el análisis de las secuencias de genes conservados (“Housekeeping”) tales como el gen ribosomal 16S, se ha registrado un incremento en su uso para identificar especies bacterianas de origen clínico e investigaciones científicas, debido a la amplia información que se tiene de las secuencias del gen en las bases de datos (Clarridge, 2004; Petti *et al.*, 2005; Chakravorty *et al.*, 2007).

Es importante destacar, que se identificaron dos cepas de *Enterococcus italicus*, una de *Weissella cibaria* y *Lactobacillus pantheris* respectivamente (Figuras 27 y 28) (Tabla 11) como especies nunca antes reportadas en la microbiota del pozol, esto implica que deben ser insertadas en el contexto de la comunidad microbiana para ampliar el conocimiento en cuanto a diversidad y comportamiento de la misma en estudios posteriores, una vez que los fenómenos ecológicos se pueden comprender mejor a partir de integrar la mayor cantidad de especies que conforman las comunidades (Nocker *et al.*, 2007). Así mismo, se recomienda corroborar la identidad taxonómica de las cepas, para establecer con mayor exactitud su identificación, una vez que se trata de especies halladas hasta el presente estudio en la fermentación de maíz nixtamalizado para preparar pozol. Por tales motivos, se propone la secuenciación de la totalidad del gen ADNr 16S, una vez que se conoce ampliamente los alcances del gen en la taxonomía bacteriana (Ogier y Serror, 2008). En el caso, que la secuenciación del gen ribosomal 16S no facilite la discriminación entre especies del mismo género debido a altos grados de homología que se pudieran presentar, existen métodos alternativos

que se han utilizado exitosamente como: la amplificación y secuenciación de los genes *sod A*, *ddl*, *van*, *ace*, *cpn60*, *atp A* y la secuencia reguladora transcripcional EF0027 (Ogier y Serror, 2008; Jackson *et al.*, 2004).

Por otra parte, los estreptococos y enterococos son un grupo diverso e importante de bacterias complejas en términos de su interacción con humanos, puesto que conforman la microbiota dominante de varios productos alimenticios, tales como leche, quesos, carnes, vegetales, y además habitan el tracto intestinal y buco-faríngeo de humanos y animales (Hummel *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2009). También juegan un papel relevante en el desarrollo de características organolépticas del producto final, debido a su actividad esterasa, proteolítica y producción de grupos diacetilos mediante el metabolismo del citrato (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Se reconocen como productores de bacteriocinas que combaten la colonización de patógenos en alimentos como *Bacillus cereus*, *Clostridium* spp, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, y uso en cultivos iniciadores o co-cultivos durante la fermentación de alimentos, tiene una especial aplicación como un método de preservación para controlar bacterias patógenas emergentes (Franz *et al.*, 2007). No obstante, los estreptococos y enterococos se encuentran asociados con una gran variedad de síndromes clínicos como bacteremias, endocarditis, e infecciones diversas. En la última década, diferentes estudios han descrito la presencia de diversos factores de virulencia como citólisin, gelatinasas, serin-proteasas, hialurodin, sustancias de agregación, proteínas de superficie extracelular, adhesinas, entre otros (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2009). Los reportes indican una mayor incidencia en los factores de virulencia en cepas de origen clínico, sin embargo, se han detectado en aislados de diferentes productos alimenticios (Ben Omar *et al.*, 2004; Lepage *et al.*, 2006). Además, se ha descrito resistencia intrínseca y adquirida a un gran número de antibióticos de cepas clínicas y de alimentos, que junto con los factores de virulencia representan un riesgo potencial como efectivos patógenos oportunistas en infecciones nosocomiales y consumidores de productos fermentados (Kayser, 2003; Hummel *et al.*, 2007). El hecho es que los estreptococos y enterococos utilizados en la industria de los alimentos o involucrados en la fermentación de productos tradicionales y/o artesanales pueden actuar como reservorio de factores de virulencia y resistencia a los antibióticos dentro de la cadena alimenticia (Hummel *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2009).

Tabla 11. Identificación de las cepas seleccionadas y aisladas del medio MRS-A.

# De cepa	Genero y especie	Porcentaje de identidad
1	<i>Streptococcus</i> spp.	99%
3*	<i>Weisella cibaria</i> *	98%
5	<i>Streptococcus</i> spp.	99%
6	<i>Streptococcus bovis</i>	99%
8	<i>Streptococcus</i> spp.	99%
9	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	98%
11	<i>Streptococcus bovis</i>	99%
17*	<i>Enterococcus italicus</i> *	99%
23	<i>Streptococcus bovis</i> .	99%
25	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99%
33	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	100%
36	<i>Leuconostoc citreum</i>	98%
40*	<i>Enterococcus italicus</i> *	99%
43	<i>Streptococcus</i> spp.	98%
50	<i>Streptococcus</i> spp.	99%
52	<i>Streptococcus</i> spp.	99%
53	<i>Leuconostoc lactis</i>	100%
67	<i>Lactococcus lactis</i>	99%
68	<i>Streptococcus bovis</i> .	99%
71*	<i>Lactobacillus pantheris</i> *	99%

*= Cepas que no se habían reportado antes en la microbiota del pozol.

Tabla 12. Identificación de las cepas seleccionadas y aisladas del medio KF.

# De cepa	Genero y especie	Porcentaje de identidad
83	<i>Lactococcus lactis</i>	99%
84	<i>Streptococcus</i> spp.	98%
89	<i>Streptococcus</i> spp.	100%
91	<i>Streptococcus</i> spp.	99%
92	<i>Streptococcus</i> spp.	100%
93	<i>Streptococcus bovis</i>	99%
95	<i>Streptococcus bovis</i>	100%
96	<i>Streptococcus bovis</i>	99%
97	<i>Streptococcus</i> spp.	100%
98	<i>Streptococcus</i> spp.	100%
99	<i>Streptococcus</i> spp.	99%
105	<i>Streptococcus</i> spp.	98%
107	<i>Streptococcus</i> spp.	100%
109	<i>Streptococcus</i> spp.	99%
112	<i>Streptococcus bovis</i>	99%
115	<i>Streptococcus</i> spp.	97%
119	<i>Streptococcus bovis</i>	99%
130	<i>Streptococcus bovis</i>	98%
152	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98%
154	<i>Streptococcus</i> spp.	100%

Por otra parte, las cepas identificadas del género *Streptococcus* fueron las mayoritarias con un 70% (Figura 28) y se aislaron desde la hora cero hasta la 72 en ambos medios selectivos utilizados (Tablas 10, 11 y 12), los resultados sugieren que los estreptococos probablemente se encuentran presentes y con relativa abundancia en la comunidad durante todo el tiempo de fermentación, en comparación con los demás géneros identificados (Figura 28) (Tablas 11 y 12). En contraste, las dos cepas del género *Enterococcus* que representan el 5% de los aislados (Figura 29), solo se encontraron

en las horas 3 y 9 de la fermentación y en el medio MRS-A (Tablas 10 y 11), por lo tanto, los datos sugieren que probablemente son bacterias relativamente minoritarias y no tan prevalentes en la comunidad. De tal manera, que se logro el aislamiento e identificación de los géneros blanco los cuales conforman el 75% de los aislados y cuatro géneros más (Figuras 28 y 29). En cuanto a los medios selectivos utilizados (MRS-A y KF) se observa que permitieron el crecimiento de los estreptococos, enterococos y de otros microorganismos, cepas no reportadas en la microbiota del pozol, de tal manera que los medios utilizados restringieron el crecimiento de la mayoría de las cepas reportadas en pozol, sin embargo, en particular con el medio KF no se aislaron enterococos como se esperaba (Tablas 10 y 12), los resultados sugieren que probablemente exista una escasa cantidad de los mismos en la comunidad bacteriana del pozol ó no resultó ser tan selectivo para las especies del género presentes en pozol, puesto que es utilizado principalmente para aislar *Enterococcus faecalis*, por lo tanto, el medio MRS-A resulto el más útil para el estudio, puesto que se aislaron cepas de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*.

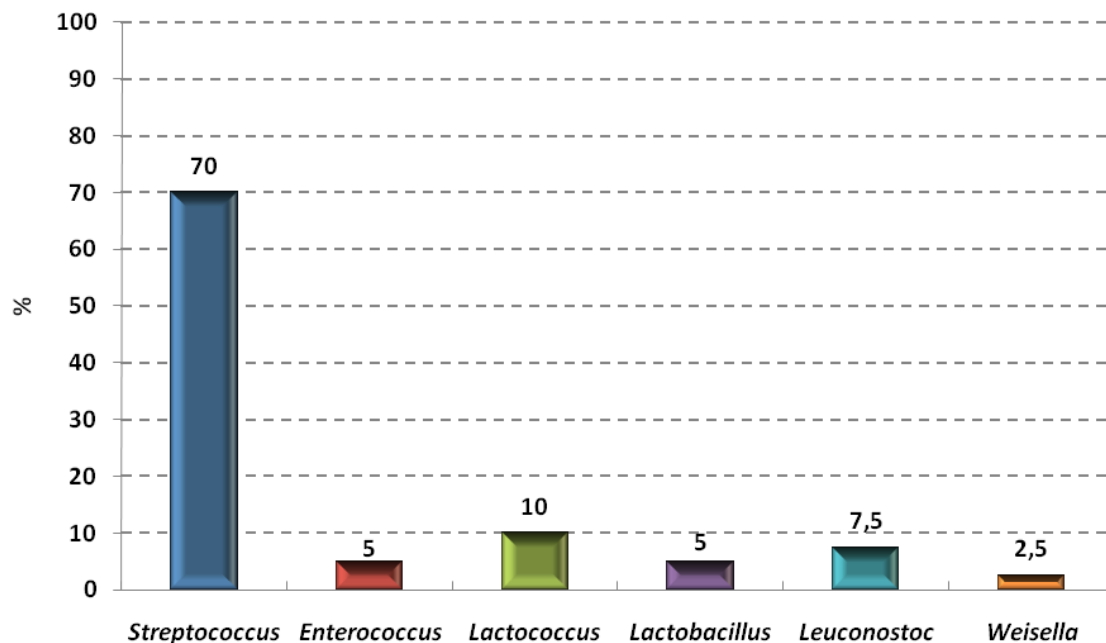


Figura 28. Porcentaje de cepas identificadas de cada uno de los seis géneros hallados en el estudio.

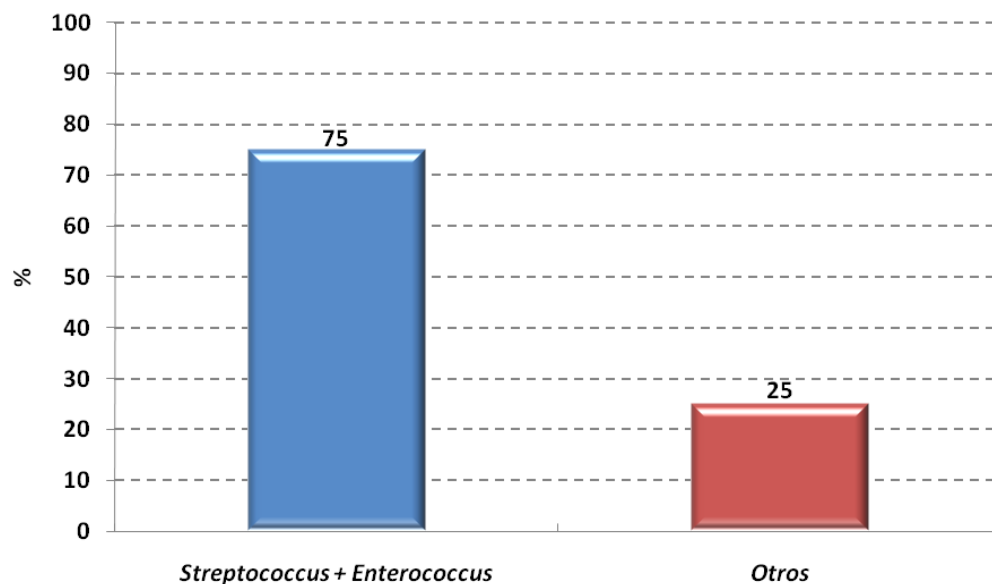


Figura 29. Porcentaje de cepas objetivo identificadas en el estudio (*Streptococcus* y *Enterococcus*) en comparación con otros géneros.

6.6. Prueba de resistencia a los antibióticos y de hemólisis a las cepas aisladas de pozol pertenecientes a los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*.

Los resultados del antibiograma muestran a las 30 cepas aisladas de pozol pertenecientes a los géneros diana *Streptococcus* 28/30 y *Enterococcus* 2/30, así como de cepas control de origen clínico (CL1, CL2, CL3), con el carácter de resistentes, resistencia intermedia y sensibles a 10 antibióticos utilizados y recomendados comúnmente en análisis de resistencia bacteriana por laboratorios diagnósticos internacionales (Tabla 13). También, se calculó el porcentaje de cepas que mostraron resistencia (incluye resistencia intermedia) y sensibilidad a cada uno de los diez antibióticos que pertenecen a cinco grupos de antimicrobianos distintos (Tabla 14).

El protocolo que se utilizó para realizar la prueba de sensidiscos (método de Kirby-Bauer), e interpretación de los halos de inhibición al crecimiento bacteriano lo recomienda el Sub Comité de Ensayos de Susceptibilidad de la “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS) en el Volumen 22; número 1, 2002, el cual es aceptado por la Organización Mundial de la Salud.

Tabla 13. Resultados de la prueba de sensidiscos aplicada a las cepas del género *Streptococcus* y *Enterococcus* aisladas de pozol y de origen clínico.

# De cepa	Antibióticos									
	C	CX	E	GM	K	N	NET	P	TE	VA
1	S	R	S	R	R	R	I	S	S	S
5	S	S	S	R	R	R	I	S	S	S
6	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S
8	S	R	S	R	R	R	I	S	S	S
11	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S
17*	S	R	S	R	I	R	I	S	S	S
23	S	S	S	R	R	R	I	S	S	S
40*	S	R	S	S	I	R	R	S	S	S
43	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S
50	S	S	S	R	R	R	I	S	S	S
52	S	S	S	R	R	R	I	S	S	S
68	S	R	S	R	R	R	I	S	S	S
84	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S
89	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S
91	S	R	S	R	R	R	I	S	S	S
92	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S
93	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S
95	S	R	S	R	R	R	I	S	S	S
96	S	R	S	R	R	R	I	S	S	S
97	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S
98	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S
99	S	R	S	I	R	R	S	S	S	S
105	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S

Continuación tabla 13.

# De cepa	Antibióticos									
	C	CX	E	GM	K	N	NET	P	TE	VA
107	S	S	S	I	R	R	R	S	S	S
109	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S
112	S	R	R	I	R	R	S	S	S	S
115	S	R	I	R	R	R	S	S	S	S
119	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S
130	S	R	I	R	R	R	I	S	S	S
154	S	R	S	R	R	R	I	S	S	S
CL1	S	S	S	I	R	R	S	S	R	S
CL2	S	R	S	R	R	R	R	S	S	I
CL3	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R

*=Enterococos, S=Sensible, I=Intermedia, R=Resistente, C=Cloranfenicol, CX=Cloxacilina, E=Eritromicina, GM=Gentamicina, K=Kanamicina, N=Neomicina, NET=Netilmicina, P=Penicilina, TE=Tetraciclina, VA=Vancomicina, CL1=*Streptococcus pyogenes*, CL2=*Enterococcus faecalis* 24212, CL3=*Enterococcus faecalis* 51299.

Tabla 14. Porcentaje de resistencia a los antibióticos de cepas de *Streptococcus* y *Enterococcus* aislados de pozol.

	Macrólidos (%)	Aminoglucósidos (%)			
	<i>Eritromicina</i>	<i>Gentamicina</i>	<i>Kanamicina</i>	<i>Neomicina</i>	<i>Netilmicina</i>
<i>Streptococcus</i>	11 (3/28)	100 (28/28)	100 (28/28)	100 (28/28)	64 (18/28)
<i>Enterococcus</i>	0 (0/2)	50 (1/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)
Cepas control	34	100	100	100	66

Continuación tabla 14.

	Anfenícolos (%)	Beta láctámico (%)		Tetraciclinas (%)	Glucopéptido (%)
	<i>Cloranfenicol</i>	<i>Cloxacilina</i>	<i>Penicilina</i>	<i>Tetraciclina</i>	<i>Vancomicina</i>
<i>Streptococcus</i>	0 (0/28)	82 (23/28)	0 (0/28)	0 (0/28)	0 (0/28)
<i>Enterococcus</i>	0 (0/2)	100 (2/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)
Cepas control	34	66	0	34	67

En cuanto a la prueba de hemólisis, se detectó con probable actividad alfa-hemolítica (hemólisis parcial) a la cepa número 11 aislada de pozol que se identificó como *Streptococcus bovis*, en las restantes no se registró actividad hemolítica (Tabla 11 y Figura 30).

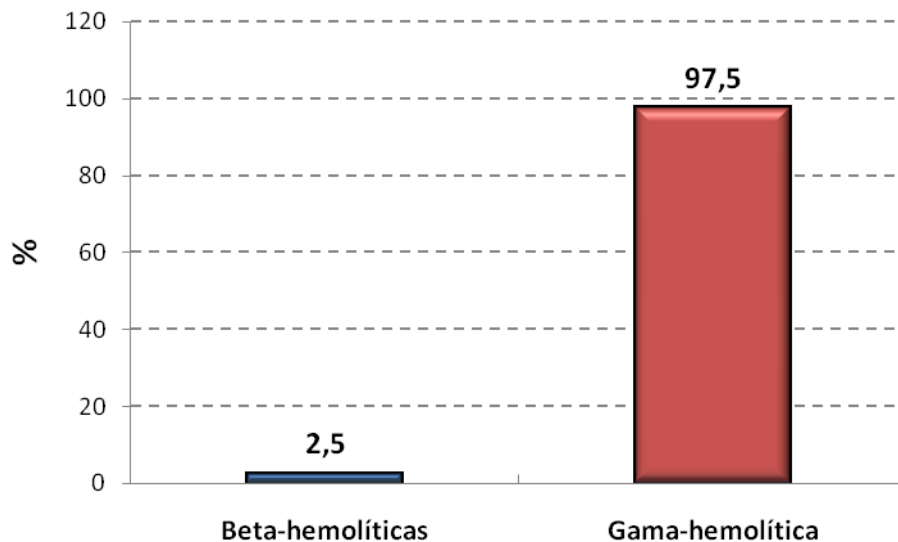


Figura 30. Porcentaje de cepas de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* aisladas de pozol sometidas a la prueba de hemólisis en agar MRS-sangre.

En relación a los porcentajes de cepas aisladas de pozol de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* resistentes a los diez antimicrobianos, se obtuvo para el macrólido eritromicina un 11% (3/28) correspondiente a estreptococos (cepas 112, 115 y 130) y 0% para enterococos (Tabla 13 y 14), tal antimicrobiano se caracteriza por interrumpir

la síntesis de proteínas al unirse a una porción de ARN de la subunidad 23S del ribosoma y genera el desprendimiento del peptidil-ARNt (Klare *et al.*, 2003; Rosen, 2011). Los mecanismos de resistencia bacteriano asociado a la eritromicina y diferentes macrólidos implican la metilación de residuos de adenina de la subunidad 23S ribosomal lo cual no permite la unión del antimicrobiano al sitio blanco, reducción en la permeabilidad de la membrana para limitar la entrada del fármaco, activación de bombas de eflujo y la acción de enzimas que inactivan al antibiótico (Klare *et al.*, 2003; Rosen, 2011; Talon y Leroy, 2011). Existen diversos reportes en los cuales se determinó que los genes *erm* (A, B, C) son los responsables de la resistencia a la eritromicina en *Streptococcus*, *Enterococcus* y otras ácido lácticas aisladas de alimentos, así mismo, se conoce su capacidad de dispersarse de manera diferencial en las poblaciones bacterianas, *erm* (B) generalmente se encuentra asociado al transposon conjugativo Tn916 y la familia Tn1545 los cuales se caracterizan por su notable capacidad de transferencia, *erm* (A y C) se han localizado tanto en el cromosoma como en plásmidos. (Klare *et al.*, 2003; Clementi y Aquilanti, 2011; Talon y Leroy, 2011). Es importante mencionar, que en este grupo de antibióticos se encuentra estructuralmente relacionado con promotores de crecimientos (espiramicina, tilosina, estreptograminas A/B y virginiamicina S/M) anteriormente utilizados en animales de granja (Klare *et al.*, 2003).

En relación a los aminoglucósidos incluidos en el presente estudio, se registró para las cepas del género *Streptococcus* el 100% de resistencia (28/28) para los antibióticos gentamicina, kanamicina, neomicina y para netilmicina el 64% (18/28), además, en los aislados de *Enterococcus* se calculo el 100% (2/2) de resistencia para kanamicina, neomicina, netilmicina y el 50% para gentamicina (1/2), en términos globales representa el mayor porcentaje de cepas resistentes de ambos géneros en comparación con los restantes cinco grupos de antimicrobianos (Tablas 13 y 14). Diferentes reportes indican que el mecanismo de acción de los aminoglucósidos es unirse en la subunidad 30S del ARNr, lo cual induce modificaciones en el sitio de unión del ARNt y por consecuencia inhibe la síntesis proteica (Klare *et al.*, 2003; Rosen, 2011). Los mecanismos de resistencia a dichos antimicrobianos, involucran principalmente la inactivación de los fármacos modificando su estructura mediante fosfotransferasas (APH), acetiltransferasas (APH), y nucleotidiltransferasas (ANT), seguidos de la disminución en

la permeabilidad de la membrana y alteraciones en la subunidad 16S del ribosoma (Klare *et al.*, 2003; Rosen, 2011). Se han descrito diferentes genes que codifican para la resistencia a los aminoglucósidos en estreptococos y enterococos aislados de alimentos, los cuales la mayoría se ubican en plásmidos, tales como: *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*, *ant(6)-Ia*, *ant(3'')-Ia*, *ant(9)-Ib* y el gen que codifica para la enzima bifuncional *aac(6')-Ie/aph(2'')-Ia*, y la secuencia cromosomal *ant(4')-Ia* (Shepard y Gilmore., 2002; Klare *et al.*, 2003; Clementi y Aquilanti., 2011). Por lo tanto, se observaron a 10 cepas de estreptococos que tuvieron sensibilidad a netilmicina y resistencia a los tres antimicrobianos restantes (Tablas 13 y 14), lo cual probablemente se debe, al tipo de genes que contengan los aislados, tales como, *aph(2'')-Ib*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*, que le confieren resistencia a varios aminoglucósidos pero no a netilmicina, es decir, las enzimas que generan dichos genes no tienen la capacidad de modificar e inactivar a la netilmicina (Shepard y Gilmore, 2002; Klare *et al.*, 2003; Clementi y Aquilanti, 2011). Otro caso, es la cepa 40 identificada como *Enterococcus italicus* que mostró sensibilidad a la gentamicina y resistencia al resto de los aminoglucósidos (Tablas 12 y 14), el resultado se puede explicar de manera similar al caso anterior, ya que posiblemente contengan los genes *aph(3')-IIIa*, *aac(6')*, *ant(4')-Ia*, *ant(6)-Ia*, *ant(3'')-Ia*, *ant(9)-Ib* que codifican para enzimas que no puedan inactivar a la gentamicina, sin embargo, le confiere resistencia a otros antibióticos del grupo (Shepard y Gilmore, 2002; Klare *et al.*, 2003; Clementi y Aquilanti, 2011). Por último, es importante mencionar que se ha determinado que la resistencia a los aminoglucósidos es el resultado del balance entre la captación intracelular del fármaco y su inactivación enzimática (Rosen, 2011).

En relación a los anfenicoles, se incluyó el cloranfenicol y las cifras mostraron una resistencia del 0% tanto para los aislados de estreptococos (0/28) y enterococos (0/2). Según reportes, se han encontrado cepas resistentes de estreptococos y enterococos al cloranfenicol en bajos porcentajes en diversos alimentos de origen animal (Clementi y Aquilanti., 2011), sin embargo, en aislados clínicos de *S. pneumoniae*, *E. faecium*, *E. Faecalis* se han registrado porcentajes de resistencia elevados, alrededor del 80 y 90% (Klare *et al.*, 2003; Clementi y Aquilanti, 2011). La acción del fármaco se dirige a unirse en distintas bases nitrogenadas del dominio V del ARNr 23S, por consecuencia se inhibe la acción de la peptidil-transferasa y la síntesis de proteínas

se interrumpe (Talon y Leroy, 2011; Rosen, 2011). Los mecanismos de resistencia al cloranfenicol incluyen, la hidrólisis intracelular del fármaco por la enzima acetiltransferasa y/o mecanismos de eflujo que sacan al fármaco del interior de la célula. La resistencia al cloranfenicol se encuentra mediada por un grupo de genes de la familia *cat* codificados en plásmidos (Klare *et al.*, 2003; Clementi y Aquilanti, 2011; Rosen, 2011). Por lo tanto, la célula bacteriana resistente puede ser capaz de evitar que el antibiótico alcance una concentración adecuada para actuar en el sitio diana y/o promoviendo la salida del fármaco.

Con referencia a los betalactámicos que se utilizaron en la prueba, se calculó la resistencia a la cloxacilina para las cepas del género *Streptococcus* en 82% (23/28) y para el caso de la penicilina 0% (0/28), los aislados de los enterococos mostraron 100% (2/2) para la cloxacilina y 0% (0/2) para la penicilina, de tal modo, que solo se obtuvo resistencia para un fármaco en porcentajes elevados y nula resistencia para el último. El mecanismo de acción de betalactámicos se encarga en inhibir la síntesis de la pared celular de las bacterias, inactivan particularmente transpeptidasas (denominadas en inglés PBPs “penicillin-binding proteins”) que se ubican en la membrana citoplasmática, con su sitio activo hacia el espacio periplasmático y son de gran importancia en la formación de la pared celular (Rosen, 2011; Klare *et al.*, 2003). Las estrategias que se conocen para proveer a las bacterias de resistencia a betalactámicos involucran, alteración del sitio blanco (PBPs) lo cual disminuye la afinidad por la penicilina, reducción en la permeabilidad de la membrana que limita el paso del fármaco al interior de la célula y la inactivación del mismo mediante β -lactamasas (Rosen, 2011; Klare *et al.*, 2003). Los genes *pbp5* están involucrados en la resistencia y se ubican principalmente en plásmidos, en sus dos fenotipos variables, el primero de baja producción de péptidos modificados PBP5 y el segundo con una sobreproducción de las proteínas modificadas, y el gen *blaz* reportado tanto en transposones conjugativos Tn552 /Tn5385 como plásmidos (Klare *et al.*, 2003; Talon y Leroy, 2011). De tal modo, que las cepas que mostraron resistencia a cloxacilina, y que contrasta con la sensibilidad a penicilina, probablemente se debe a un tipo de proteína PBP5 que se conoce con baja afinidad a la penicilina, no obstante se ha registrado una mayor afinidad a otros betalactámicos (Klare *et al.*, 2003) y además a la ausencia del gen *blaz*

que codifica para β -lactamasas las cuales hidrolizarían a cualquier penicilina (Klare *et al.*, 2003; Shepard y Gilmore, 2002).

Para el caso de la tetraciclina, ningún aislado de ambos géneros mostró resistencia (Tablas 13 y 14), el mecanismo de acción del antimicrobiano, involucra la inhibición de la síntesis de proteínas al unirse a una región específica de la subunidad 30S ribosomal, de tal modo que impiden la incorporación del aminoacil-ARNt o promueven su expulsión tras haberse fijado. Las estrategias de resistencia bacteriana consisten en alterar el sitio de unión y reducir la afinidad del fármaco, así mismo, se reportan bombas de eflujo que disminuyen la concentración intracelular del antibiótico. Los genes codificantes para tal resistencia encuentran en el cromosoma bacteriano en plásmidos conjugativos y en elementos genéticamente transponibles de tipo Tn916 (Klare *et al.*, 2003; Clementi y Aquilanti, 2011) y existen reportes que cepas de *Enterococcus* y *Streptococcus* aisladas de diferentes productos alimenticios, poseen diferentes genes de la familia *tet* que le confieren a las bacterias resistencia a la tetraciclina.

En relación a la vancomicina que pertenece al grupo de los glucopéptidos, no se encontró resistencia de ninguna cepa sujeta a estudio de ambos géneros (Tablas 13 y 14). El mecanismo de acción del fármaco implica la propiedad de unirse con una gran afinidad especificidad al dipéptido terminal D-ala-D-ala de los precursores de peptidoglucano expuestos en la superficie externa de la membrana citoplasmática y, por tanto, impiden el acceso de las transglucosilasas y transpeptidasas, de tal modo, que la transglucosilación es la principal reacción que bloquean los glucopéptidos (Shepard y Gilmore, 2002; Talon y Leroy, 2011). El mecanismo de resistencia bacteriano consiste en alterar el pentapéptido al cual se une la vancomicina entre otros antimicrobianos del mismo grupo, y por consecuencia se evita la inhibición del peptidoglucano en la pared celular (Rosen, 2011). Los genes relacionados con la resistencia a glucopéptidos involucran a la familia *van* que se han ubicado en el cromosoma, plásmidos conjugativos y diferentes transposones como, Tn1546, Tn1547, Tn5383 y Tn3 (Klare *et al.*, 2003; Talon y Leroy, 2011). Diversos reportes indican que se han encontrado en bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos con prevalencias bajas y en cepas de origen clínico se observan las cifras más altas de resistencia a glucopéptidos (Shepard y Gilmore, 2002; Klare *et al.*, 2003; Clementi y Aquilanti, 2011; Rosen, 2011).

Es relevante señalar, que en relación a los aislados del género *Streptococcus* se observó multirresistencia a tres grupos de antimicrobianos (macrólidos, aminoglucósidos y betalactámicos) en un 11% (3/28) (Tabla 13), a dos grupos (aminoglucósidos y betalactámicos) con 71% (20/28) (Tabla 13), y resistencia solo a los aminoglucósidos en un 18% (5/28) (Tabla 13). Correspondiente a las cepas del género *Enterococcus* se registró en un 100% (2/2) multirresistencia a dos grupos de antibióticos (aminoglucósidos y betalactámicos) (Tabla 13). En consecuencia, se registraron cepas resistentes a 5 de los 10 antimicrobianos utilizados en la prueba, y el 100% de los aislados de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* fueron resistentes a por lo menos un antimicrobiano (Tabla 13 y 14).

Es importante mencionar, que la resistencia a antibióticos puede ser transferida de manera vertical u horizontal en las comunidades microbianas naturales (Rosen, 2011). La diseminación vertical está mediada por un proceso clonal de una línea resistente particular. Para la transferencia horizontal se han identificado tres mecanismos para la transferencia de genes: la transformación natural, que involucra la incorporación de ADN libre del medio extracelular; la conjugación, que es un mecanismo dependiente del contacto para la transferencia de plásmidos, y transposones conjugativos que ocurre en una amplia variedad de géneros bacterianos, cabe señalar que la conjugación entre Gram negativas utilizan un puente citoplasmático llamado *pilus*, en bacterias Gram positivas usualmente involucra la producción de feromonas sexuales que facilitan la unión de la célula donadora y receptora que permite el intercambio de material genético. La transducción, una transferencia mediada por bacteriófagos (virus). La evolución de la resistencia en comunidades microbianas se potencializa por la transferencia horizontal de genes en las especies y géneros de una bacteria a otra filogenéticamente no relacionadas por acción de los plásmidos conjugativos, transposones, e integrones, así como por los bacteriófagos líticos y temperados (Burne *et al* 2007; Cunningham, 2000; Mathur *et al.*, 2005; Pérez-Pulido *et al.*, 2006; Toomey *et al.*, 2010; Rosen, 2011).

Un prerrequisito para la transferencia de los genes de la resistencia a antibióticos, es el potencial de bacterias ácido lácticas (LABs, por sus siglas en inglés) para asociarse de manera activa y pasiva con las bacterias para poder transferirse plásmidos y transposones. Los plásmidos son comunes en LABs y existen diferencias en su

tamaño, función y distribución (Burne *et al.*, 2007; Cunningham, 2000; Mathur *et al.*, 2005). Las principales funciones que se han encontrado en los plásmidos son: hidrólisis de proteínas, metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y citrato, producción de bacteriocinas y exopolisacáridos, resistencia a antibióticos, metales pesados y factores de virulencia (Burne *et al.*, 2007; Mathur *et al.*, 2005).

Una vez que se ha documentado en el presente estudio, la resistencia a diferentes grupos de antimicrobianos de cepas de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* aisladas de masa nixtamalizada para preparar pozol, y que los genes involucrados según reportes citados, se ubican en gran medida en transposones conjugativos y plásmidos. Además, se determinó actividad parcialmente hemolítica en la cepa número 11 que se identificó como *Streptococcus bovis* (Figura 30 y Tabla 11).

Por consiguiente, se considera una evidencia relevante tratándose de cepas que conforman la microbiota en un alimento que puede ser el principal componente de la dieta de indígenas y mestizos del sureste de la República Mexicana (Escalante *et al.*, 2001). Puesto que existen amplias evidencias experimentales que demostraron la transferencia de diferentes genes de resistencia a los antibióticos y de virulencia, por ejemplo: *Hly* y *Gel* que codifican para hemolisinas y adhesinas respectivamente entre cepas del género *Enterococcus* y con otros géneros de ácido láctico en los cuales se incluye a cepas de *Streptococcus* aislados tanto de carne, quesos, leche fermentada, diversos productos lácteos, así como casos clínicos, probióticos, cultivos iniciadores y diversos aditivos (Hummel *et al.*, 2006; Kastner *et al.*, 2006; Sánchez-Valenzuela *et al.*, 2009; Toomey *et al.*, 2010), por lo tanto, en el caso de que las bacterias aisladas de pozol de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que mostraron resistencia a ciertos antibióticos, y que seguramente contienen uno o algunos de los genes respectivos, estas cepas pueden jugar un papel importante en la transferencia recíproca de determinantes de resistencia a los antibióticos hacia otras bacterias comensales, patógenas o potencialmente patógenas que se encuentren en un medio favorable como lo es el tracto intestinal de animales y humanos, que permite la cercana asociación de organismos empaquetados en altas densidades (Klein, 2003; Kastner *et al.*, 2006; Toomey *et al.*, 2010) de tal manera, que puede existir el riesgo de un intercambio horizontal de genes y por consecuencia las cepas aisladas de pozol como las cepas patógenas puedan albergar genes de virulencia y/o de resistencia a los

antibióticos que no poseían, así lo señalan, diversos estudios que demostraron que la transferencia de dichos genes es exitosa entre cepas de enterococos y estreptococos aislados de alimentos, tracto intestinal y casos clínicos (Klein, 2003; Kastner *et al.*, 2006; Hummel *et al.*, 2007; Toomey *et al.*, 2010).

Los resultados concuerdan con la apreciación de Kastner *et al.* (2006) y diversas investigaciones en donde explica que la resistencia a los antibióticos en bacterias patógenas es un problema médico que va en aumento en la década presente, pero durante los últimos años a capturado la atención la amplia gama de resistencia a los antibióticos en cepas no clínicas, y particularmente en bacterias ácido lácticas procedentes del tracto digestivo de animales, humanos y de alimentos. Este fenómeno probablemente se deba a la transferencia de genes de resistencia a los antibióticos dispersada entre diferentes especies e incluso géneros los cuales incluyen patógenos obligados y potenciales (Kastner *et al.*, 2006; Gevers *et al.*, 2003). Se tienen reportes que en al menos 25 especies diferentes de bacterias ácido lácticas que contienen de manera nativa múltiples plásmidos (1-16) diferentes en una sola línea. Los plásmidos son comunes en enterococos, estreptococos, lactococos, leuconostoc, pediococos y en algunas cepas de lactobacilos y bifidobacterias (Burne *et al.*, 2007; Cunningham, 2000; Kayser, 2003; Mathur *et al.*, 2005). Aislados de enterococos de alimentos (principalmente *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*) se analizaron para medir la resistencia a un amplio rango de antibióticos utilizando la prueba de susceptibilidad fenotípica, tanto en carne cruda como en productos fermentados de la leche y carne. Sus resultados sugieren una alta prevalencia de enterococos resistentes a múltiples antibióticos provenientes de alimentos, no obstante, la mayoría fueron susceptibles a los antibióticos con más relevancia clínica como ampicilina y vancomicina (Franz *et al.*, 2003; Mathur *et al.*, 2005; Pérez-Pulido *et al.*, 2006).

En otro estudio realizado en leche y queso portugués donde se aislaron enterococos, mostraron resistencia a grandes dosis de gentamicina (Lopes *et al.*, 2005). En 2003, Donabediam *et al.*, evaluaron el mecanismo molecular de la resistencia de cepas de enterococos a gentamicina de aislados de alimentos para el humano y los animales. Sugirieron que existen similitudes en diversas muestras de zonas geográficas diferentes y que además hay evidencia de que se dispersan de los animales al humano a través

de la cadena alimenticia (Franz *et al.*, 2003; Mathur *et al.*, 2005; Pérez-Pulido *et al.*, 2006).

El desarrollo de la resistencia está basada principalmente en dos factores, la presencia de genes de resistencia y la presión selectiva por el uso de los antibióticos (Cunningham, 2000; Mathur *et al.*, 2005; Hummel *et al.*, 2007). La presión selectiva impuesta por el uso de los antimicrobianos es determinante en el surgimiento de bacterias resistentes. Cuando una población bacteriana mixta se expone a agentes microbianos es muy probable que haya ciertos microorganismos resistentes a la dosis del antimicrobiano empleado. Bajo presión selectiva el número se incrementa y algunas bacterias pasarán sus genes de resistencia a otros miembros de la población (Burne *et al.*, 2007; Kayser, 2003; Martin *et al.*, 2005; Mathur *et al.*, 2007).

El presente estudio aporta elementos al análisis, acerca del uso de bacterias ácido-lácticas presentes en un alimento de carácter tradicional y artesanal como el pozol fundamentalmente de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*, como cultivos iniciadores, cultivos de protección, mejoradores de la calidad sensorial de alimentos, suplementos alimenticios, probióticos o cualquier uso biotecnológico, una vez que mostraron resistencia a ciertos grupos de antimicrobianos y que seguramente posean los genes que codifican para dichas características en plásmidos y/o transposones conjugativos. Además, a nivel internacional la resistencia a los antibióticos se considera el factor más importante de evaluar para que una cepa sea excluida o utilizada en la industria alimenticia (Toomey *et al.*, 2010).

Algunas cepas de LABs de animales y de la microbiota intestinal del humano han sido adoptadas como suplementos alimenticios o “probióticos” incluyendo a *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* Subs. *rhamnosus* y varios *Bifidobacterium* y *Propionibacterium* spp. No obstante, son pocos los estudios que se han realizado para investigar la resistencia adquirida en LABs a partir de los alimentos y la mayoría de los datos reportados provienen de enterococos patógenos oportunistas, mientras que el número de reportes de lactococos y lactobacilos es limitado (Kayser, 2003; Mathur *et al.*, 2005).

Así mismo, el comité científico de nutrición animal de la comisión europea desde el 2001, tiene como punto principal en su esquema de evaluación de cepas que no son apropiadas para la industria, aquellas que contengan resistencia a los antibióticos

(Klein, 2003). Existen reportes en los cuales afirman que los enterococos y estreptococos pueden contribuir a dispersar genes de virulencia y resistencia a los antibióticos por transferencia horizontal (Sánchez *et al.*, 2009; Clementi y Aquilanti, 2011). La cadena alimenticia es considerada como una de las rutas principales en la transmisión de genes de resistencia a los antibióticos entre comunidades bacterianas (Toomey *et al.*, 2010; Clementi y Aquilanti, 2011; Talon y Leroy, 2011).

Debido a estas implicaciones en la seguridad alimentaria, es importante evaluar el potencial de patogenicidad de estas antes de proponerlas como cultivos iniciadores (Toomey *et al.*, 2010). Las bacterias ácido lácticas que son utilizadas como aditivos en tecnología de alimentos y mostraron la presencia de resistencia adquirida no son muy aceptadas en Europa en comparación con EE.UU. Para EE.UU la FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) clasifica ciertos microorganismos como reconocidos generalmente como seguros GRAS (Generally Recognized as Safe, por sus siglas en inglés). Un producto calificado como GRAS está exento de los requerimientos aprobatorios al cual puede llegar con un buen historial de seguridad en su uso. En contraste para los países Europeos el control es más estricto y todos los productos deben ser analizados (Mathur *et al.*, 2005; Pérez-Pulido, 2006).

La introducción comercial de probióticos que contienen cepas con resistencia a antibióticos podría traer consecuencias adversas, por ejemplo al transferir resistencia a bacterias patógenas. Han surgido diversas iniciativas recientemente a nivel mundial para mejorar la bioseguridad de los probióticos y cultivos iniciadores (Burne *et al.*, 2007; Mathur *et al.*, 2005; Toomey *et al.*, 2010). La mayor amenaza del uso de los antibióticos y bacterias ácido lácticas con resistencia antimicrobiana en la industria alimenticia es el surgimiento y dispersión de bacterias patógenas resistentes que en consecuencia no pueden ser atacadas eficientemente con los tratamientos utilizados actualmente y se han convertido a la fecha en un problema de salud pública mundial (Franz *et al.*, 2003; Mathur *et al.*, 2005; Toomey *et al.*, 2010; Clementi y Aquilanti, 2011; Rosen, 2011; Talon y Leroy, 2011).

Es ampliamente conocido el uso de bacterias ácido lácticas de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* en la industria de los alimentos (Klein, 2003; Kastner *et al.*, 2006; Hummel *et al.*, 2007; Toomey *et al.*, 2010), es por ello, que en el caso de las bacterias aisladas de pozol, que se pretendan utilizar en la tecnología de alimentos y

basados en los datos experimentales del presente estudio, se deben examinar cuidadosamente en relación a la presencia de genes de resistencia a los antibióticos y factores de virulencia para determinar los riesgos potenciales a sus aplicaciones (Kastner *et al.*, 2006; Hummel *et al.*, 2007), y se recomienda buscar los genes de resistencia a los antibióticos y de virulencia, principalmente en plásmidos y transposones, así como, pruebas de transferencia de genes antes de su uso comercial en cultivos iniciadores, probióticos o de otra índole (Kastner *et al.*, 2006; Toomey *et al.*, 2010).

7. CONCLUSIONES.

En el presente estudio se aislaron 160 cepas y se seleccionaron 80 aislados, de los cuales se identificaron 30 bacterias de los géneros diana, 28 de *Streptococcus* y 2 de *Enterococcus* en diferentes tiempos de fermentación de la masa nixtamalizada para preparar pozol, mediante la secuenciación de la región V1 del gen ribosomal 16S y la comparación de secuencias en el “GenBank”, con porcentajes de identidad superiores al 98%. Además, se identificaron especies de cuatro géneros más (*Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Weissella*). Asimismo, se destaca el hallazgo de tres aislados que probablemente pertenezcan a especies nunca antes reportadas como parte de la microbiota del pozol (*Enterococcus italicus*, *Lactobacillus pantheris* y *Weissella cibaria*). Lo cual sugiere que la comunidad microbiana puede ser más compleja de lo que se conoce.

Los dendrogramas permitieron monitorear por agrupamiento a las cepas de los géneros diana, y se determinó que la enzima *Hinf I* logró discriminar entre los géneros identificados en el presente estudio. Sin embargo, la enzima *Hae III* separó parcialmente los géneros identificados, dado que congregó en un mismo grupo aislados de estreptococos y lactococos.

La resistencia a los antimicrobianos indicó cepas de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* multiresistentes a diferentes grupos de antibióticos y presumiblemente la mayoría de los genes implicados se ubican en plásmidos y transposones conjugativos, lo que implica un riesgo potencial de transferencia horizontal entre diversas bacterias de

carácter patógeno, comensal o potencialmente patógeno, que están presentes en la cadena alimenticia en su conjunto.

8. RECOMENDACIONES.

A partir de la discusión de los resultados, se propone realizar estudios que busquen los genes de resistencia antimicrobiana a eritromicina (macrólido), gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina (aminoglucósidos), y cloxacilina (betalactámico). Así como, genes de virulencia tanto en plásmidos como en el cromosoma bacteriano en las cepas de estreptococos y enterococos que se aislaron de la masa nixtamalizada para preparar pozol. También, es importante conocer la transferencia genética para los mismos marcadores moleculares, lo que permitiría valorar y tener una perspectiva más amplia del papel que juegan en la comunidad como probables dispersores de genes hacia otras bacterias y de los riesgos potenciales al incluir dichas cepas en la industria alimentaria.

Por último, en las cepas que el presente trabajo reportó por primera vez como parte de la microbiota del pozol (*Enterococcus italicus*, *Lactobacillus pantheris* y *Weisella cibaria*) se propone la secuenciación de la totalidad del gen ADNr 16S, para corroborar la identidad de las cepas. En el caso de que la secuenciación del gen ribosomal 16S no facilite la discriminación entre especies del mismo género debido a altos grados de homología que se pudieran presentar, existen métodos alternativos que se han utilizado exitosamente para bacterias ácido lácticas tales como: la amplificación y secuenciación de los genes *sod A*, *ddl*, *van*, *ace*, *cpn60*, *atp A* y la secuencia reguladora transcripcional EF0027.

9. REFERENCIAS.

1. **Allgaier, A., Goethe, R., Wisselink, J.H., Smith, E.H., Weigand, V.P.**, 2001. Relatedness of *Streptococcus suis* isolates of various serotypes and clinical backgrounds as evaluated by macrorestriction analysis and expression of potential virulence traits. *Journal of Clinical Microbiology*. 39, 445-453.
2. **Ampe, F., Ben Omar, M., Guyot, J.P.**, 1998. Recovery of total microbial RNA from lactic acid fermented foods with a high starch content. *Letters in Applied Microbiology*. 27, 270-274.
3. **Ampe, F., Ben Omar, M., Guyot, J.P.**, 1999. Culture-independent quantification of physiologically-active microbial groups in fermented foods using rRNA-targeted oligonucleotide probes: application to pozol, a Mexican lactic acid fermented maize dough. *Journal of Applied Microbiology*. 87, 131-140.
4. **Ampe, F., Ben Omar, M., Moizan, C., Wachter, C., Guyot, J.P.**, 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 5464-5473.
5. **Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K.**, 2005. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
6. **Barrett, T., Gerner-Smidt, P.**, 2007. Molecular source tracking and molecular subtyping. *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*, 3rd Ed. ASM Press, Washington, D.C. 987-999.
7. **Becker, K., Hansen, D., Mellman, A., Meier, C., Schumann, P., Peters, G., von Eiff, C.**, 2004. Development and evaluation of a quality-controlled ribosoma sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 42, 4988-4995.
8. **Ben Omar, N., Ampe, F.**, 2000. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 3664-3673.
9. **Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N.M.K., Franz, C.M.A.P.**, 2004. Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods. *Systematic and Applied Microbiology*. 27, 118-130.
10. **Biare, J., Nguyen, S.I., Pini, A., Gossé, F., Richert, S., Thiersé, D., Van Dorselaer, A., Wagner, L.E., Raul, F., Klein, J.P., Guinard, S.M.**, 2004. Carcinogenic properties of proteins with pro-inflammatory activity from *Streptococcus infantarius* (formerly *S. bovis*). *Carcinogenesis*. 25, 1477-1484.
11. **Burne, A.R., Bessen, E.D., Broadbent, R.J., Claverys, J.P.**, 2007. The seventh International Conference on the genetics of streptococci, lactococci, and enterococci. *Journal of Bacteriology*. 1209-1218.
12. **Cañas, U., Bárzana, G.E., Owens, J.D., Wachter, C.**, 1993. La elaboración de pozol en los altos de Chiapas. *Ciencia*. 44, 219-229.
13. **Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., Alland, D.**, 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 69, 330-339.
14. **Churchward, G.**, 2007. The two faces of janus: virulence gene regulation by CovR/S in group A streptococci. *Molecular Microbiology*. 64, 34-41.
15. **Clarridge III, J.E.**, 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 17, 840-862 (table of contents).
16. **Clementi, F., Aquilanti, L.**, 2011. Recent investigations and update criteria for the assessment of antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. *Anaerobe*. 17, 394-398.
17. **Cunningham, W.H.**, 2000. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 13, 470-511.
18. **Díaz, R.G., Guyot, J.P., Ruiz, T.F., Morlon, G.J., Wachter, C.**, 2003. Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 4367-4374.

19. **Efstratiou, F.**, 2000. Group A streptococci in the 1990s. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 45, 3-12.
20. **Escalante, A., Rodriguez, M., Martinez, A., Lopez-Munguía, A., Bolivar, F., Gosset, G.**, 2004. Characterization of bacterial diversity in *Pulque*, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*. 235, 273-279.
21. **Escalante, A., Wachter, C., Farres, A.**, 2001. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 64, 21-31.
22. **Facklam, R.**, 2002. What happened to the streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews*. 15, 613-630.
23. **Fernández, C.M., Amado, M.L.E., Carretero, M.M.J., García, C.E., González, R.J.**, 2002. Meningitis por *Streptococcus bovis*: una causa poco frecuente de meningitis bacteriana en el paciente adulto. *Revista de Neurología*. 34, 840-842.
24. **Foulquié-Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L.**, 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 106, 1-24.
25. **Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzappel, W.H.**, 2003. Enterococci in foods- a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 105-122.
26. **Franz, C.M.A.P., van Belkum, M.J., Holzappel, W.H., Abriouel, H., Galvez, A.**, 2007. Diversity of enterococcal bacteriocin and their grouping into a new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews*. 31, 293-310.
27. **Fuentes, I., Herrera, T., Ulloa.**, 1974. Descripción de una especie nueva de *Pseudomonas*, *P. mexicana*, y determinación de *Escherichia coli* var. *neopolitana* aislada del pozol. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 16, 99-103.
28. **Gálvez, A., Valdivia, E., Abriouel, H., Camafeita, E., Mendez, E., Martinez-Bueno., Maqueda, M.**, 1998. Isolation and characterization of enterocin EJ97 a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Archives of Microbiology*. 171, 59-65.
29. **García, S.M del M., Vázquez, F., Méndez, F.J.**, 2006. *Streptococcus pneumoniae* and virulence factors and their clinical impact: an update. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 24, 512-517.
30. **Hardie, J.H and Whiley, R.A.**, 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 83, 1S-11S.
31. **Hummel, A., Holzappel, W., Franz, C.**, 2007. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes enterococci isolated of food. *Systematic and Applied Microbiology*. 30, 1-7.
32. **Illana, O.V., Wachter, R.C., Le Borgne, S., López, M.A.**, 2002. Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: A *Leuconostoc citreum* strain isolated from pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 28, 112-117.
33. **Jackson, C.R., Fedorka-Cray., P.J., Barret, J.B.**, 2004. Use of a genus and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 42, 3558-3565.
34. **Jonsson, M., Swedberg, G.**, 2006. Macrolide resistance can be transferred by conjugation from viridians streptococci to *Streptococcus pyogenes*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 28, 101-103.
35. **Kastner, S., Perreten, V., Bleuler, H., Hugenschmidt, G., Lacroix, C., Meile, L.**, 2006. Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Systematic and Applied Microbiology*. 29, 145-155.
36. **Kayser, F.H.**, 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 255-262.
37. **Klare, I., Konstabel, C., Badstübner, D., Wegner, G., Witte, W.**, 2003. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 269-290.
38. **Klein, G.**, 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 123-131.
39. **Lepage, E., Brinster, S., Caron, C., Ducroix-Crepy, C., Rigottier-Gois, L., Dunny, G.**, 2006. Comparative genomic hybridization analysis of *Enterococcus faecalis*: identification of genes absent from food strains. *Journal of Bacteriology*. 188, 6858-6868.

40. **Lopes, S. M de F., Simoes A.P., Tenreiro, R., Marques, F.J.J., Crespo, B.M.T.,** 2006. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *International Journal of Food Microbiology*. 112, 208-214.
41. **Lopes, S.M de F., Ribeiro, T., Abrantes, M., Marques, F.J.J., Tenreiro, R., Crespo, B.M.T.,** 2005. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *International Journal of Food Microbiology*. 103, 191-198.
42. **Martin, B., Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, T.,** 2005. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*. 98, 1177-1190.
43. **Mathur, S and Singh, R.,** 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *International Journal of Food Microbiology*. 105, 281-295.
44. **Mcmillan, J.D., Geffers, R., Buer, J., Vlamincx, B.J.M., Sriprakash, S.K., Chhatwal, S.G.,** 2007. Variations in the distribution of genes encoding virulence and extracellular proteins in group A *Streptococcus* are largely restricted to 11 genomic loci. *Microbes and Infection*. 9, 259-270.
45. **Morlon-Guyot, J., Guyot, J.P., Pot, B., Jacobe de Haut., Raimbault, M.,** 1998. *Lactobacillus manihotivorans* sp. a new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48, 1101-1109.
46. **Nocker, A., Burr, M., Camper, A.,** 2007. Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. *Microbial Ecology*. 54, 276-289.
47. **Nuraida, L., Wachter, C., Owens, J.D.,** 1995. Microbiology of pozol a Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 11, 567-571.
48. **Ogier, J., Serror, P.,** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: *The Enterococcus genus*. *International Journal of Food Microbiology*. 126, 291-301.
49. **Olive, D., Bean, P.,** 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. 37, 1661-1669.
50. **Pérez-Pulido, R., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Martínez-Cañamero, A., Gálvez, A.,** 2006. Safety and potential risks of enterococci isolated from traditional fermented capers. *Food and Chemical Toxicology*. 44, 2070-2077.
51. **Petti, C.A., Polage, C.R., Schreckenber, P.,** 2005. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganism misidentified by conventional methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 43, 6123-6125.
52. **Phister, G.T., O'Sullivan, J.D., McKay, L.L.,** 2004. Identification of Bacilysin, Chlorotetainem, and Iturin A produced by *Bacillus* sp. Strain CS93 isolated of pozol, a Mexican fermented Maize dough. *Applied and Environmental Microbiology*. 631-634.
53. **Poyart C., G. Quesne, S. Coulon, P. Berche, P. Trieu-Cuot.,** 1998. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *Journal of Clinical Microbiology*. 36, 41-47.
54. **Ribeiro, T., Abrantes, M., Lopes, S.M de F., Crespo, B.M.T.,** 2007. Vancomycin-suceptible dairy and clinical enterococcal isolates carry *VanA* and *VanB* genes. *International Journal of Food Microbiology*. 113, 289-295.
55. **Rivera-Noriega, A.,** 2001. Efecto de la acción de microorganismos amilolíticos en la fermentación del pozol. Tesis. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. 62 p.
56. **Robredo, B., Singh, V.K., Baquero, F., Murray, E.B., Torres, C.,** 2000. Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. *International Journal of Food Microbiology*. 54, 197-204.
57. **Rodas, A.M., Ferrer, S. y Pardo, I.,** 2003. 16S-ARDRA, A tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology*. 26, 412-422.
58. **Rosen, T.,** 2011. Antibiotic resistance: An editorial review with recommendations. *Journal of Drugs in Dermatology*. 10, 724-733.
59. **Sainz, T., Pérez, J., Villaseca, J., Hernández, U., Eslava, C., Mendoza, G., Wachter, C.,** 2005. Survival to different acid challenges and outer membrane protein profiles of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pozol, a Mexican typical maize fermentes food. *International Journal of Food Microbiology*. 105, 357-367.
60. **Sainz, T., Wachter, C., Espinoza, J., Centurión, D., Navarro, A., Molina, J., Inzunza, A., Cravioto, A., Eslava, C.,** 2001. Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food. *International Journal of Food Microbiology*. 71, 169-176.
61. **Salinas, Ch.C.,** 1958. Etnobiología e introducción a la bacteriología del pozol. Tesis profesional, Fac. de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 63 p.

62. **Sánchez, A., Ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas, R., Veljovic, K., Martinez, M., Kojic, M., Gálvez, A.**, 2009. Virulence factors, antibiotic resistance in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control*. 20, 381-385.
63. **Sedgley, C., Lee, H., Matthew, B., Martin, B., Flannagan, S.**, 2008. Antibiotic resistance gene transfer between *Streptococcus gordonii* and *Enterococcus faecalis* in root canals of teeth *ex vivo*. *Basic Research-Biology*. 34, 570-574.
64. **Selim, A.S., Boonkumklao, P., Sone, T., Assavanig, A., Wada, M., Yokota, A.**, 2005. Development and assessment of a real-time PCR assay for rapid and sensitive detection of a novel thermotolerant bacterium, *Lactobacillus thermotolerans*, in chicken feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 4214-4219.
65. **Shepard, B.D., Gilmore, M.S.**, 2002. Antibiotic-resistant enterococci: The mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection*. 4, 215-224.
66. **Silva, M., Ribeiro, T., Abrantes, M., Figueiredo, J., Tenreiro, R., Barreto, M.**, 2005. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *International Journal of Food Microbiology*. 103, 191-198.
67. **Talon, R., Leroy, S.**, 2011. Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat Science*. 89, 303-309.
68. **Toomey, N., Bolton, D., Fanning, S.**, 2010. Characterisation and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs. *Research in Microbiology*. 161, 127-135.
69. **Ulloa, M., y Herrera, T.**, 1972. Descripción de dos especies nuevas aisladas del pozol: *Agrobacterium azotophilum* y *Acromobacter pozolis*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 14, 15-24.
70. **Van de Peer Y., Chapelle, S., De Wachter, R.**, 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Research*. 24, 3381-3391.
71. **Vitti, C., Giovannetti, L.**, 2005. Characterization of cultivable heterotrophic bacterial communities in Cr-polluted and unpolluted soils using biologic and ARDRA approaches. *Applied Soils Ecology*. 28, 101-112.
72. **Wacher, C., Cañas, A., Bárzana, E., Lappe, P., Ulloa, M., Owens, D.**, 2000. Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiology*. 17, 251-256.
73. **Wacher, M.C.**, 1995. Estudios sobre la microbiología del pozol. Tesis de Doctora en Ciencias (bioquímica). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
74. **Watanabe, K., Kodama, Y., Harayama, S.**, 2001. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *Journal Microbiological Methods*. 44, 253-252.
75. **Yousif, N.M.K., Dawyndt, P., Abriouel, H., Wijaya, A., Schillinger, U., Vancanneyt, M., Swings, J., Dirar, H.A., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P.**, 2005. Molecular characterization, technological properties and safety aspects of enterococci from "Hussuwa", an African fermented sorghum product. *Journal of Applied Microbiology*. 98, 216-228.

ANEXOS.

Anexo 1. Amplificados del gen ADNr 16S de cepas seleccionadas y aisladas de pozol.

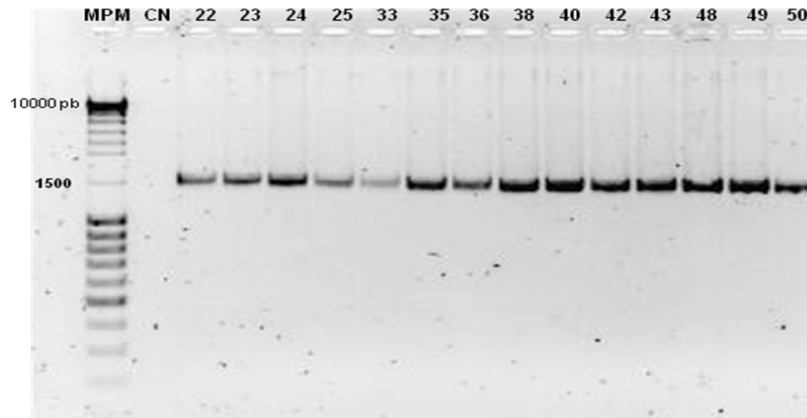


Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de productos de PCR del gen ADNr 16S de cepas puras del pozol aisladas con medio MRS. Condiciones de electroforesis: 85 V. / 90 min.

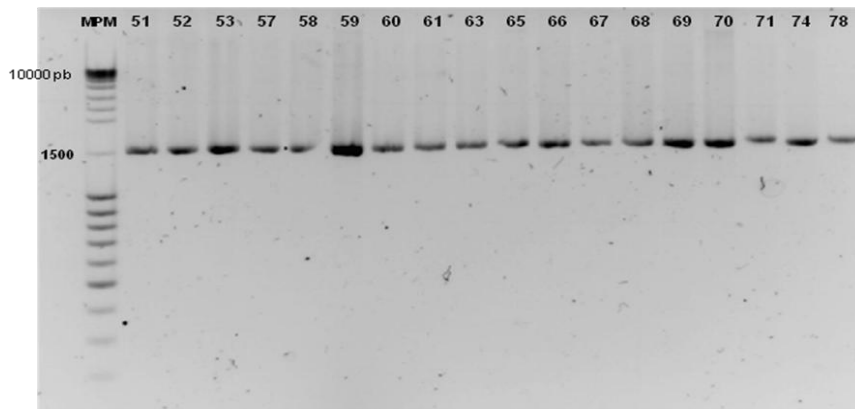


Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de productos de PCR del gen ADNr 16S de cepas puras del pozol aisladas con medio MRS. Condiciones de electroforesis: 85 V. / 90 min.

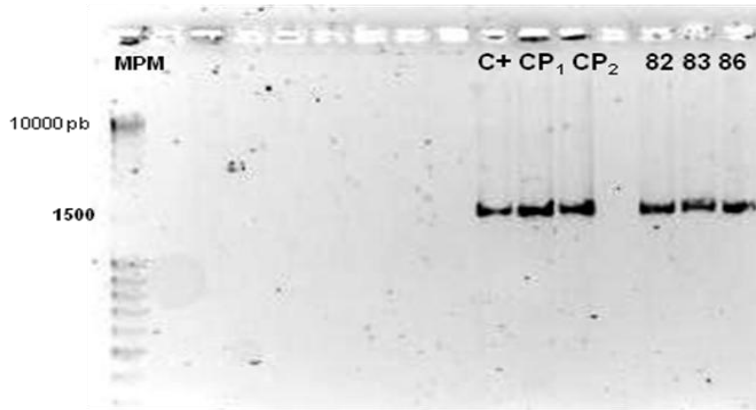


Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de productos de PCR del gen ADNr 16S de cepas puras del pozol aisladas con medio KF. Condiciones de electroforesis: 85 V. / 90 min.

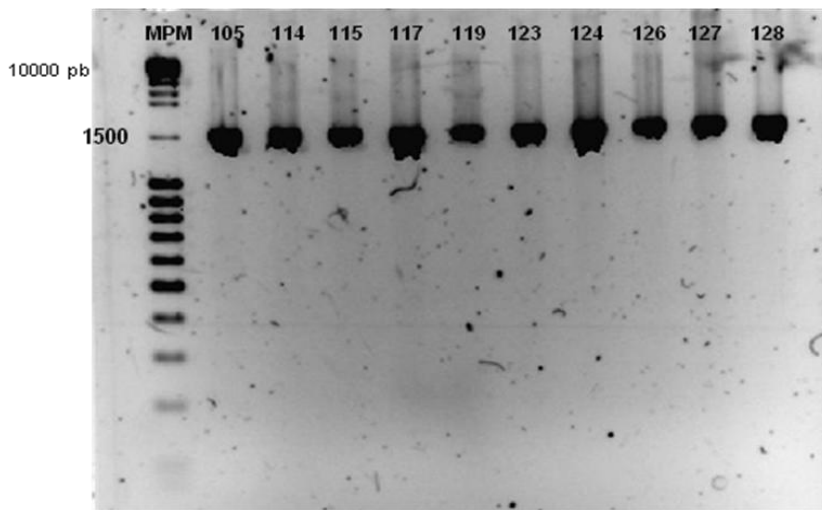


Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de productos de PCR del gen ADNr 16S de cepas puras del pozol aisladas con medio KF. Condiciones de electroforesis: 85 V. / 90 min.

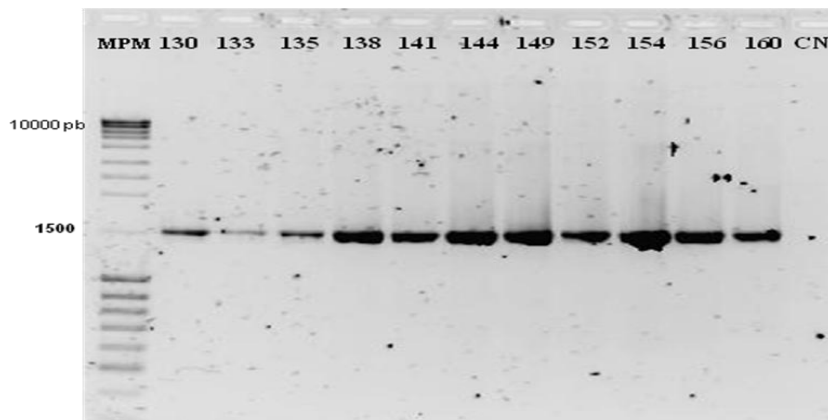


Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de productos de PCR del gen ADNr 16S de cepas puras del pozol aisladas con medio KF. Condiciones de electroforesis: 85 V. / 90 min.