



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

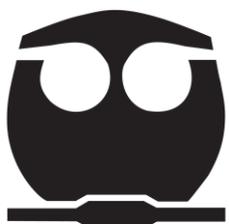
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE BACTERIAS DEL GÉNERO  
*STREPTOCOCCUS* AISLADAS DEL POZOL.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA  
Morales Rodríguez Emmanuel**



**MÉXICO, D.F.**

**2015**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Olga del Carmen Velázquez Madrazo  
**VOCAL:** Profesor: María del Carmen Wachter Rodarte  
**SECRETARIO:** Profesor: Aurora Irma Ortegón Ávila  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: Gloria Díaz Ruiz  
**2° SUPLENTE:** Profesor: Norma Angélica Camacho de la Rosa

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 324, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA.  
CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA.**

**ASESOR DEL TEMA: MA. DEL CARMEN WACHER RODARTE**

---

**SUPERVISOR TÉCNICO: GLORIA DÍAZ RUIZ**

---

**SUSTENTANTE: EMMANUEL MORALES RODRÍGUEZ**

---

## ÍNDICE

.....	1
<b>1 INTRODUCCIÓN.</b> ....	<b>1</b>
<b>2 ANTECEDENTES.</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 POZOL.</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.1 Elaboración del pozol.</b> ....	<b>4</b>
<b>2.1.2 Microbiota del pozol.</b> .....	<b>6</b>
<b>2.2 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL).</b> ....	<b>8</b>
<b>2.2.1 Metabolismo.</b> ....	<b>8</b>
<b>2.2.1.1 Bacterias ácido lácticas homofermentativas.</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2.1.2 Bacterias ácido lácticas heterofermentativas.</b> ....	<b>10</b>
<b>2.2.2 Streptococcus spp.</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2.2.1 Grupo Streptococcus bovis.</b> ....	<b>12</b>
<b>2.2.2.2 Streptococcus en los alimentos.</b> ....	<b>13</b>
<b>2.2.3 Lactococcus spp.</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2.3.1 Lactococcus en los alimentos.</b> ....	<b>15</b>
<b>2.2.4 Enterococcus spp.</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2.4.1 Enterococcus en los alimentos.</b> ....	<b>16</b>
<b>2.3 BACTERIOCINAS.</b> .....	<b>17</b>
<b>2.3.1 Características de las bacteriocinas.</b> ....	<b>18</b>
<b>2.3.2 Clasificación de las bacteriocinas.</b> .....	<b>19</b>
<b>2.3.3 Mecanismo de acción de las bacteriocinas.</b> ....	<b>21</b>
<b>2.3.4 Bacteriocinas representativas de BAL.</b> .....	<b>23</b>

<b>2.4</b>	<b>BACTERIAS PATÓGENAS.....</b>	<b>24</b>
2.4.1	<i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium.....	25
2.4.2	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	27
<b>3</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>31</b>
5.1	<b>MICROORGANISMOS.....</b>	<b>31</b>
5.1.1	<i>Bacterias ácido lácticas</i> .....	31
5.1.2	<i>Bacterias patógenas, Listeria monocytogenes y Salmonella Typhimurium (Microorganismos sensibles)</i> .....	32
5.2	<b>REACTIVACIÓN Y CONSERVACIÓN.....</b>	<b>33</b>
5.2.1	<i>Reactivación y conservación de BAL</i> .....	33
5.2.2	<i>Reactivación y conservación de bacterias patógenas</i> .....	36
5.3	<b>PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR.....</b>	<b>39</b>
5.3.1	<i>Preparación de medio Infusión cerebro-corazón tamponado (BHI-T), placas</i> .....	39
5.3.2	<i>Preparación de medio BHI-T para sobrecapa</i> .....	39
5.3.3	<i>Preparación de placas para realizar la prueba de difusión en agar</i> .....	40
5.3.4	<i>Obtención de los sobrenadantes de las BAL</i> .....	41
5.3.5	<i>Determinación de actividad antimicrobiana</i> .....	41
5.4	<b>EFFECTO DE NEUTRALIZAR Y TRATAR TÉRMICAMENTE LOS SOBRENADANTES SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....</b>	<b>43</b>

5.4.1	<i>Preparación de los sobrenadantes neutralizados y con tratamiento térmico (SNTT)</i> .....	43
5.4.2	<i>Determinación de la actividad antimicrobiana del SNTT</i> .....	45
5.5	EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS SOBRENADANTES NEUTRALIZADOS Y TRATADOS TÉRMICAMENTE (SNTTC) SOBRE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	45
5.5.1	<i>Preparación de los sobrenadantes</i> .....	45
5.5.2	<i>Concentración de los SNTT con rotavapor y bomba de vacío</i> .....	46
5.5.3	<i>Determinación de la actividad antimicrobiana de los SNTTC</i> .....	47
5.6	PRUEBA DE RETO ENTRE <i>STREPTOCOCCUS SP.</i> Y <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> .....	47
5.6.1	<i>Preparación de las BAL y de la bacteria patógena</i> .....	47
5.6.2	<i>Preparación de medio Oxford para Listeria monocytogenes</i> .....	48
5.6.3	<i>Montaje de la prueba de reto</i> .....	49
6	RESULTADOS.....	54
6.1	RESULTADOS PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR.....	54
6.2	RESULTADOS PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR CON SNTT.....	55
6.3	RESULTADOS PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR CON SNTTC.....	56
6.4	RESULTADOS PRUEBA DE RETO.....	65
7	CONCLUSIONES.....	73
8	PERSPECTIVAS.....	74
9	BIBLIOGRAFÍA.....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1. POZOL [34] .....	3
FIGURA 2. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PREPARACIÓN DEL POZOL.....	5
FIGURA 3. FERMENTACIÓN HOMOLÁCTICA [8]. .....	9
FIGURA 4. FERMENTACIÓN HETEROLÁCTICA [8]. .....	10
FIGURA 5, FOTOGRAFÍA DE <i>STREPTOCOCCUS</i> TOMADA CON MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO [37]. .....	12
FIGURA 6, FOTOGRAFÍA DE <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> TOMADA CON MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO [38] .....	14
FIGURA 7, FOTOGRAFÍA DE <i>ENTEROCOCCUS</i> SP. TOMADA CON UN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO [39]. .....	16
FIGURA 8. ESTRUCTURA DE DOS BACTERIOCINAS A) AS-48 B) SUBTILOCINA A. [32] .....	19
FIGURA 9. MECANISMO DE ACCIÓN DE BACTERIOCINAS FRENTE A BACTERIAS GRAM POSITIVAS (A) Y FRENTE A GRAM NEGATIVAS (B) [33]. .....	22
FIGURA 10, FOTOGRAFÍA DE TINCIÓN DE GRAM DE <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM [36]. .....	26
FIGURA 11, FOTOGRAFÍA CON MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> [35]. .....	27
FIGURA 12. REACTIVACIÓN DE BAL Y CONSERVACIÓN A MEDIANO PLAZO. ....	34
FIGURA 13. CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO DE BAL.....	35
FIGURA 14. REACTIVACIÓN Y CONSERVACIÓN A MEDIANO PLAZO DE CEPAS PATÓGENAS. ....	37
FIGURA 15. CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO DE CEPAS PATÓGENAS.....	38
FIGURA 16. COLOCACIÓN DE CILINDROS PARA FORMAR LOS POZOS EN LA PLACA BHI-T. ....	42

FIGURA 17. HALO DE INHIBICIÓN DE LA CEPA CONTROL (1).....	42
FIGURA 18. PREPARACIÓN DE SOBRENADANTES, NEUTRALIZACIÓN Y TRATAMIENTO TÉRMICO. .....	44
FIGURA 19, COLONIAS CARACTERÍSTICAS DE LAS BAL.....	51
FIGURA 20, COLONIAS CARACTERÍSTICAS DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> .....	52
FIGURA 21. METODOLOGÍA DE PRUEBA DE RETO. ....	53
FIGURA 22. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE <i>STREPTOCOCCUS</i> FRENTE A <i>L.</i> <i>MONOCYTOGENES</i> (PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR).....	57
FIGURA 23, ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE <i>STREPTOCOCCUS</i> FRENTE A <i>L.</i> <i>MONOCYTOGENES</i> (PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR).....	58
FIGURA 24.1. RESULTADO DE LA PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR UTILIZANDO SNTTC FRENTE A <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> . ....	63
FIGURA 24.2. RESULTADO PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR UTILIZANDO SNTTC FRENTE A <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> . ....	64
FIGURA 25. CRECIMIENTO DE LA CEPA A45208 Y DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> RESPECTO AL TIEMPO. ....	66
FIGURA 26. CRECIMIENTO DE LA CEPA A37103 Y <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> RESPECTO AL TIEMPO. ....	67
FIGURA 27. CRECIMIENTO DE LA CEPA A36202 Y <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> RESPECTO AL TIEMPO. ....	68
FIGURA 28. CRECIMIENTO DE LA CEPA A45212 Y <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> RESPECTO AL TIEMPO. ....	69

FIGURA 29. CRECIMIENTO DE LA CEPA A36111 Y *LISTERIA MONOCYTOGENES* RESPECTO AL TIEMPO. .... 70

**ÍNDICE DE TABLAS.**

TABLA 2.1. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DEL POZOL. .... 7

TABLA 5.1. CEPAS A UTILIZAR, AISLADAS DEL POZOL POR DÍAZ-RUIZ ET AL (2003) ..... 32

TABLA 5.2 COMPONENTES DEL MEDIO BHI-T SÓLIDO EN PLACA. .... 39

TABLA 5.3. COMPONENTES DEL MEDIO BHI-T PARA SOBRECAPA. .... 40

TABLA 5.4. INGREDIENTES ACTIVOS POR CADA 5 ML DE ANTIBIÓTICO. .... 48

TABLA 6.1. RESULTADOS DEL EFECTO ANTIMICROBIANO SOBRE *LISTERIA MONOCYTOGENES* POR LAS BAL DEL GÉNERO *STREPTOCOCCUS*. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR. LA PRUEBA SE REALIZÓ POR DUPLICADO. .... 59

TABLA 6.2. RESULTADOS DEL EFECTO ANTIMICROBIANO SOBRE *LISTERIA MONOCYTOGENES* POR LAS BAL DEL GÉNERO *STREPTOCOCCUS*. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR, UTILIZANDO SNTT. LA PRUEBA SE REALIZÓ POR DUPLICADO. .... 61

TABLA 6.3. RESULTADOS DEL EFECTO ANTIMICROBIANO SOBRE *LISTERIA MONOCYTOGENES* POR LAS BAL DEL GÉNERO *STREPTOCOCCUS*. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR, UTILIZANDO SNTTC. LA PRUEBA SE REALIZÓ POR DUPLICADO. .... 62

**Glosario de abreviaturas.**

BAL: Bacterias ácido lácticas.

BHI-T: Infusión cerebro-corazón tamponado.

SNTT: Sobrenadante neutralizado y tratado térmicamente.

SNTTC: Sobrenadante neutralizado, tratado térmicamente y concentrado.

## **1 Introducción.**

El pozol es una bebida no alcohólica, que se obtiene de la fermentación espontánea de masa de maíz nixtamalizado. La microbiota es bastante compleja, desde diversos tipos de bacterias hasta mohos y levaduras. Las principales bacterias encontradas durante todo el proceso de fermentación son las bacterias lácticas, dentro de este grupo de bacterias predominan bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Weissella*. En el pozol se han encontrado bacterias ácido lácticas amilolíticas, las cuales fueron identificadas por ribotipificación y análisis de secuencia del gen rRNA 16S, entre ellas: *Streptococcus bovis*, *Streptococcus infantarius*, *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus*.

Las Bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos que producen como principal metabolito, al ácido láctico. Son organismos nutricionalmente exigentes y son capaces de hidrolizar péptidos de la leche. Estas bacterias además de contribuir en la conservación de los alimentos, mejoran las características sensoriales (sabor, olor, textura) y aumentan la calidad nutritiva.

Además de metabolitos, las BAL producen algunas sustancias antimicrobianas, las cuales ayudan a preservar la calidad e inocuidad de los alimentos fermentados inhibiendo el crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos o de descomposición. Dichas sustancias pueden ser tan sencillas como el peróxido de hidrógeno hasta más complejas como las bacteriocinas, que son sustancias peptídicas,

## **Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol**

sintetizadas ribosomalmente, que controlan o inhiben el crecimiento de bacterias similares a las que las producen. Su mecanismo de acción es diverso, desde la formación de poros en la membrana hasta la inhibición de síntesis de ADN.

## 2 Antecedentes.

### 2.1 Pozol.

El pozol es una bebida refrescante no alcohólica (Figura 1) de origen Maya, consumida por comunidades indígenas del sureste de México desde la época prehispánica, como una parte importante de la dieta diaria [1]. Esta bebida es aun consumida en algunos estados como Chiapas, Tabasco, Oaxaca y Campeche.



Figura 1. Pozol [34]

### 2.1.1 Elaboración del pozol.

El proceso de elaboración del pozol inicia con la cocción del maíz en una solución aproximadamente al 1% de cal en exceso de agua. Una vez cocido el maíz se lava con agua para remover el pericarpio, al maíz cocido y lavado se le conoce como nixtamal. Los granos se muelen formando una masa, con la cual se forman bolas que se envuelven en hojas de plátano y se dejan fermentar a temperatura ambiente de 2 a 7 días o más. La masa fermentada se dispersa en agua y se consume. Al disolver en el agua, algunas partes fibrosas de la masa se sedimentan en la bebida, lo cual llevó a la población mestiza a realizar una modificación en la preparación del pozol añadiendo una segunda cocción de los granos del nixtamal para reducir así la parte fibrosa [2]. En la figura 2 se muestra un diagrama de flujo de la preparación del pozol.

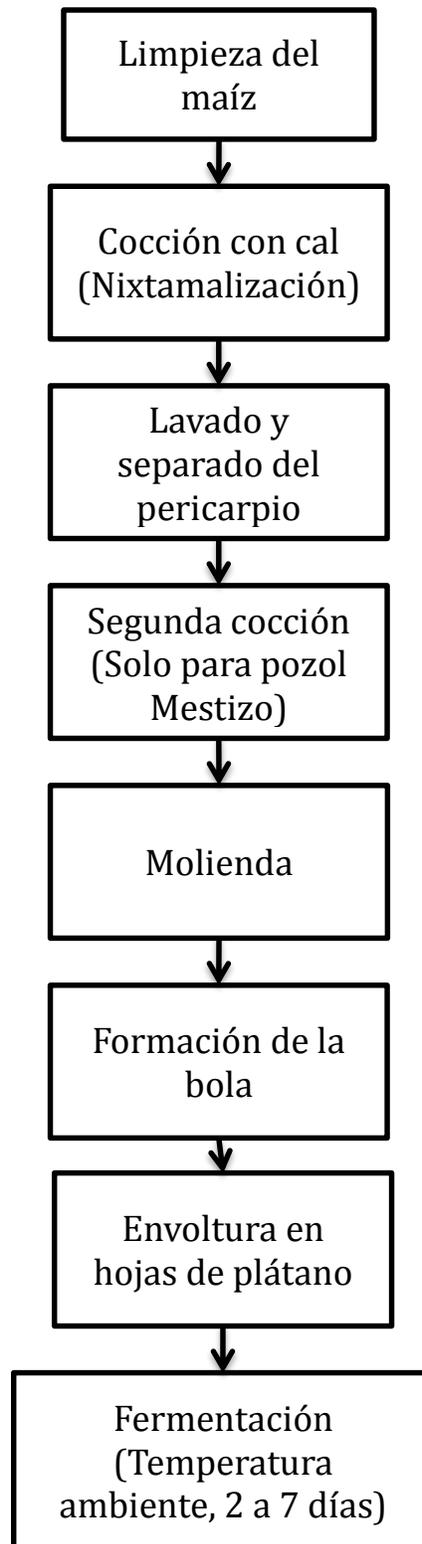


Figura 2. Diagrama de flujo de la preparación del pozol.

### 2.1.2 Microbiota del pozol.

El pozol posee una microbiota compleja, ya que está constituida por levaduras, hongos y bacterias [3]. Una parte importante de la microbiota del pozol son las BAL, las cuales se han encontrado y aislado durante todas las etapas de elaboración del pozol y además son las principales causantes de la acidificación del pozol. Dentro de este grupo de bacterias predominan bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* [4].

De acuerdo con Díaz-Ruiz et al. (2003), durante la fermentación del pozol se encuentran presentes bacterias ácido lácticas amilolíticas, las cuales utilizan el almidón como fuente de carbohidratos fermentables. De las 40 cepas más amilolíticas aisladas por Díaz-Ruiz et al (2003) se identificaron, por pruebas bioquímicas, ribotipificación y análisis de secuencia del gen rRNA 16S, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus infantarius*, *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus*. En la Tabla 2.1 se muestran especies de bacterias lácticas que se han identificado en el pozol.

Del total de las bacterias encontradas en el pozol, el 98% de ellas corresponde a BAL, y de acuerdo a un estudio previo de Ampe, et al (1999), los estreptococos representan de un 25% a un 50% de la población total activa en el pozol. Siendo este género el más abundante en el pozol, seguido del género *Lactobacillus* [30].

**Tabla 2.1. Bacterias ácido lácticas aisladas del pozol.**

<i>Streptococcus bovis</i> <sup>a,b</sup>	<i>Streptococcus macedonicus</i> <sup>b</sup>	<i>Streptococcus infantarius</i> <sup>b</sup>	<i>Lactobacillus fermentum</i> <sup>a</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i> <sup>a,c,d</sup>	<i>Lactobacillus pentosus</i> <sup>c</sup>	<i>Lactobacillus casei</i> <sup>a,d</sup>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <sup>a,d</sup>
<i>Lactobacillus alimentarius</i> <sup>d</sup>	<i>Lactobacillus fermentum</i> <sup>a</sup>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <sup>a</sup>	<i>Enterococcus saccharolyticus</i> <sup>a</sup>
<i>Weissella confusa</i> <sup>a</sup>	<i>Lactococcus lactis</i> <sup>b,d</sup>		

Reportados por: a) Ben Omar et al (2000); b) Díaz-Ruiz et al (2003); c) Ampe et al (1999); d) Escalante et al (2001).

En el pozol también existe evidencia de la presencia de bacterias mesófilas no lácticas como *Bacillus* y algunas enterobacterias, así como de mohos y levaduras [2]. Wacher et al. (1993) reportaron que a pesar de la acidificación de la masa de pozol, hasta valores de pH 4.1, existe la presencia de enterobacterias a lo largo de todo el proceso de fermentación, principalmente de *E. coli*. Esta resistencia a la acidez, principalmente a ácidos orgánicos y que se ha observado en algunas cepas de *E. coli*, *S. Typhimurium* y *Shigella*, se debe al estrés ácido, el cual es el efecto de la combinación biológica de bajos valores de pH y la presencia de ácidos orgánicos débiles presentes en el medio en que crecen dichas bacterias. Por lo tanto, estas bacterias han desarrollado resistencia a estos medios por la síntesis de proteínas inducidas por estrés [5]. El desarrollo y crecimiento de estas enterobacterias en el pozol se ve disminuida, más no inhibida, durante el proceso de la fermentación [2].

## 2.2 Bacterias Ácido Lácticas (BAL).

Las bacterias ácido lácticas son un grupo de microorganismos que producen como principal metabolito, al ácido láctico. Son organismos nutricionalmente exigentes y son capaces de hidrolizar péptidos de la leche. Estas bacterias además de contribuir en la biopreservación de los alimentos, mejoran las características sensoriales (sabor, olor, textura) y aumentan la calidad nutritiva [6].

Las BAL son un grupo de bacterias representadas por diversos géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común, en general son cocos o bacilos Gram-positivos, no esporulados, inmóviles, microaerofílicos o aerotolerantes. Son catalasa, oxidasa y benzidina negativos, no poseen citocromos, no son capaces de reducir nitratos y producen ácido láctico como principal producto de la fermentación de carbohidratos [7].

### 2.2.1 Metabolismo.

De acuerdo con Parra (2012) las BAL se pueden clasificar según al tipo de fermentación de azúcares, en homofermentativas y heterofermentativas, y de acuerdo con la temperatura de crecimiento en; mesófilos, temperatura de incubación 20-25°C y termófilos, temperatura de incubación 40-45°C.

### 2.2.1.1 Bacterias ácido lácticas homofermentativas.

El grupo de BAL homofermentativas está compuesto de *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*. Estas bacterias convierten 1 mol de glucosa en 2 moles de ácido láctico [8]. Estas bacterias poseen una enzima aldolasa y hexosa isomerasa, pero carecen de la enzima fosfoetolasa. La ruta metabólica de la glucosa a ácido láctico puede observarse en la Figura 3.

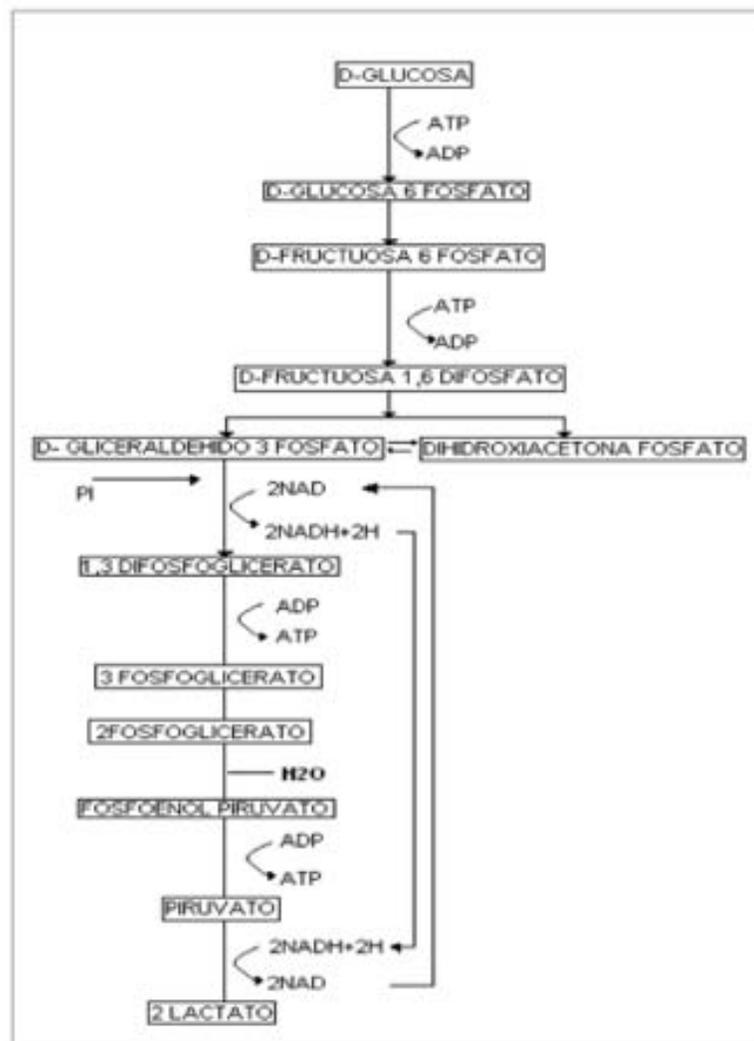


Figura 3. Fermentación homoláctica [8].

### 2.2.1.2 Bacterias ácido lácticas heterofermentativas.

Las BAL heterofermentativas solamente producen la mitad de ácido láctico que las homofermentativas, ya que fermentan 1 mol de glucosa para producir 1 mol de CO<sub>2</sub>, 1 mol de etanol y 1 mol de ácido láctico. Este grupo incluye a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* [8]. Estas bacterias siguen la vía metabólica de las pentosas o de la hexosa monofosfato como se observa en la figura 4.

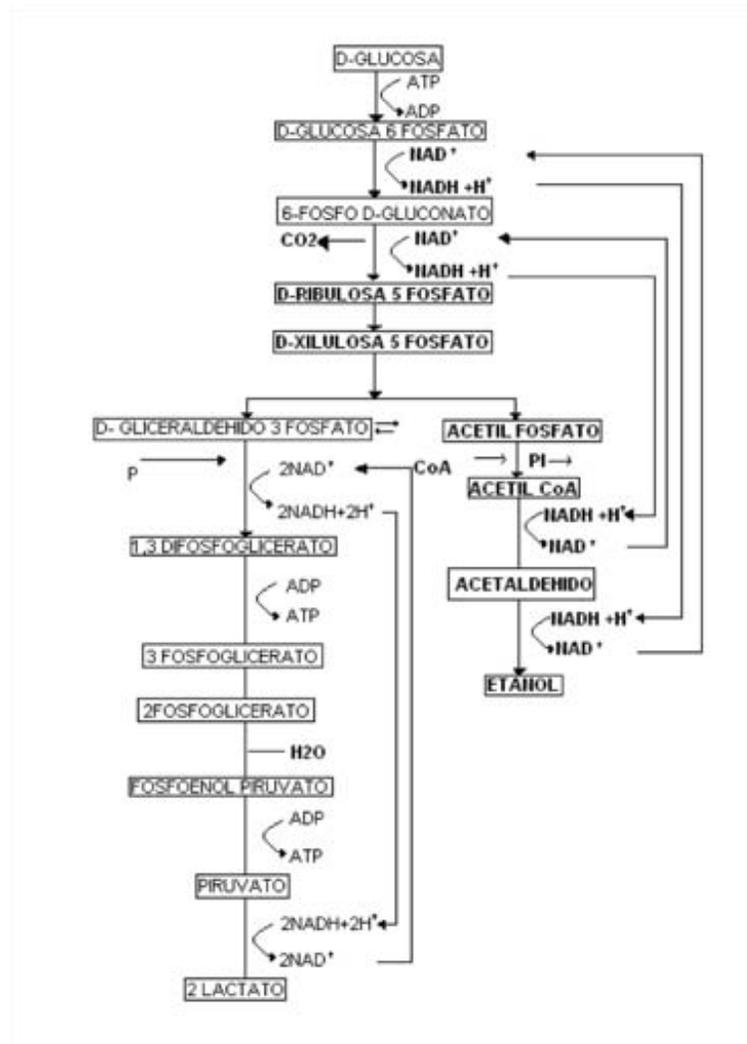


Figura 4. Fermentación heteroláctica [8].

## **Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol**

Las BAL durante su crecimiento producen diferentes metabolitos y sustancias que cumplen ciertas funciones, como el mejoramiento del valor nutritivo y de calidad o mejoramiento sensorial, en los alimentos. Los principales metabolitos de estas bacterias son: ácido propiónico (aprovechado en quesería), acetoina, diacetilo y acetaldehído (aprovechados en la producción de quesos y mantequillas) y ácido láctico (aprovechado en la fermentación y preservación de productos lácteos) [9]. Además de metabolitos, las BAL producen algunas sustancias antimicrobianas, las cuales ayudan a preservar la calidad e inocuidad de los alimentos fermentados inhibiendo el crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos o de descomposición, dichas sustancias pueden ser tan sencillas como el peróxido de hidrógeno hasta más complejas como las bacteriocinas [10].

### **2.2.2 *Streptococcus* spp.**

El género *Streptococcus* comprende bacterias Gram-positivas, de forma cocobacilar, que forman cadenas o pares (Figura 5), no tienen movilidad, no forman esporas y son catalasa negativas.

Fermentan carbohidratos para producir principalmente ácido láctico, sin producción de gas. En condiciones limitantes de glucosa también produce formiato, acetato y etanol.

La mayoría son bacterias aerotolerantes anaerobias.

Las cepas de *Streptococcus* crecen a una temperatura de 20-42 °C, siendo 37 °C la temperatura óptima de crecimiento [11].

El género *Streptococcus* se ha dividido en tres géneros, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus* [11]. Gracias al análisis de secuenciación de genes de rRNA 16S, se han clasificado mas de 65 especies, los cuales se han agrupado en varios grupos de especies, pyogenic, bovis, mutans, mitis, anginosus y salivarius.



Figura 5, Fotografía de *Streptococcus* tomada con microscopio electrónico de barrido [37]

#### 2.2.2.1 Grupo *Streptococcus bovis*.

Las especies pertenecientes al grupo *S. bovis* son bacterias de origen animal y humano. Dentro de este grupo se encuentran las especies: *Streptococcus alactolyticus*, *Streptococcus gallolyticus*, (subespecie *gallolyticus* y subespecie *macedonicus*), *Streptococcus infantarius*, *Streptococcus lutetiensis*, y *Streptococcus pasteurianus* [11].

Recientemente la especie *S. bovis* se ha dividido [11]:

- *S. gallolyticus* ssp. *gallolyticus*, que corresponde a la especie *S. bovis* biotipo I (Positivo a la fermentación de manitol).
- *S. gallolyticus* ssp. *pasteurianus*, que corresponde al biotipo II/2 de *S. bovis* (manitol negativo y  $\beta$ -glucoronidasa positivo).
- *S. infantarius*, que corresponde al biotipo II/1 de *S. bovis* (manitol negativo y  $\beta$ -glucoronidasa negativo).

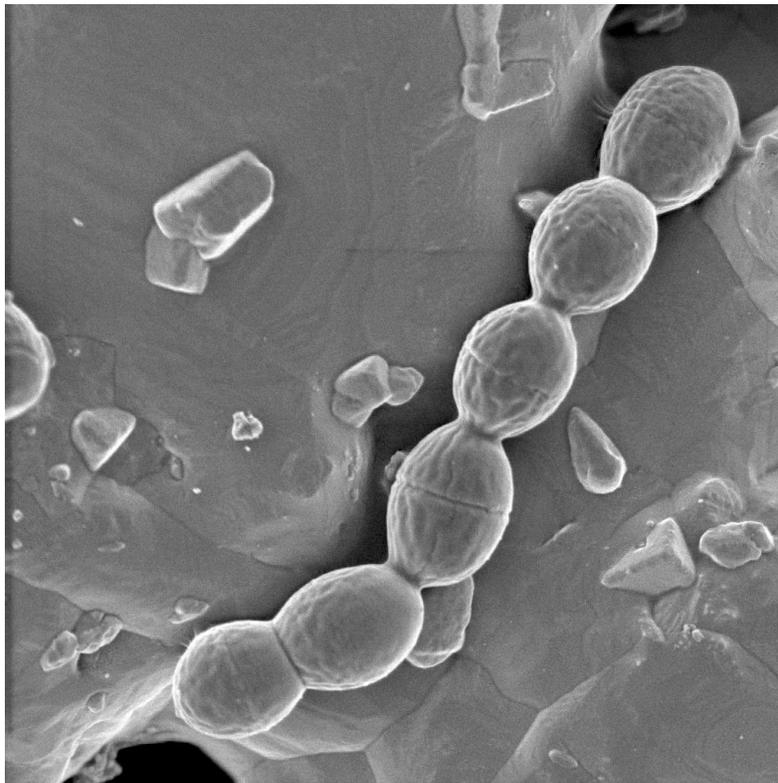
#### **2.2.2.2 *Streptococcus* en los alimentos.**

Estas bacterias, con excepción de *Streptococcus thermophilus*, no son utilizadas como cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos. Aunque la cepa *Streptococcus gallolyticus* ssp. *macedonicus* se ha encontrado naturalmente en varios alimentos fermentados, fue aislado originalmente de queso griego Kasseri fermentado de forma natural. Contribuye a la maduración de quesos, debido a su capacidad de hidrolizar la grasa de la leche y a su actividad proteolítica.

Esta especie no ha mostrado características potencialmente patógenas, y algunas cepas producen bacteriocinas. Esta especie también se ha encontrado en diversos quesos europeos.

### 2.2.3 *Lactococcus* spp.

Las bacterias del género *Lactococcus* son cocos Gram-positivos, no forman esporas y no tienen movilidad, crecen en pares o en cadenas cortas (Figura 6). Su metabolismo fermentativo produce ácido láctico. Sus requerimientos nutricionales son complejos, debido a que no pueden producir ciertos aminoácidos y vitaminas, su temperatura óptima de crecimiento es 30 °C, sin embargo, pueden crecer en temperaturas cercanas a los 10 °C, pero no a 45 °C. Esta especie, a diferencia de otras BAL, solo metaboliza L-ácido láctico [12].



1µm 18000X

Figura 6, Fotografía de *Lactococcus lactis* tomada con microscopio electrónico de barrido [38]

## Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol

El género *Lactococcus* tiene cinco grandes especies, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus raffinolactis* y *Lactococcus lactis* (subespecie *lactis*, subespecie *cremoris* y subespecie *hordniae*). Estas cepas, además de crecer a temperaturas mayores a 40 °C y en concentraciones mayores al 4% de NaCl, producen ácido a partir de lactosa, manitol y rafinosa [12]. Algunas cepas de *Lactococcus* pueden hidrolizar el almidón [28].

### 2.2.3.1 *Lactococcus* en los alimentos.

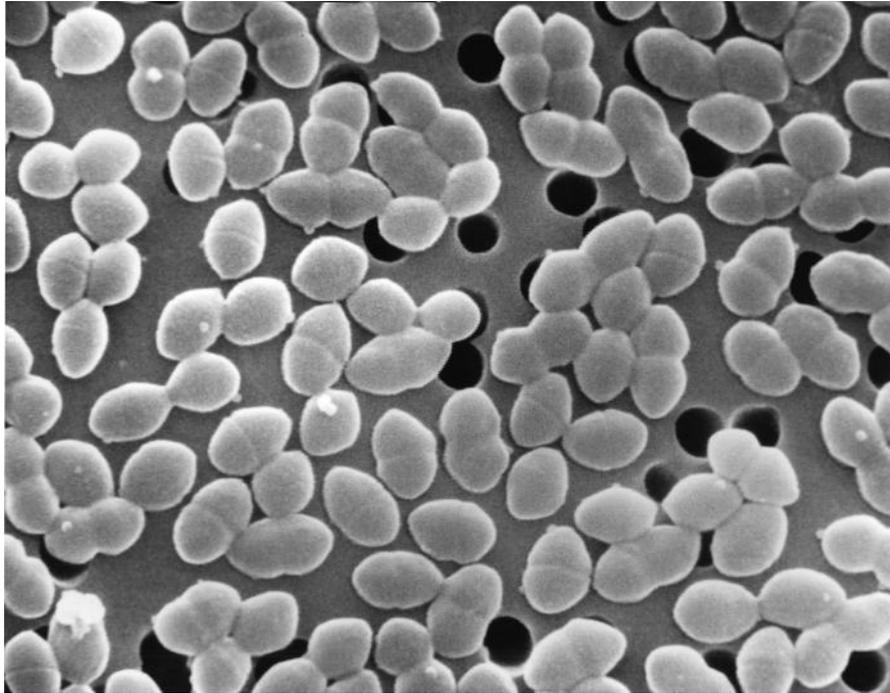
Estas bacterias son utilizadas para la elaboración de productos lácteos, principalmente, las especies *L. lactis ssp lactis* y *L. lactis ssp. cremoris*. Los lactococos son utilizados como cultivos iniciadores únicos o dentro de mezclas de cultivo iniciador, frecuentemente junto con otras bacterias ácido lácticas. Estos iniciadores ayudan a preservar los alimentos por la producción de bacteriocinas además del ácido láctico.

### 2.2.4 *Enterococcus* spp.

Las bacterias pertenecientes a este género son cocos Gram-positivos, no forman espora, catalasa negativas, oxidasa negativas, crecen en pares o cadenas cortas (Figura 7), son anaerobios facultativos y tienen metabolismo fermentativo. Su crecimiento se da en rangos de temperatura entre 5 °C y 50 °C, con un óptimo de 35-37 °C.

## Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol

Las cepas de *Enterococcus* se han encontrado en el medio ambiente, animales y humanos. Se alojan principalmente en el tracto gastrointestinal de animales, aunque se han aislado también de plantas, insectos, agua, aves y humanos en el tracto urinario y cavidad oral [13].



**Figura 7, Fotografía de *Enterococcus* sp. tomada con microscopio electrónico de barrido [39].**

### **2.2.4.1 *Enterococcus* en los alimentos.**

Los *Enterococcus* pertenecen a la microbiota natural de animales que usan para la obtención de alimentos tales como leche, productos lácteos, carne y salchichas fermentadas, debido a su resistencia a los procesos de pasteurización y a su adaptabilidad a diferentes sustratos y condiciones de crecimiento.

## Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol

En productos lácteos principalmente se han encontrado diferentes especies, principalmente *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus italicus* [13]. En algunos casos, estas bacterias son deseables en el producto terminado.

Estas bacterias también se han asociado a partir de productos cárnicos y carne cruda, pollo, piel de cerdo y en carnes cocinadas y procesadas.

Los enterococos se han utilizado en la industria de los alimentos fermentados por años, principalmente en la industria de lácteos, debido a su capacidad de hidrolizar grasas y proteínas, además de contribuir al sabor y textura de los alimentos.

Se utilizan como cultivos iniciadores para favorecer la maduración de quesos y como cultivos protectores, esto se debe a la capacidad de algunas cepas de producir bacteriocinas, demostrando efectos inhibitorios contra *Listeria monocytogenes* y *S. aureus* [13].

### 2.3 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son sustancias producidas por bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales controlan el crecimiento de poblaciones microbianas en alimentos fermentados, lo cual le confiere al alimento una mayor vida de anaquel e inocuidad. Las bacteriocinas, producidas por las BAL. Son péptidos antimicrobianos, sintetizados ribosomalmente, que tienen actividad contra otras bacterias [14]. Las bacteriocinas producidas por BAL, incluyendo las de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*,

*Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* y *Streptococcus* han sido las más estudiadas debido a que podrían ser potencialmente usados para la preservación y seguridad de los alimentos así como en medicina humana y veterinaria [15].

### **2.3.1 Características de las bacteriocinas.**

Las bacteriocinas tienen generalmente bajos pesos moleculares, raramente sobrepasan los 10 kDa, y pueden ser degradadas fácilmente por enzimas, tales como las proteasas del tracto gastrointestinal de los mamíferos [22]. Son moléculas catiónicas anfipáticas debido al contenido alto de residuos de lisina y arginina, son estables al calor y son péptidos permeabilizadores de la membrana [31]. La estructura primaria de las bacteriocinas tiene, usualmente, una gran proporción de residuos hidrofóbicos y su estructura secundaria está compuesta por alfa hélices (Figura 8), lo cual les da una estructura compacta y estable que les permite mantener su actividad después de un tratamiento térmico o de la actividad de una proteasa [32].

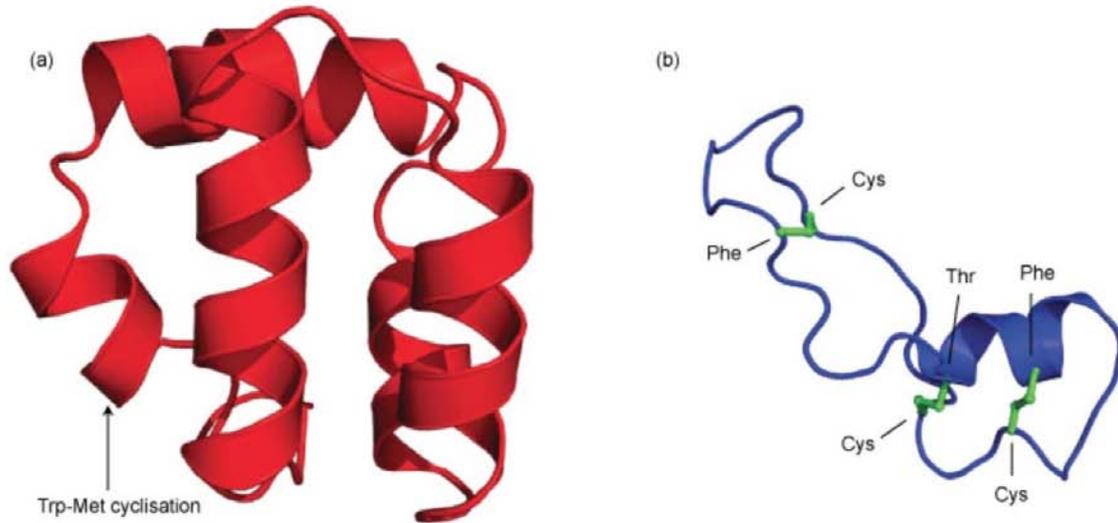


Figura 8. Estructura de dos bacteriocinas a) AS-48 b) Subtilocina A. [32]

### 2.3.2 Clasificación de las bacteriocinas.

Existen diferentes clasificaciones para las bacteriocinas producidas por BAL, los primeros intentos de clasificarlas se basaban en su resistencia al calor, sensibilidad a tripsina y grado de reactividad cruzada entre diferentes combinaciones de bacteriocinas [16].

Las BAL, que por sus características y a que han estado presentes en la dieta humana, desde hace muchos años, y no han causado algún tipo de alteración a la salud de los consumidores, son consideradas GRAS (Generally Recognized As Safe/Generalmente reconocida como seguro) por la FDA (Food and Drug Administration) [17].

Una clasificación hecha por Klaenhammer (1993) divide a las bacteriocinas en 4 [18]:

## **Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol**

Clase I o lantibióticos (Bacteriocinas modificadas post traducción), definidos como pequeños péptidos activos de membrana (<5 kDa) que contienen los aminoácidos lantionina o  $\beta$ -metil lantionina (de ahí el nombre de lantibióticos) y residuos deshidratados.

Clase II (Péptidos no modificados), definida como pequeños péptidos activos de membrana estables al calor, sin contenido de lantionina. Caracterizados por la presencia de un sitio Gly-Gly en el precursor de la bacteriocina, presencia de hélices anfífilas con cantidades variables de hidrofobicidad y estabilidad al calor de moderada a alta. Esta a su vez se divide en 3 subgrupos:

Subclase IIa.

Subclase IIb.

Subclase IIc.

Clase III (Proteínas no modificadas), proteínas grandes, termolábiles, algunas con actividad enzimática.

Clase IV, proteínas complejas con uno o más grupos de lípidos o carbohidratos.

Esta clasificación ha sido retomada y modificada por varios autores. Rea et al. (2011) presentan una clasificación actualizada con base en los diferentes esquemas de clasificación anteriores.

Clase I: Bacteriocinas modificadas post traducción. Este grupo se divide en:

Clase Ia: Lantibióticos.

Clase Ib: Labirintopéptidos, nombrados en consecuencia de su estructura de

## **Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol**

“laberinto”, se distinguen por la presencia de labionina, un aminoácido modificado post traducción.

Clase Ic: Sactibioticos.

Clase II: Bacteriocinas no modificadas. Este grupo se divide en cuatro subgrupos.

Clase IIa: Bacteriocinas similares a pediocina.

Clase IIb: Bacteriocinas no modificadas de dos péptidos.

Clase IIc: Bacteriocinas circulares.

Clase IId: Bacteriocinas no similares a pediocina, sin modificar, lineales.

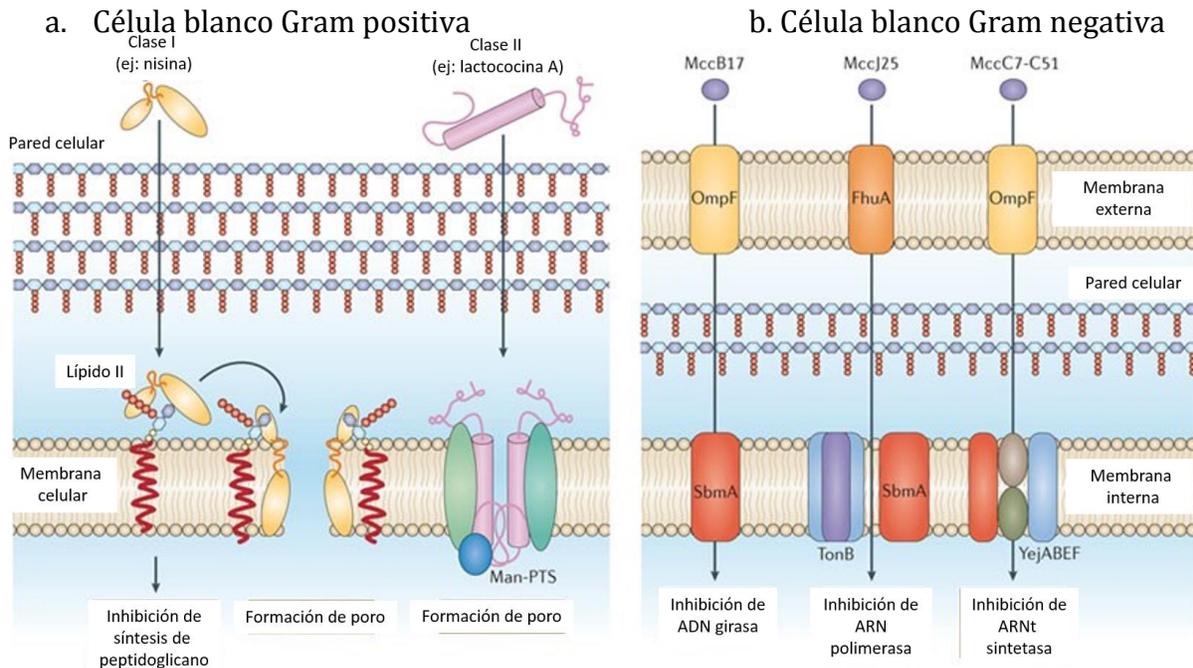
Bacteriolisinas, anteriormente Bacteriocinas Clase III,

### **2.3.3 Mecanismo de acción de las bacteriocinas.**

La acción de las bacteriocinas depende de la composición de la membrana citoplasmática, la estructura y la expresión de una proteína además de la composición química del medio [19]. Las bacterias Gram-positivas poseen un alto contenido de lípidos aniónicos en su membrana, en este caso, las bacteriocinas se unen a la membrana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y la carga neta positiva de las bacteriocinas, localizada en uno de sus extremos, formando poros en la membrana bacteriana, la cual se permeabiliza y la célula comienza a perder iones y algunos metabolitos, los cuales son fundamentales para su desarrollo y supervivencia, causando, eventualmente, la muerte bacteriana (Figura 9). Este mecanismo de acción corresponde principalmente a la nisina y a la lactocoquinina A de *Lactococcus lactis* [43]. Otro mecanismo de acción corresponde a la mersacidina que

## Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol

se une al Lípido II, inhibiendo la producción de peptidoglucano [43]. La inhibición de la síntesis del ADN se considera un mecanismo de acción secundario de las bacteriocinas [20]. La inhibición de síntesis de ADN y ARN es considerado un mecanismo de acción en bacterias Gram negativas [33].



Nature Reviews | Microbiology

**Figura 9. Mecanismo de acción de bacteriocinas frente a bacterias Gram positivas (a) y frente a Gram negativas (b) [33].**

La acción de las bacteriocinas está relacionada con el contenido de cistina, de acuerdo con ello se establecen tres grupos [21]:

Bacteriocinas con estrecho rango de acción, restringido a microorganismos de la misma especie.

Bacteriocinas con rango intermedio, inhiben BAL y algunas Gram-positivas.

Bacteriocinas con amplio rango de acción, inhiben una gran variedad de bacterias Gram-positivas.

La aplicación de las bacteriocinas en la preservación de los alimentos ha sido ampliamente estudiada, especialmente en productos de huevo, vegetales y cárnicos [22]. Las bacteriocinas pueden ser aplicadas de forma pura o cruda o mediante el uso de un producto previamente fermentado con una cepa productora de bacteriocina, o incorporando una cepa productora [22]. Muchos alimentos fermentados que se han estudiado contienen una gran cantidad de BAL productoras de bacteriocinas, entre estos productos se encuentra el pozol. En trabajos previos (Tavera, 2010) se determinó la capacidad de BAL, pertenecientes a géneros diversos y aisladas del pozol, de producir sustancias similares a bacteriocinas.

#### **2.3.4 Bacteriocinas representativas de BAL.**

De las bacterias ácido lácticas productoras de compuestos similares a bacteriocinas, las de mayor importancia son los *Lactobacillus* debido a su potencial biotecnológico, ya que podría ser utilizado como un cultivo protector para mejorar la seguridad de los alimentos [46].

Las bacteriocinas más estudiadas son las producidas por algunas especies de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, entre ellas la nisina, pediocina, plantaricina, lactococcina, lactacina, helveticina, sakacina y mesentericina [19]. Y se ha encontrado que otros géneros de BAL producen sustancias similares a bacteriocinas [46].

El género *Streptococcus* también es productor de bacteriocinas o de sustancias similares a bacteriocinas. *Streptococcus thermophilus*, al ser una de las bacterias predominantes en la mayoría de los cultivos iniciadores para la fabricación de productos lácteos fermentados [47], ha sido de las más estudiadas dentro de ese género. Se ha observado la actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* y se han purificado, secuenciado y caracterizado péptidos antimicrobianos producidos por *S. thermophilus*. Estos péptidos (Termofilinas) han demostrado actividad antimicrobiana de amplio espectro [47].

Otra bacteria del género *Streptococcus* que produce bacteriocinas es el *S. salivarius* que se encuentra de forma natural en la superficie oral de personas saludables. Produce principalmente Salivaricina A2 y salivaricina B [48], dos péptidos antimicrobianos que inhiben bacterias Gram-positivas como *Streptococcus anginosus*, *Eubacterium saburreaum* y *Micromonas micros* [48]. *S. mutans*, relacionada con la formación de la placa denta, produce un péptido antimicrobiano (Mutacina) capaz de inhibir el crecimiento de algunos estreptococos relacionados a la formación de caries [49].

## **2.4 Bacterias Patógenas.**

Las bacterias patógenas son aquellas bacterias que pueden causar enfermedades en animales, plantas y humanos, ya sea por contacto directo, por infección de heridas, por

la ingestión de alimentos contaminados o por presencia de toxinas en alimentos. Estos microorganismos patógenos son los causantes de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's), y aún en la actualidad siguen causando impacto debido a la gran incidencia de enfermedades causadas por estos patógenos, en especial las causadas por *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* [23, 24].

#### **2.4.1 *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium.**

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es una bacteria Gram-negativa (Figura 10), de forma bacilar, anaerobia facultativa, móvil, es catalasa negativa, oxidasa negativa, produce gas a partir de glucosa, es capaz de reducir los nitratos, no requiere de NaCl para su crecimiento, es capaz de utilizar citrato como fuente de carbono, produce sulfuro de hidrógeno y descarboxila la lisina y la ornitina. *Salmonella* puede fermentar glucosa, pero no lactosa ni sacarosa. Su crecimiento es óptimo entre 35 y 37°C, presentando un amplio crecimiento entre 5 y 47°C, aunque requieren de NaCl para su crecimiento, puede ser inhibida por concentraciones de NaCl entre 3 y 4%, su pH óptimo de crecimiento es entre 6.5 y 7.5, mostrando un crecimiento amplio entre 4.5 y 9.0 y requiere de aw superior a 0.94. Es sensible al calor, por lo que no sobrevive a temperaturas de pasteurización, pero es resistente a la congelación y al secado. Además, es capaz de desarrollarse en una gran variedad de alimentos sin afectar sus características sensoriales [25].



Figura 10, Fotografía de tinción de Gram de *Salmonella Typhimurium* [36].

El principal habitat de *Salmonella* es el tracto gastrointestinal de animales domésticos y salvajes, además se ha logrado aislar de agua, suelo y aguas residuales y a partir de alimentos de origen animal como pollo, pavo, cerdo, leche, huevos y carne de res. También se ha aislado de alimentos de origen vegetal como nueces, jitomates y diversas hortalizas. *Salmonella enterica* es considerada una de las principales causas de gastroenteritis y bacteremia en el mundo, la epidemiología de *Salmonella enterica* se debe principalmente a contaminación fecal directa o indirecta [25].

*Salmonella Typhimurium* ha generado resistencia al tratamiento con antibióticos y tiene la capacidad de causar salmonelosis a diferentes tipos de hospederos, generando un cuadro clínico que incluye fiebre, dolor abdominal, diarrea, náusea y vómito.

#### 2.4.2 *Listeria monocytogenes*.

El género *Listeria* comprende bacterias de forma bacilar de entre 1 a 2  $\mu\text{m}$  de longitud (Figura 11), son Gram-positivas, no esporuladas, anaerobias facultativas, presentan movilidad dando tumbos o volteretas, manifestada usualmente a temperaturas menores a 30°C, pero no a 37°C. *Listeria* es capaz de crecer en rangos de temperatura entre 0 y 45°C con una óptima de 30 a 35 °C, y en intervalos de pH entre 4.6 y 9.2, requiere de un aw mínimo de 0.90, y puede crecer en concentraciones de 10% de NaCl. Es resistente a la congelación, al secado y al calor, lo cual dificulta el control de esta bacteria en ambientes asociados a alimentos [26]. De acuerdo a Nieto-Lozano et al (2002) algunas bacteriocinas producidas por BAL inhiben a *L. monocytogenes*.

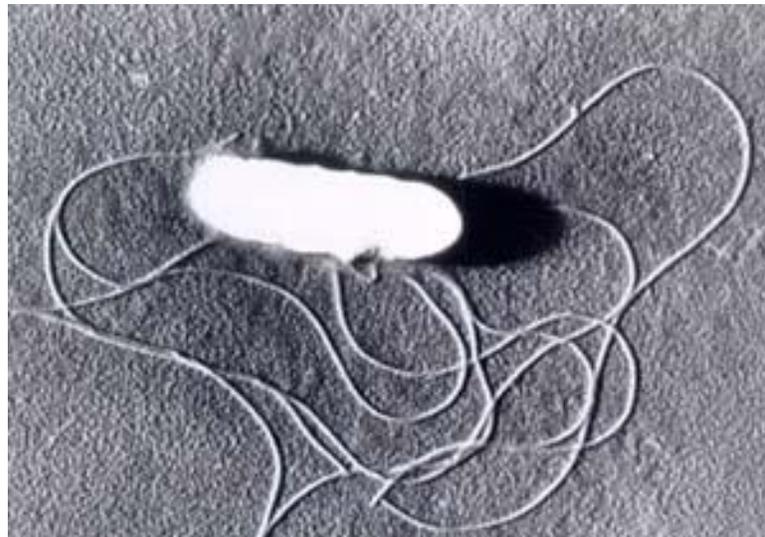


Figura 11, Fotografía con microscopio electrónico de barrido de *Listeria monocytogenes* [35].

## **Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol**

Listeriosis es el término genérico para una serie de síndromes causados por infección con *L. monocytogenes*, la mayor parte de las infecciones por *Listeria* son causadas por consumo de alimentos contaminados. Esta enfermedad tiene un alto rango de mortalidad (20-30%) en individuos inmunocomprometidos, mujeres embarazadas, niños y ancianos [27].

### 3 Hipótesis.

Las bacterias ácido lácticas liberarán sustancias antimicrobianas al medio, posibles bacteriocinas.

Las cepas aisladas del pozol del género *Streptococcus* al ser las de mayor presencia durante la fermentación, y al estar relacionadas con otras cepas productoras de bacteriocinas, son posibles productoras de bacteriocinas o sustancias similares a bacteriocinas, inhibiendo así a bacterias patógenas de importancia en la industria de los alimentos, como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Typhimurium*.

#### 4 Objetivo.

Objetivo general:

Determinar la actividad antimicrobiana de las posibles bacteriocinas producidas por las cepas de *Streptococcus* spp. aisladas del pozol.

Objetivos particulares:

- Observar mediante el método de difusión en agar, qué cepas de *Streptococcus* tienen actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*.
- Estudiar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las bacterias ácido lácticas del género *Streptococcus*, posibles productoras de bacteriocinas, después de concentrar, ajustar pH y someter a un tratamiento térmico.
- Estudiar la interacción entre las bacterias ácido lácticas del género *Streptococcus* aisladas del pozol, productoras de sustancias similares a bacteriocinas y algunas bacterias patógenas de importancia en alimentos mediante una prueba de reto.

## 5 Metodología.

### 5.1 Microorganismos.

#### 5.1.1 Bacterias ácido lácticas

Las cepas de BAL utilizadas para la realización del trabajo experimental pertenecen a la colección de bacterias aisladas del pozol. Se usaron 37 cepas aisladas en un estudio previo, Díaz-Ruiz et al (2003), y caracterizadas previamente como *Streptococcus* spp., y conservadas en glicerol a -70 °C (Tabla 5.1).

Las 37 cepas, la mayoría se encontraron relacionadas con las especies *S. bovis* y *S. infantarius*, con excepción de la cepa A45201, que se identificó como *Streptococcus macedonicus*, la cepa A45212, que se caracterizó como *Lactococcus lactis*, y la cepa A36202, que se caracterizó como *Enterococcus sulfureus*.

Además de las 37 cepas, se utilizó la cepa 1, *Streptococcus* sp. aislada del pozol en otro estudio (Tavera, 2010) y productora de posibles bacteriocinas, como control positivo para las pruebas de difusión en agar.

Tabla 5.1. Cepas a utilizar, aisladas del pozol por Díaz-Ruiz et al (2003)

15133	25113	A56203	15319
15430	25148	A57103	A46112
15220	25139	A57206	A46113
A46116	25233	A45208	A47212
25245	25421	A37103	A56208
25318	25137	A37202	A56202
25109	15125	A36111	A45201
15124	15414	A12203	A45226
A56201	25124	A56101	A45212
A36202			

### 5.1.2 Bacterias patógenas, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Typhimurium* (Microorganismos sensibles).

En un estudio previo (Tavera, 2010) se observó que algunas bacterias aisladas del pozol producían sustancias similares a bacteriocinas que inhibían a *Listeria monocytogenes* y a *Salmonella Typhimurium*, por lo que se decidió tomar esas dos bacterias para este estudio, y poder observar si las cepas de *Streptococcus sp.* son capaces de producir alguna posible bacteriocina que inhiba a dichas bacterias.

## 5.2 Reactivación y conservación.

### 5.2.1 Reactivación y conservación de BAL

Para la reactivación de las cepas, se tomaron 50  $\mu$ L del inóculo conservado en congelación, y se colocaron en 5 mL de caldo APT. El medio inoculado se incubó a una temperatura de 30 °C durante 24 horas. Posteriormente se realizó una conservación a mediano plazo en medio APT (BD, Difco™) sólido, tomando una asada del inóculo activo y sembrando con la técnica de cuadrante radial o estriado por agotamiento, esto para obtener colonias puras y aisladas, dicho medio se incubó a 30 °C durante 24 horas (Figura 12). Para comprobar la pureza de las colonias aisladas se utilizó la tinción de Gram.

Para la conservación a largo plazo se tomó con un asa una colonia crecida en el medio APT sólido y se inoculó en 5 mL caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe, BD, Difco™), dicho medio se incubó a 30 °C durante 24 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, se procedió a separar en tubos Eppendorf, el inóculo activo para así centrifugarlo y obtener un pellet de las células, el cual se separó del sobrenadante y se lavó con solución salina al 0.8%. Una vez lavado el pellet, se centrifugó nuevamente, y se separó del sobrenadante. El pellet se resuspendió en 1.5 mL de caldo MRS-glicerol (20%) en criotubos, esta mezcla se conservó en congelación a -70 °C (Figura 13).

Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol

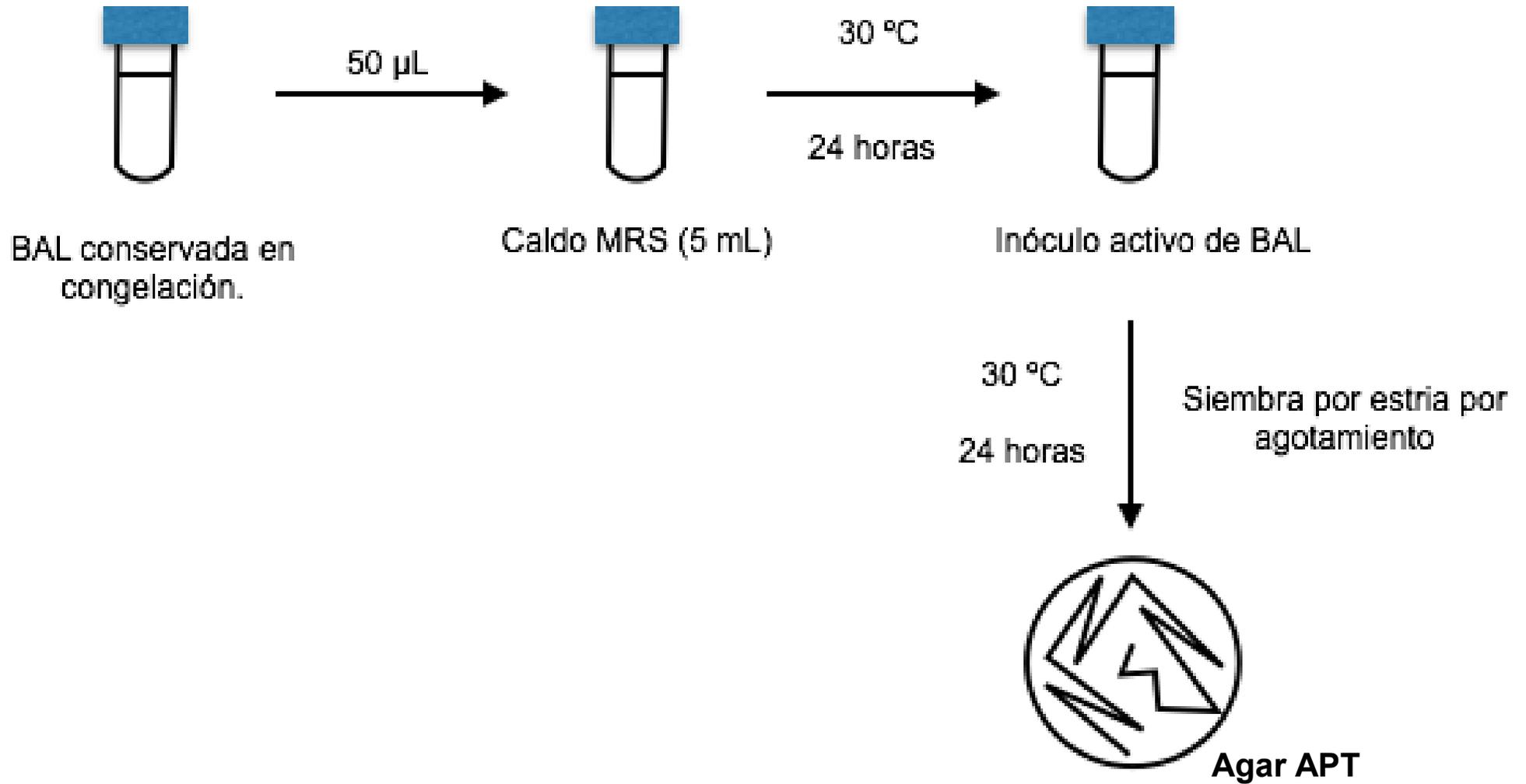


Figura 12. Reactivación de BAL y conservación a mediano plazo.

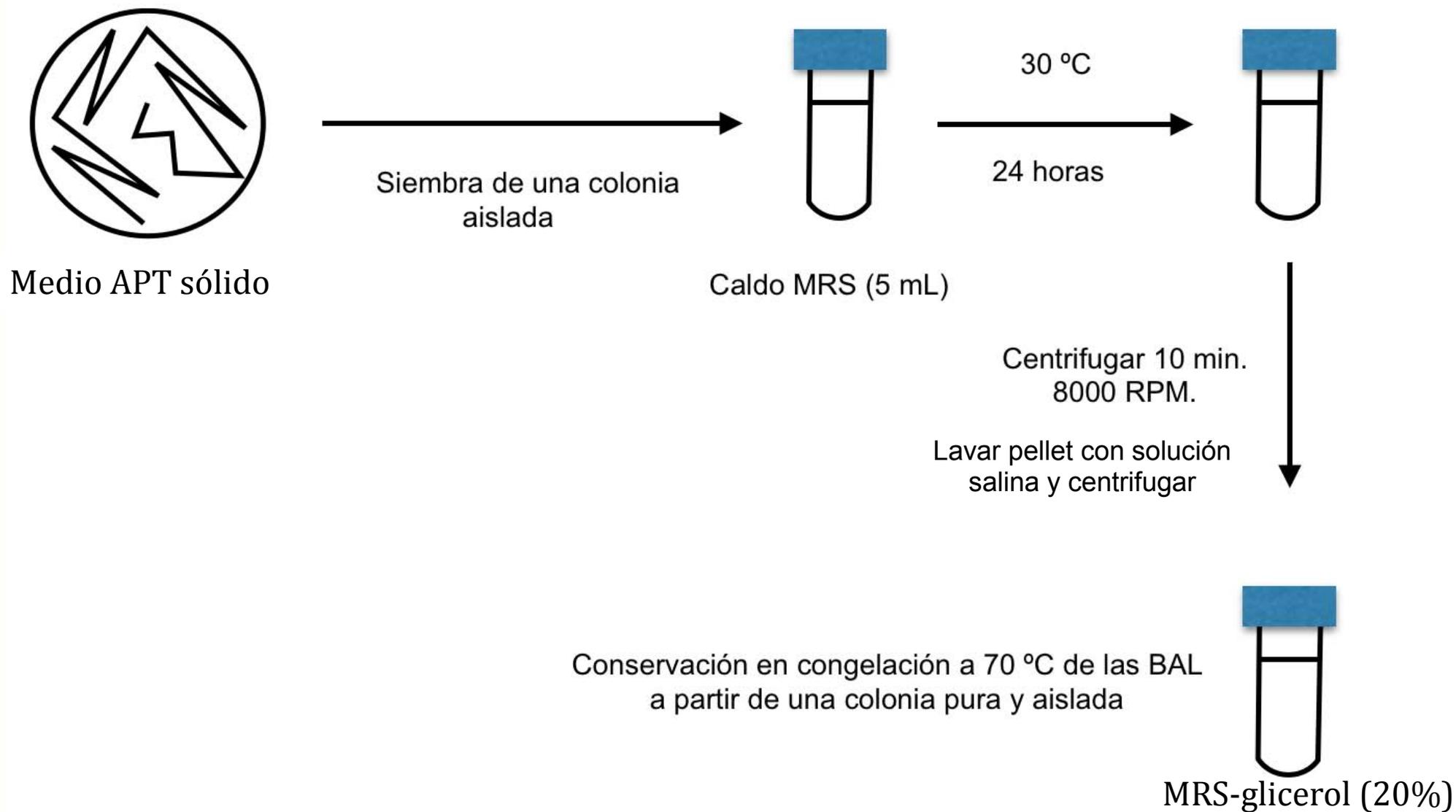


Figura 13. Conservación a largo plazo de BAL.

### 5.2.2 Reactivación y conservación de bacterias patógenas.

Para la reactivación de las bacterias patógenas se tomaron 50 µL del inóculo conservado en congelación, y se depositaron en 5 mL de caldo BHI (Infusión cerebro corazón, DB, Difco™), se incubó a 37 °C durante 24 horas. Para conservar a mediano plazo se tomó una asada del inóculo activo y se sembró en medio BHI sólido con el método de estriado por agotamiento y se incubó durante 24 horas a 37 °C (Figura 14). Una vez obtenidas las colonias aisladas, se verificó la pureza de ellas utilizando la tinción de Gram.

Para conservar a largo plazo se tomó una asada de una colonia del medio BHI sólido y se colocó en 5 mL de caldo BHI, este se incubó a 37 °C durante 24 horas, y se siguió la metodología descrita en la sección 5.2.1, utilizando medio BHI-glicerol (20%) en lugar de MRS-glicerol (20%) (Figura 15).

Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol

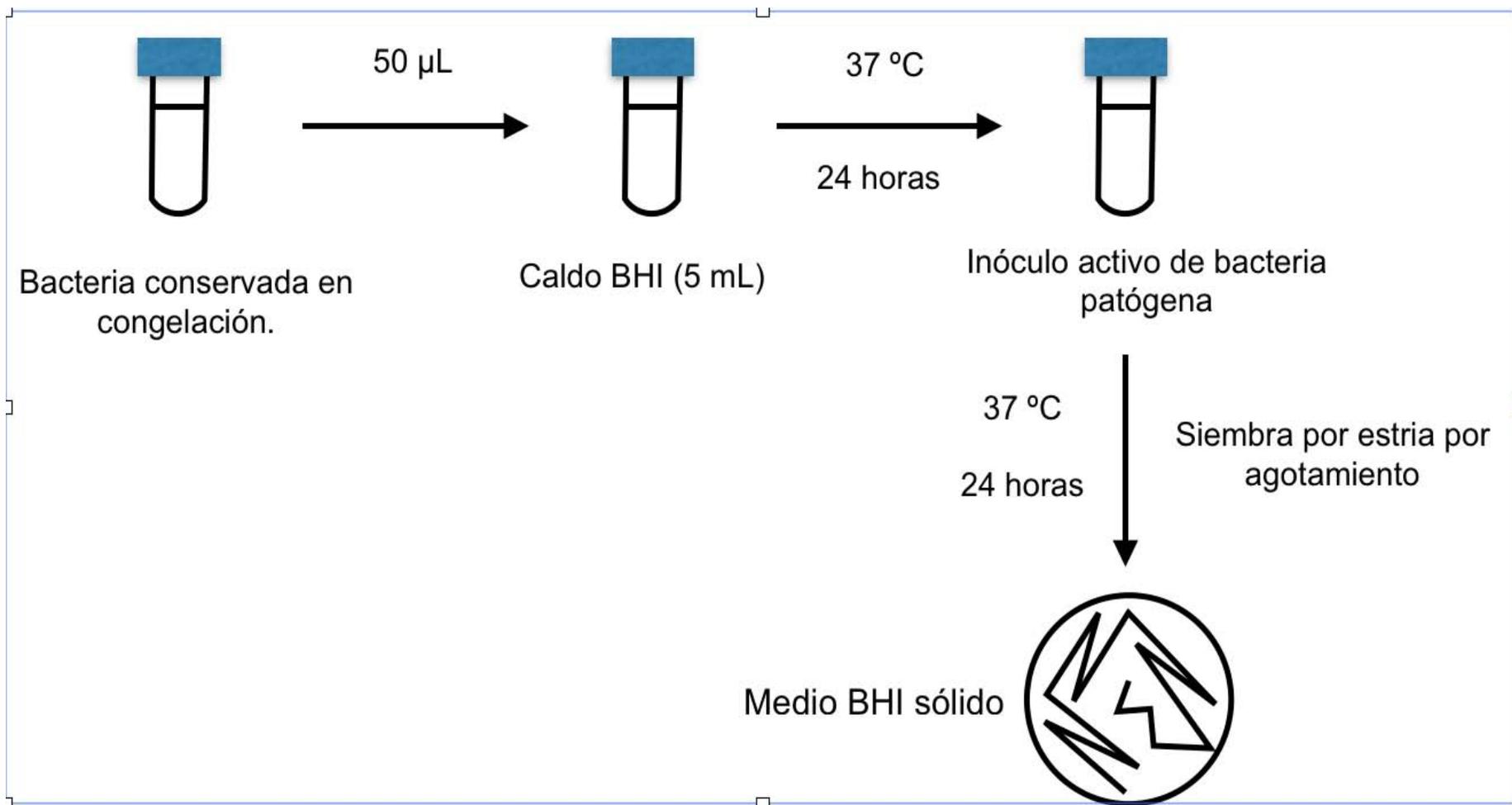


Figura 14. Reactivación y conservación a mediano plazo de cepas patógenas.

Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol

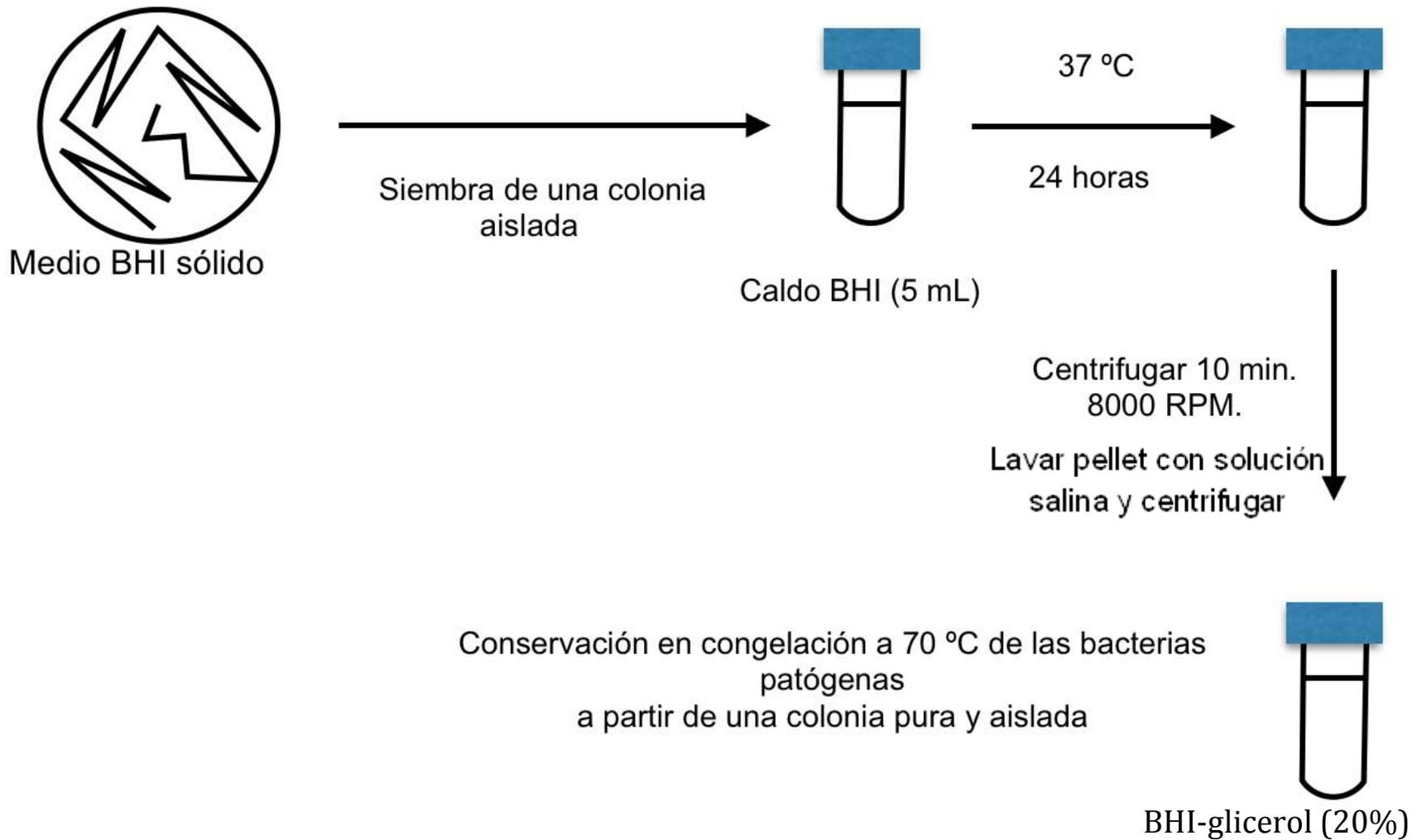


Figura 15. Conservación a largo plazo de cepas patógenas.

### 5.3 Prueba de difusión en agar.

#### 5.3.1 Preparación de medio Infusión cerebro-corazón tamponado (BHI-T), placas.

Para preparar el medio BHI-T se disolvieron los componentes descritos en la tabla 5.2 en 1L de agua destilada. El medio se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos, y posteriormente se colocaron aproximadamente 15 mL del medio en placas. Incubándolas a 30 °C durante 24 horas para comprobar la esterilidad del medio.

**Tabla 5.2 Componentes del medio BHI-T sólido en placa.**

Componente	g/L
Fosfato de sodio monobásico	4.3
Fosfato de sodio dibásico	10
Agar bacteriológico	17
BHI (DB, Difco™)	37
pH: 7	

#### 5.3.2 Preparación de medio BHI-T para sobrecapa.

El medio para la sobrecapa se preparó disolviendo los componentes mencionados en la tabla 5.3 en 1L de agua destilada. Una vez disueltos completamente en el agua, se colocaron 9 mL en tubos de ensaye con tapón de rosca y se esterizaron a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente se incubaron durante 24 horas a 30 °C para comprobar su esterilidad.

**Tabla 5.3. Componentes del medio BHI-T para sobrecapa.**

Componente	g/L
Fosfato de sodio monobásico	4
Fosfato de sodio dibásico	10
Agar bacteriológico	8
BHI (DB, Difco™)	15
pH: 7	

### **5.3.3 Preparación de placas para realizar la prueba de difusión en agar.**

Para montar las placas de BHI-T, sobre las placas de medio sólido (BHI-T) se colocaron, en condiciones asépticas, los cilindros de vidrio esteriles para formar los pozos. Una vez colocados, se vertió el medio de sobrecapa (BHI-T), previamente fundido aproximadamente a 90 °C y atemperado aproximadamente a 37 °C. La bacteria patógena se inoculó en la sobrecapa colocando 40 µL del inóculo activo, el cual se reactivó siguiendo la metodología descrita en la sección 5.2.2.

Al enfriar la sobrecapa y estar sólida, se retiraron los cilindros de vidrio, quedando formados unos pozos para depositar en ellos los sobrenadantes de las bacterias ácido lácticas.

#### **5.3.4 Obtención de los sobrenadantes de las BAL.**

Para obtener los sobrenadantes de las BAL, se activaron las cepas tomando 50  $\mu$ L del inóculo conservado en congelación y depositándolos en 5 mL de caldo MRS, incubándolo a 30 °C durante 24 horas.

El inóculo activo se colocó en tubos Eppendorf, 1.5 mL por tubo, y se centrifugó durante 10 minutos a 8000 RPM (Centrífuga Eppendorf 5417R). Esto para separar las células del sobrenadante, el cual contiene las bacteriocinas y demás compuestos producidos por las BAL. Una vez centrifugado, se separó el sobrenadante, colocándolo en viales con tubo de rosca, para conservarlos en refrigeración a 4 °C.

#### **5.3.5 Determinación de actividad antimicrobiana.**

En cada placa se colocaron 5 cilindros de vidrio y se vertió la sobrecapa previamente inoculada (sección 5.3.3). Una vez solidificada la sobrecapa, se retiraron los cilindros y se depositaron 80  $\mu$ L del sobrenadante de la cepa BAL a ensayar. De los cinco pozos, tres se utilizaron para colocar el sobrenadante de la cepa a ensayar, uno para el sobrenadante del control positivo (cepa 1) y uno para un control negativo (caldo MRS estéril) (Figura 16). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas, después del crecimiento de la bacteria patógena, para una prueba positiva, se observó la formación de un halo (Figura 17), al cual se le midió el radio de inhibición de cada pozo y se reportó en cm.

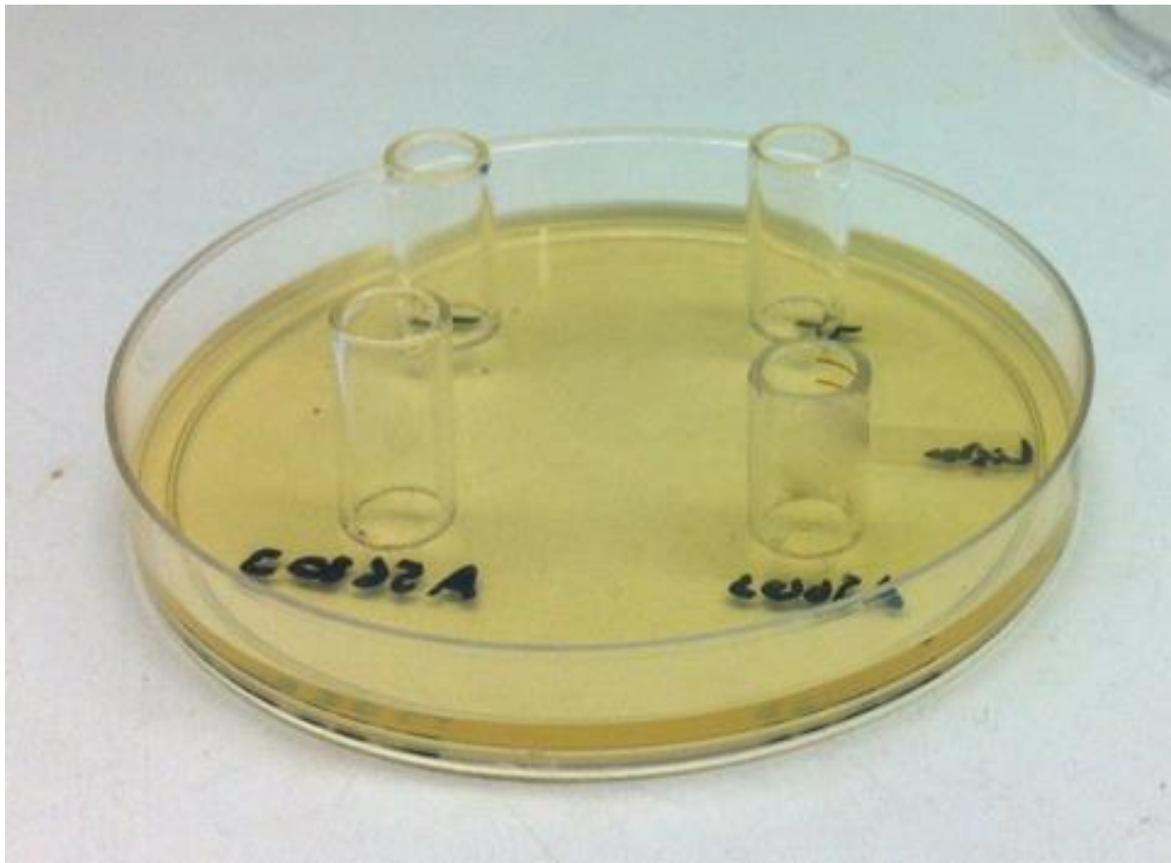


Figura 16. Colocación de cilindros para formar los pozos en la placa BHI-T.

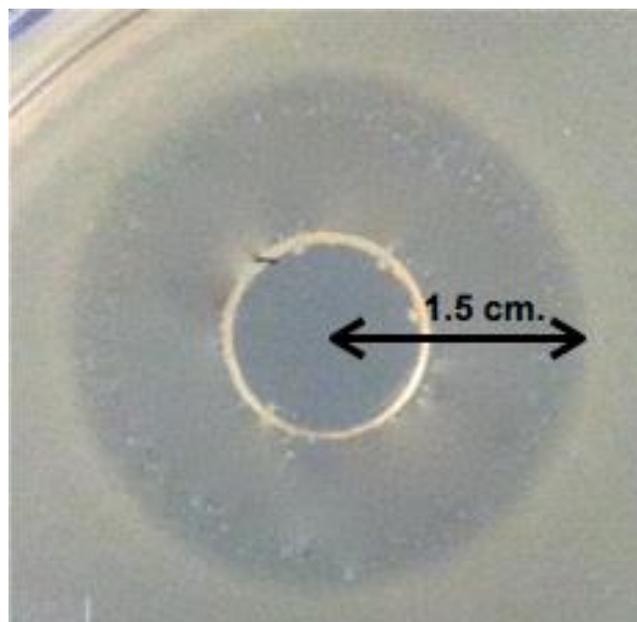


Figura 17. Halo de inhibición de la cepa control (1).

#### **5.4 Efecto de neutralizar y tratar térmicamente los sobrenadantes sobre la actividad antimicrobiana.**

##### **5.4.1 Preparación de los sobrenadantes neutralizados y con tratamiento térmico. (SNTT)**

Para la preparación de los sobrenadantes se activaron las cepas, que presentaron halos de inhibición en la prueba descrita en la sección 5.3.4, mediante la técnica descrita en la sección 5.2.1.

Los sobrenadantes se extrajeron de la misma forma que se describe en la sección 5.3.3.4. Una vez obtenidos los sobrenadantes, se les realizó un ajuste de pH (Potenciómetro 3020 pH Meter, Jenway), utilizando NaOH (1 M) hasta llegar a un pH de 7.0-8.0 con el fin de eliminar el efecto inhibitorio de los ácidos orgánicos producidos por las BAL durante su crecimiento como parte de su metabolismo.

Una vez ajustado el pH de los sobrenadantes, se les dio un tratamiento térmico a 100 °C durante 10 minutos, realizado en un autoclave. Esto para comprobar la termoestabilidad de las posibles bacteriocinas producidas por las BAL [21]. En la figura 18 se muestra esquemáticamente la metodología.

Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol

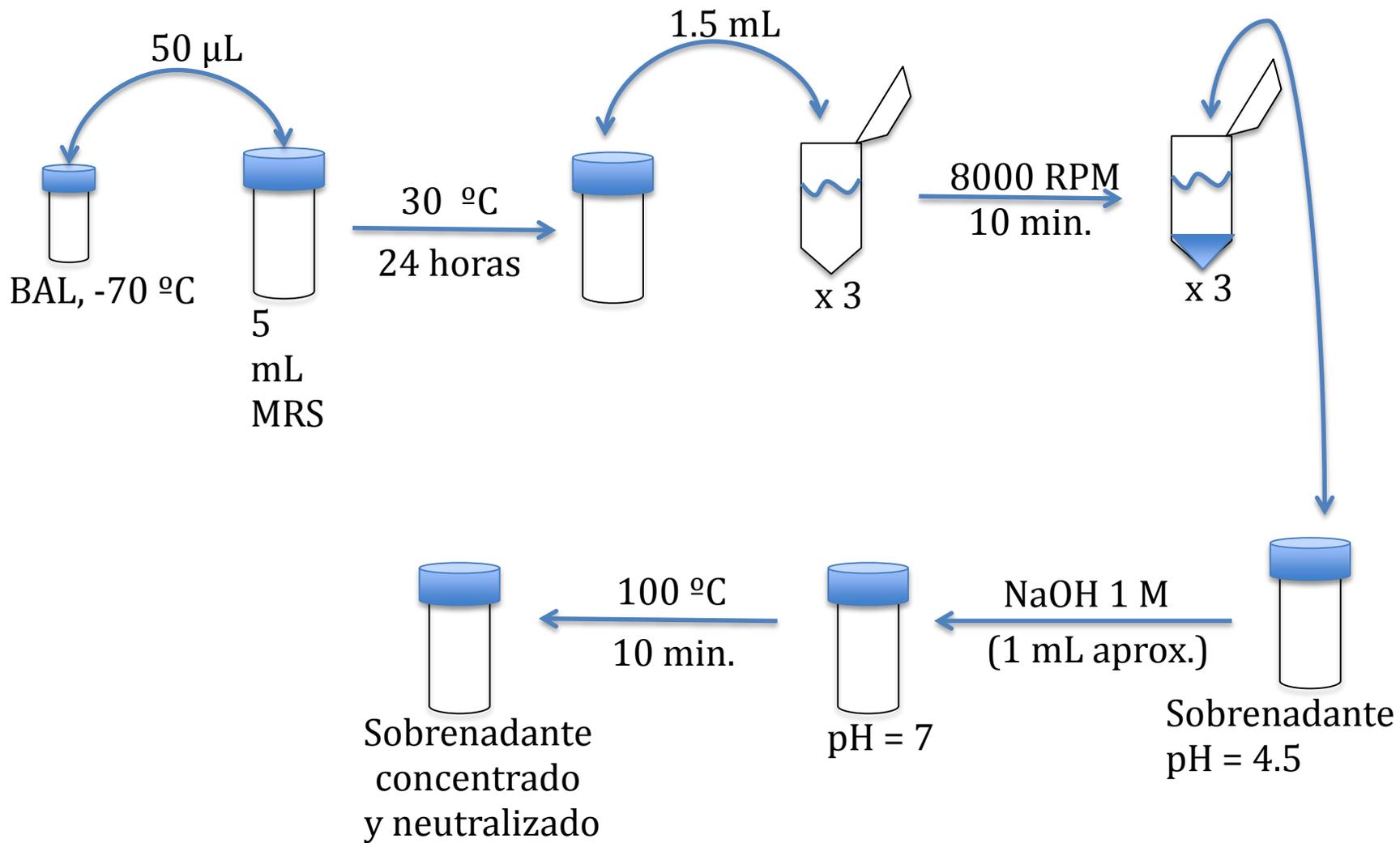


Figura 18. Preparación de sobrenadantes, neutralización y tratamiento térmico.

#### **5.4.2 Determinación de la actividad antimicrobiana del SNTT.**

Se prepararon placas y sobrecapas de BHI-T como se describió en la sección 5.3.1 y 5.3.2, se montaron las placas para realizar la prueba de difusión en agar tal como se dijo en la sección 5.3.3.4. Se depositaron 80  $\mu$ L de los SNTT en cada pozo. Las placas se inocularon durante 24 horas a 37 °C. Se consideró a la cepa 1 como control positivo, sin realizarle ninguno de los tratamientos.

Después de observar el crecimiento de la bacteria patógena se procedió a medir el radio de los halos de inhibición de los SNTT, en caso de haberlos.

#### **5.5 Efecto de la concentración de los sobrenadantes neutralizados y tratados térmicamente (SNTTC) sobre su actividad antimicrobiana.**

##### **5.5.1 Preparación de los sobrenadantes.**

Las cepas que presentaron halos de inhibición después de realizar las pruebas de difusión en agar con los SNTT se reactivaron, depositando 50  $\mu$ L del inóculo congelado en 5 mL de caldo MRS. Se incubaron durante 24 horas a 30 °C. Tras el tiempo de incubación cada BAL se reinoculó en matraces Erlenmeyer con 100 mL de caldo MRS estéril (50  $\mu$ L de inóculo/20 mL de medio). Posteriormente se incubaron a 30 °C durante 24 horas.

El inóculo activo se colocó en tubos para centrifuga con el fin de separar las células por gravedad, a 8000 RPM durante 10 minutos a 4 °C, en una centrifuga Beckman modelo J2-21M/E.

Posteriormente, el sobrenadante de cada BAL se ajustó a un pH de 7.0-8.0 adicionando entre 9 mL y 10 mL de NaOH (1 M). Una vez ajustado el pH, se realizó un tratamiento térmico en un autoclave durante 10 minutos a 100 °C. Las razones de estos tratamientos se describieron previamente en la sección 5.4.1.

### **5.5.2 Concentración de los SNTT con rotavapor y bomba de vacío.**

Los sobrenadantes neutralizados y tratados térmicamente fueron sometidos a una concentración, en la cual se eliminó el 50% del agua utilizando un rotavapor marca Büchi, modelo R-215, una bomba de vacío marca Büchi, modelo V710, y un baño de agua marca Büchi, modelo B-491.

Los SNTT se transfirieron a un matraz bola de 500 mL estéril, y se colocó en el rotavapor para extraer aproximadamente el 50% del agua a 65 RPM, 60 °C y 72 mbar de presión. Posterior a su concentración, cada SNTTC se conservó en congelación a -4 °C.

### **5.5.3 Determinación de la actividad antimicrobiana de los SNTTC.**

Se prepararon placas y sobrecapas de BHI-T como se describió en la sección 5.3.1 y 5.3.2, se montaron las placas para realizar la prueba de difusión en agar tal como se dijo en la sección 5.3.3.4. Se depositaron 80  $\mu$ L de los SNTTC en cada pozo. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C.

Después de observar el crecimiento de la bacteria patógena se procedió a medir el radio de los halos de inhibición de los SNTTC, en caso de haberlos.

### **5.6 Prueba de reto entre *Streptococcus sp.* y *Listeria monocytogenes*.**

Con el fin de estudiar el efecto que los cultivos de las BAL aisladas del pozol identificadas como *Streptococcus sp.* tienen sobre la viabilidad de *L. monocytogenes*, bacteria patógena presente durante la preparación del pozol, se realizaron pruebas de reto en caldo MRS, basándonos en la metodología descrita por Rodríguez (2011).

#### **5.6.1 Preparación de las BAL y de la bacteria patógena.**

Las BAL que presentaron mayor actividad antimicrobiana después de someter sus sobrenadantes a concentración, tratamiento térmico y neutralización fueron reactivadas tomando 50  $\mu$ L del inóculo conservado en congelación y se depositaron en 5 mL de caldo MRS estéril. Se incubaron durante 24 horas a 30 °C.

## Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol

La bacteria patógena *L. monocytogenes* se reactivó tomando 50 µL del inóculo conservado en congelación y se depositaron en 5 mL de caldo BHI estéril. Se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

### 5.6.2 Preparación de medio Oxford para *Listeria monocytogenes*.

Se preparó el medio Oxford (Acumedia®), selectivo para el aislamiento de *Listeria monocytogenes*, siguiendo la siguiente metodología: Se suspendieron 28.75 gramos del medio en medio litro de agua destilada, calentando a ebullición durante un minuto. Posteriormente se esterilizó el medio a 121 °C durante 10 minutos.

Para preparar el antibiótico (Listeria Supplement, LL70-05, Dalynn Biologicals), se añadió asepticamente al vial 2.5 mL de etanol y se agitó vigorosamente y se añadió posteriormente 2.5 mL de agua destilada estéril para disolver completamente el contenido del vial.

**Tabla 5.4. Ingredientes activos por cada 5 mL de antibiótico.**

Ingrediente	mg
Cicloheximida	200
Colistina	10
Acriflavina	2.5
Cefotetan	1
Fosfomicina	5

## Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol

El antibiótico reconstituido se añadió a los 500 mL del medio Oxford estéril temperado aproximadamente a 45 °C, para posteriormente verter en cajas petri.

### 5.6.3 Montaje de la prueba de reto.

Para la prueba de reto se hizo crecer a *L. monocytogenes* junto con las BAL en matraces de 100 mL con caldo MRS. Se utilizaron cuatro matraces para cada prueba, uno para tener un control positivo de la BAL (exclusivamente la BAL, para observar su crecimiento), otro para tener un control positivo de *L. monocytogenes* (exclusivamente la bacteria patógena para observar su crecimiento en el caldo MRS), otro para tener un control negativo (sin inocular ninguna de las dos bacterias, para asegurar que no hay presencia de otros microorganismos que alteren los resultados de la prueba) y otro en el cual se tendría la BAL y la bacteria patógena (mezcla).

Para la preparación de cada matraz se siguieron los siguientes pasos:

Al cultivo de BAL reactivado en la sección 5.5.1 se diluyó 1/1000 en solución salina al 0.85%. Se inoculó el matraz con 100 mL de caldo MRS con una relación de 50 µL de inóculo diluido por cada 20 mL de caldo, tanto para el control positivo de BAL como para la mezcla.

Al cultivo de *L. monocytogenes* reactivado en la sección 5.5.1 se le realizó una dilución (1/10) en solución salina al 0.85%. Del cultivo diluido se inoculó el matraz con 100 mL de caldo MRS con una relación de 0.1 mL de inóculo por cada 20 mL de caldo, tanto para el control positivo de *L. monocytogenes* como

## Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol

para la mezcla.

El matraz control negativo, no se inoculó con ninguna de las dos bacterias.

Para cada una de las pruebas se monitoreó el crecimiento de ambas bacterias, manteniendo el cultivo a 30 °C. Se tomaron muestras a las 0, 12, 24 y 48 horas. La concentración de cada bacteria se determinó mediante el método de cuenta en placa, se utilizó el medio MRS sólido para el conteo de las BAL y el medio Oxford para el conteo de *Listeria monocytogenes*. Se realizaron las diluciones necesarias en viales con 4.5 mL de solución salina al 0.85%.

Para los resultados de la cuenta en placa se consideraron, para las BAL, las colonias redondas, color marfil y con bordes lisos (Figura 19). Para *L. monocytogenes* se consideraron las colonias oscuras o café, redondas y con un precipitado negro (Figura 20), considerando las placas que estuvieran en un rango de 25 a 250 colonias.

Se trazaron curvas de crecimiento de cada microorganismo, para observar el efecto de las BAL sobre la viabilidad de *L. monocytogenes*. En la figura 21 se muestra esquemáticamente la metodología empleada.

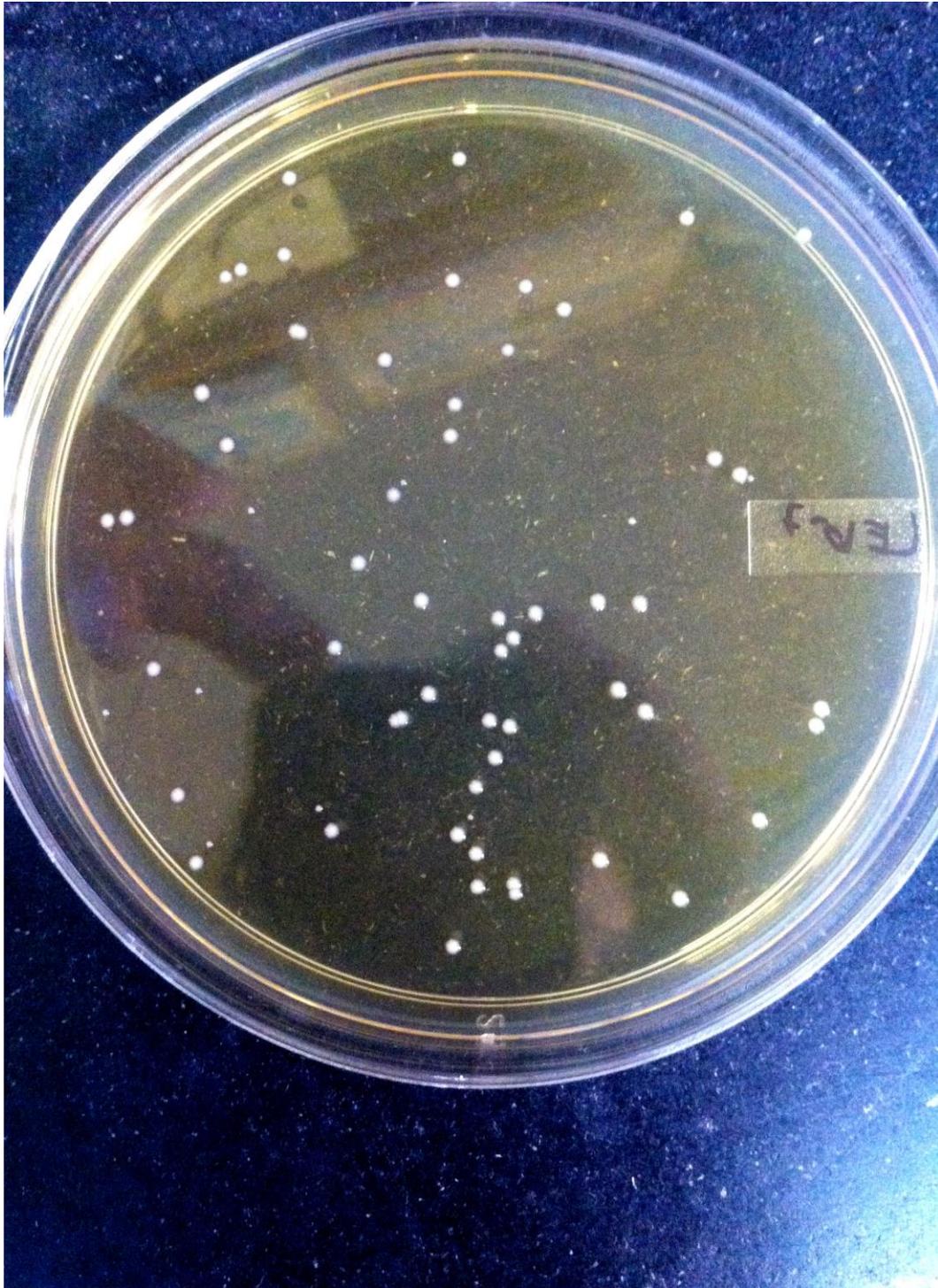


Figura 19, Colonias características de las BAL en agar MRS.

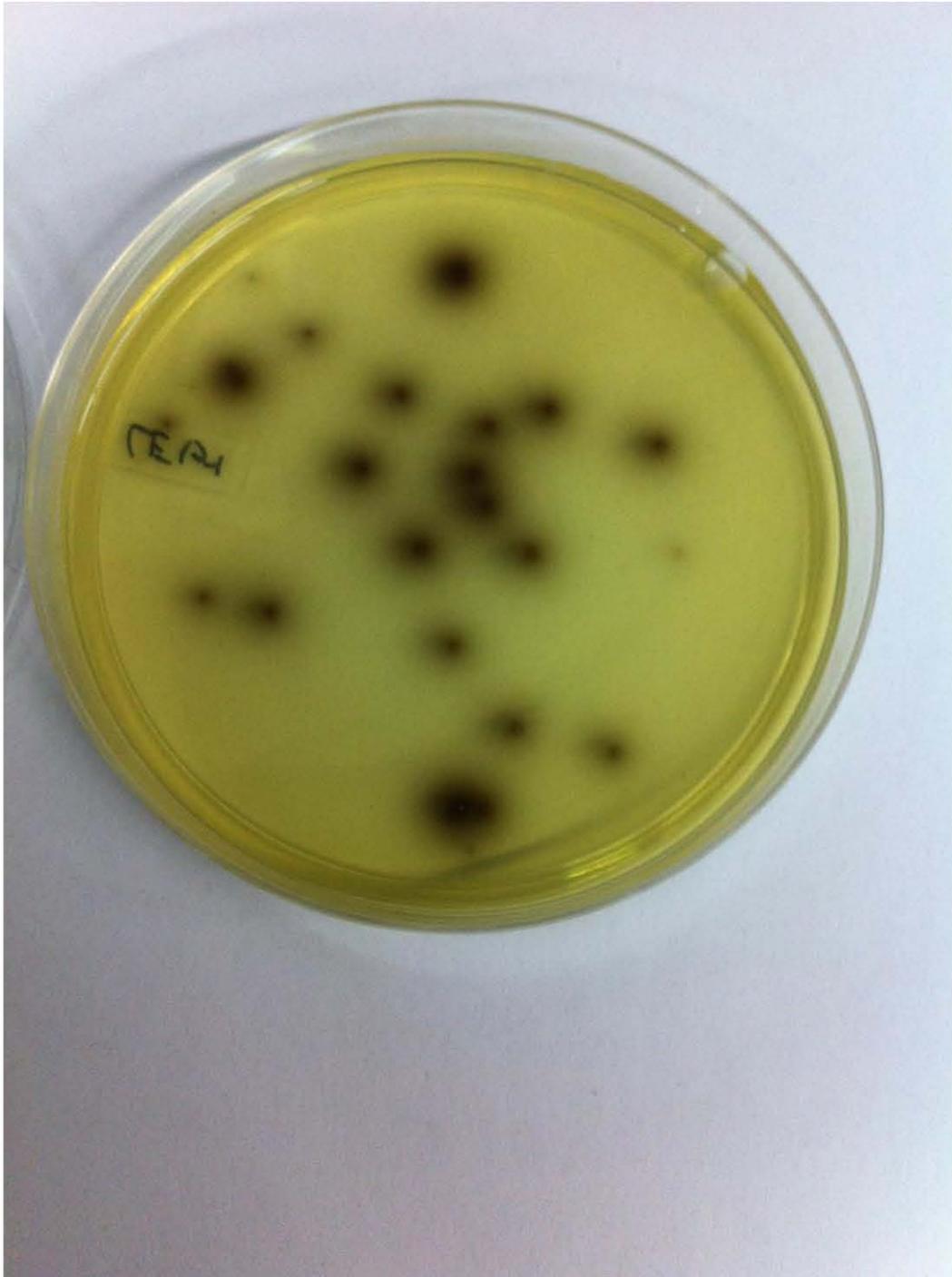
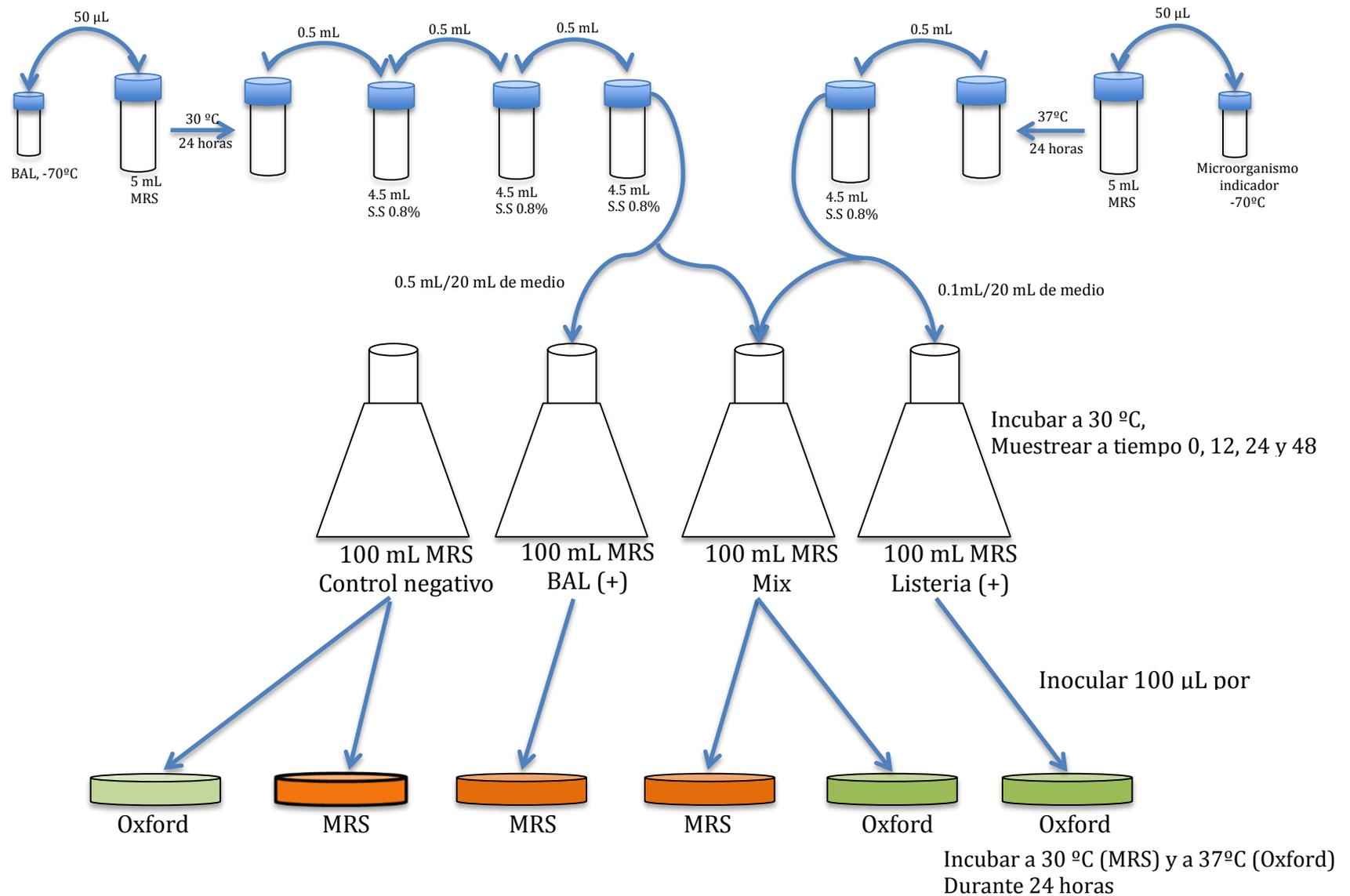


Figura 20, Colonias características de *Listeria monocytogenes* en agar Oxford.

**Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol**



**Figura 21. Metodología de prueba de reto.**

## 6 Resultados.

### 6.1 Resultados prueba de difusión en agar.

Los resultados de la prueba de difusión para las 37 cepas de *Streptococcus sp.* se muestran en la tabla 6.1 y en las figuras 22 y 23. Se observaron halos de inhibición translúcidos, lo cual indicó que la actividad antimicrobiana de las BAL que los presentaron es bactericida, ya que un halo opaco indicaría actividad bacteriostática [25]. La inhibición solo se observó frente a *Listeria monocytogenes*. En las pruebas frente a *Salmonella Typhimurium* no se observa inhibición. De los sobrenadantes de las 37 cepas, 19 (51.35%) de ellos presentaron inhibición frente a *Listeria monocytogenes*. De esas 19 cepas, dos presentaron halos opacos. El halo de mayor radio fue de 1.55 cm, perteneciente al control y a la cepa A45208, y el halo más pequeño, de 0.55 cm, perteneciente a las cepas 25233 y 15133.

Del total de cepas que presentaron inhibición, el 42.10% presentaron halos de entre 0.50 cm y 1.00 cm. El resto presentaron halos mayores a 1.00 cm. En comparación con trabajos previos (Tavera, 2010), se observa que las cepas del género *Streptococcus* presentan una mayor inhibición de la cepa indicadora (*Listeria monocytogenes*).

Las posibles bacteriocinas de las cepas aisladas del pozol no presentan inhibición frente a *Salmonella Typhimurium* debido a que es una bacteria Gram negativa, y la gran mayoría de las bacteriocinas solo presentan actividad frente a bacterias similares

a las que las producen [19, 22]. La actividad antimicrobiana de las posibles bacteriocinas dependerá de qué clase de bacteriocina se trate, ya que de acuerdo a las clasificaciones hay bacteriocinas que requieren de alguna otra sustancia para aumentar su actividad, así como hay otras que solo tienen actividad frente a bacterias de la misma especie o género [19, 22].

## **6.2 Resultados prueba de difusión en agar con SNTT.**

De los sobrenadantes de las 19 cepas que presentaron inhibición frente a *Listeria monocytogenes* en la prueba con el sobrenadante crudo (sin tratamientos) solo 17 (89.47%), después de ser neutralizados y sometidos a un tratamiento térmico, presentaron halo de inhibición translucido. Esto indica que los compuestos liberados por las BAL al medio, posibles bacteriocinas, son termoestables y además, la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* no se debe a los ácidos orgánicos ni a la acidez del medio [44].

De los sobrenadantes que presentaron inhibición en esta prueba, el halo de mayor tamaño (1.40 cm) pertenece a las cepas A45208 y A45212, siendo el de menor tamaño (0.60 cm) el de las cepas A57206 y 25124. El 35.29% de las cepas presenta un halo menor a 1.00 cm y el resto tienen halos mayores a 1.00 cm.

### 6.3 Resultados prueba de difusión en agar con SNTTC.

Los resultados utilizando los SNTTC para la prueba de difusión en agar se muestran en la tabla 6.3 y en las figuras 24.1 y 24.2. De los 17 SNTTC que fueron probados, 12 (70.5%) de ellos mostraron actividad antimicrobiana bactericida. Algunas de las cepas presentaron un aumento en los halos de inhibición, esto debido al efecto de la concentración. En trabajos previos se ha observado que cepas del género *Lactococcus lactis* producen bacteriocinas capaces de inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* al igual que algunas cepas de *Streptococcus* sp, utilizando sus compuestos antimicrobianos en una película comestible a base de caseinato [40,41, 42].

Para esta prueba el halo de mayor tamaño (1.45 cm) pertenece a las cepas A45208 y A37103, siendo el halo de menor tamaño (0.85 cm) perteneciente a la cepa 15124. El 25% de las cepas presentan halos menores a 1.00 cm.

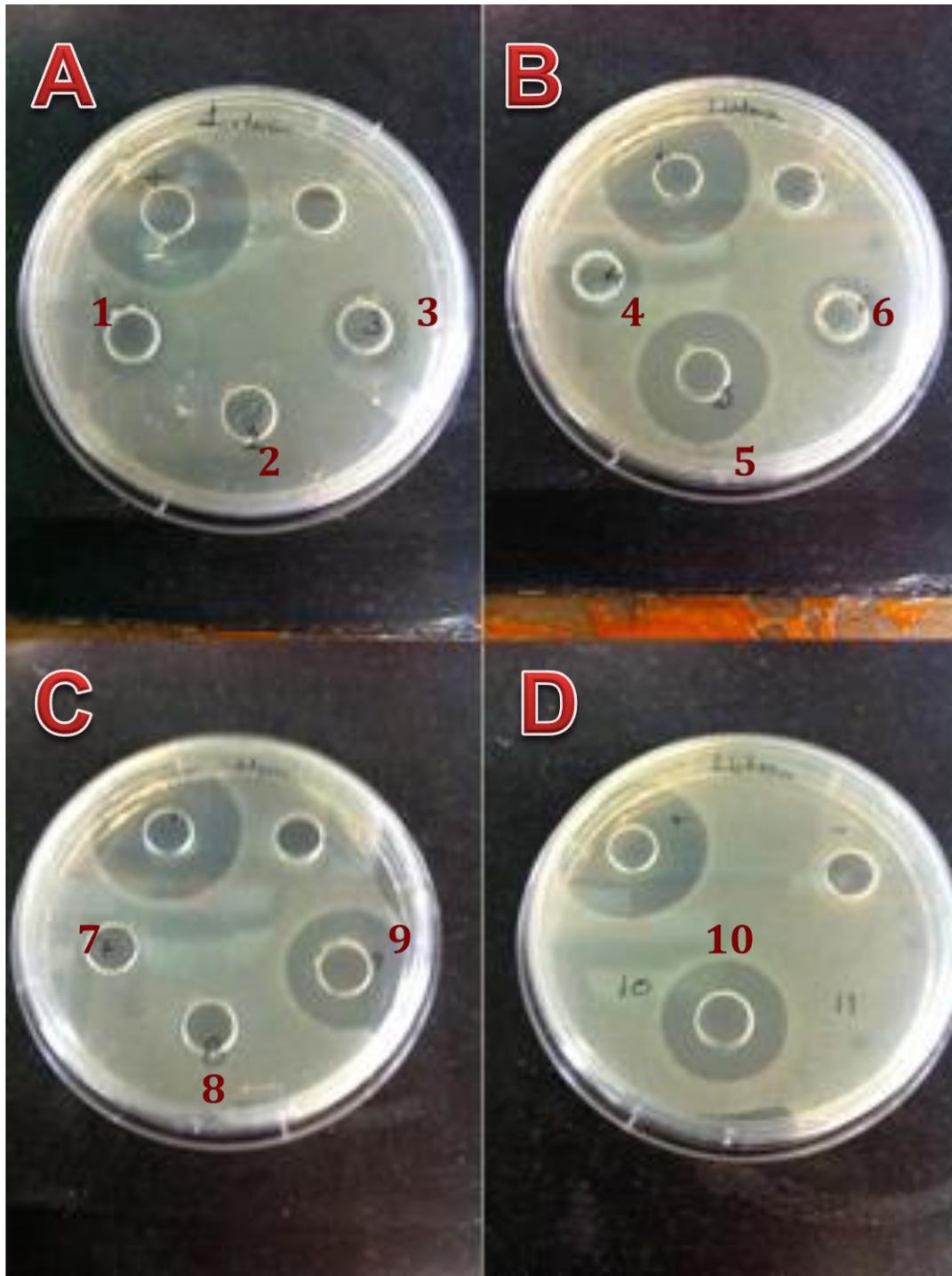


Figura 22. Actividad antimicrobiana de cepas de *Streptococcus* frente a *L. monocytogenes* (prueba de difusión en agar). A: cepa 15133 (1), cepa 15220 (2), cepa 15124 (3). B: cepa 25124 (4), cepa A56203 (5), cepa A57206 (6). C: cepa A37202 (7), cepa A56101 (8), cepa A56208 (9). D: cepa A45226 (10).

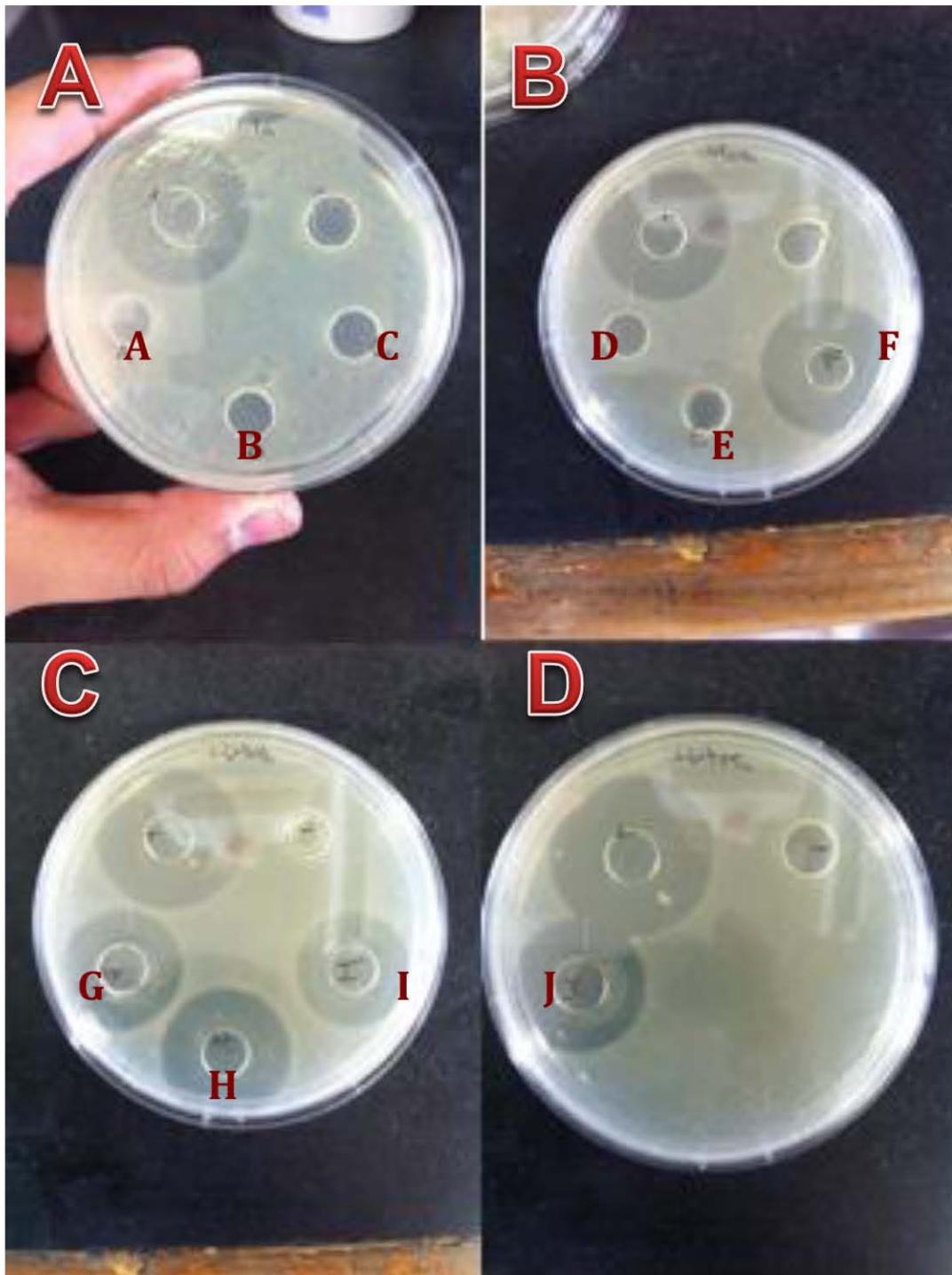


Figura 23, Actividad antimicrobiana de cepas de *Streptococcus* frente a *L. monocytogenes* (prueba de difusión en agar). **A:** cepa A46116 (A), cepa 25245 (B), cepa 25113 (C). **B:** cepa 25139 (D), cepa 25137 (E), cepa A45208 (F). **C:** cepa A37103 (G), cepa A36111 (H), cepa A56201 (I). **D:** cepa 15319 (J).

**Tabla 6.1. Resultados del efecto antimicrobiano sobre *Listeria monocytogenes* por las BAL del género *Streptococcus*. Método de difusión en agar. La prueba se realizó por duplicado.**

Cepa	Halo (radio en cm)	Halo (radio en cm)	Observaciones
Control (1)	1.55	1.55	Halo transparente
15133	0.60	0.55	Halo transparente
15220	-	-	-
15124	0.75	0.70	Halo transparente
25124	0.80	0.80	Halo transparente
A56203	1.25	1.05	Halo transparente
A57206	0.80	0.80	Halo transparente
A37202	-	-	-
A56101	-	-	-
A56208	1.30	1.30	Halo transparente
A45226	1.15	1.10	Halo transparente
A46111	-	-	-
25245	-	-	-
25113	-	-	-
25139	-	-	-
25137	-	-	-
A45208	1.55	1.55	Halo transparente
A37103	1.25	1.25	Halo transparente
A36111	1.35	1.35	Halo transparente
A56201	1.15	1.20	Halo transparente
15319	1.30	1.25	Halo transparente
15430	-	-	-
25421	-	-	-

**Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol**

<b>15125</b>	-	-	-
<b>A57103</b>	1.00	0.90	Halo transparente
<b>A12203</b>	0.80	0.80	Halo transparente
<b>A46112</b>	-	-	-
<b>A46113</b>	-	-	-
<b>A47212</b>	-	-	-
<b>A56202</b>	-	-	-
<b>A45201</b>	-	-	-
<b>25318</b>	-	-	-
<b>25109</b>	0.60	0.60	Halo opaco
<b>25148</b>	0.60	0.75	Halo opaco
<b>25233</b>	0.55	0.60	Halo transparente
<b>15414</b>	-	-	-
<b>A45212</b>	1.35	1.35	Halo transparente
<b>A36202</b>	1.00	1.00	Halo transparente

**Tabla 6.2. Resultados del efecto antimicrobiano sobre *Listeria monocytogenes* por las BAL del género *Streptococcus*. Método de difusión en agar, utilizando SNTT. La prueba se realizó por duplicado.**

Cepa	pH (sobrenadante)	Halo (radio en cm)	Halo (radio en cm)	Observaciones
Control (1)	-	1.40	1.45	Halo transparente
1	7.04	1.30	1.30	Halo transparente
15133	7.03	1.00	1.00	Halo transparente
15124	7.33	0.75	0.75	Halo transparente
25124	7.34	0.60	0.65	Halo transparente
A56203	7.29	1.10	1.10	Halo transparente
A57206	7.65	0.60	0.60	Halo transparente
A56208	7.05	1.00	1.00	Halo transparente
A45226	7.09	1.00	0.95	Halo transparente
A45208	7.90	1.40	1.40	Halo transparente
A37103	8.20	1.30	1.35	Halo transparente
A36111	6.92	1.20	1.25	Halo transparente
A56201	7.14	1.10	1.10	Halo transparente
15319	7.28	1.25	1.25	Halo transparente
A57103	7.80	0.95	0.95	Halo transparente
A12203	7.15	-	-	-
25109	6.97	0.65	0.70	Halo opaco
25148	7.38	-	-	-
25233	6.90	0.80	0.75	Halo opaco
A45212	7.75	1.40	1.35	Halo transparente
A36202	6.91	1.00	0.95	Halo transparente

**Tabla 6.3. Resultados del efecto antimicrobiano sobre *Listeria monocytogenes* por las BAL del género *Streptococcus*. Método de difusión en agar, utilizando SNTTC. La prueba se realizó por duplicado.**

Cepa	pH (sobrenadante)	Halo (radio en cm)	Halo (radio en cm)	Concentración del sobrenadante	Observaciones
Control (1)	No se realizo	1.55	1.55	-	Halo transparente
15133	7.09	1.00	1.00	40%	Halo transparente
15124	7.21	0.85	0.85	40%	Halo transparente
25124	7.02	-	-	40%	-
A56203	7.00	0.90	0.90	40%	Halo transparente
A57206	7.00	-	-	50%	-
A56208	7.03	1.05	1.10	60%	Halo transparente
A45226	7.00	0.90	0.95	60%	Halo transparente
A45208	7.05	1.45	1.50	60%	Halo transparente
A37103	7.03	1.45	1.40	50%	Halo transparente
A57103	7.00	-	-	50%	-
A36111	7.00	1.25	1.25	60%	Halo transparente
A56201	7.02	1.00	1.00	60%	Halo transparente
15319	7.05	1.00	1.00	70%	Halo transparente
25109	7.00	-	-	50%	-
25233	7.00	-	-	60%	-
A45212	7.00	1.30	1.30	60%	Halo transparente
A36202	7.00	1.00	1.00	60%	Halo transparente

-- : no hubo resultado.

Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol

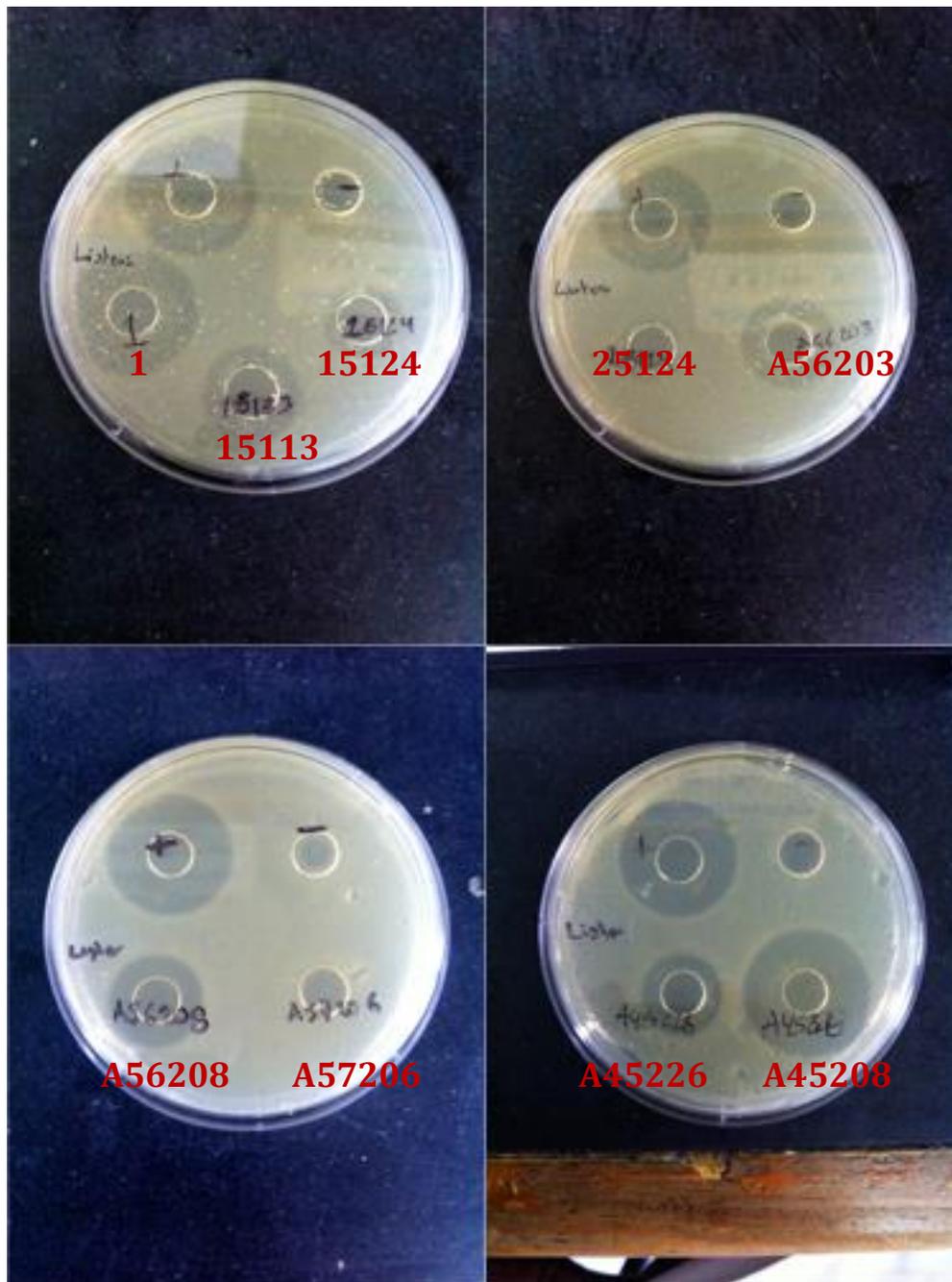


Figura 24.1. Resultado de la prueba de difusión en agar utilizando SNTTC frente a *Listeria monocytogenes*. Arriba-izq: cepa 1, cepa 15133, cepa 15124. Arriba-Der: cepa 25124, cepa A56203. Abajo-izq: cepa A56208, cepa A57206. Abajo-Der: cepa A45226, cepa A45208.

Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol

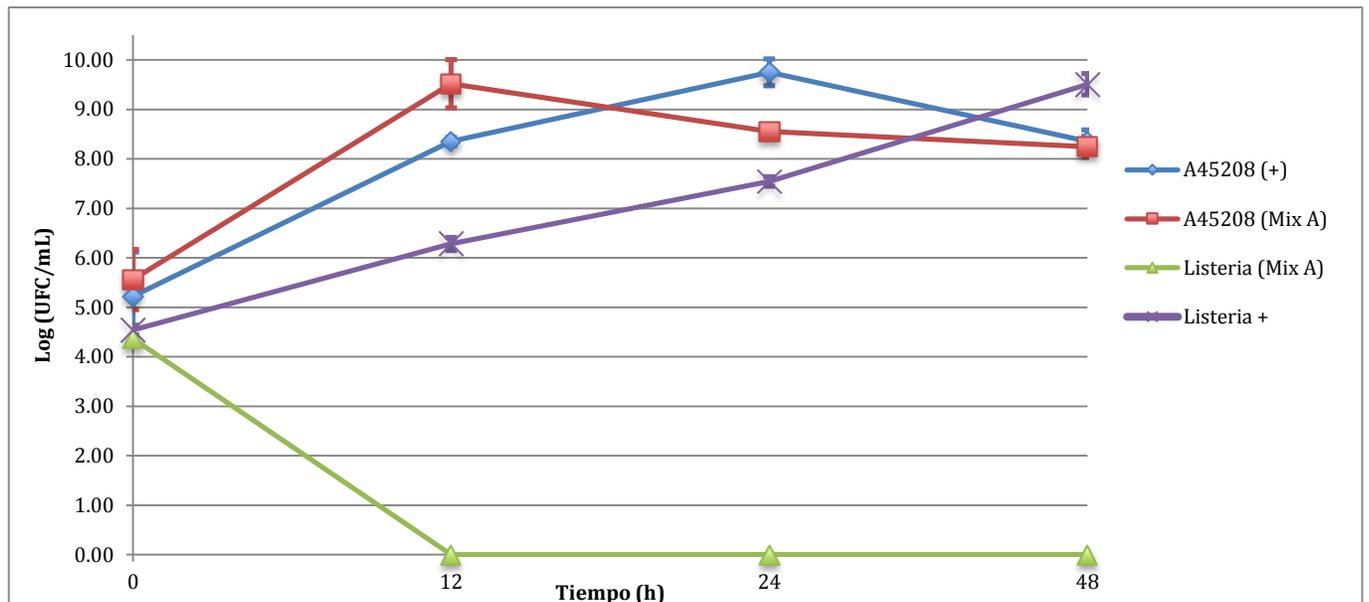


Figura 24.2. Resultado prueba de difusión en agar utilizando SNTTC frente a *Listeria monocytogenes*. Arriba-izq: cepa A37103, cepa A57103. Arriba-Der: A36111, cepa A56201, cepa 15139. Abajo-izq: cepa 25109, cepa 25233, cepa A45212. Abajo-Der: A36202.

#### 6.4 Resultados prueba de reto.

Para la prueba de reto se seleccionaron las 5 cepas con mayor actividad antimicrobiana después de tratar térmicamente, neutralizar y concentrar los sobrenadantes. Las cepas utilizadas fueron: A45208, A37103, A45212, A36202 y A36111 (ver tabla 6.3). La metodología descrita en la sección 5.5.2 se modificó para la cepa A36202, debido a que su crecimiento fue menor, diluyendo solo 1/10 del inóculo activo en solución salina. A partir de ahí, la metodología se siguió como esta descrita.

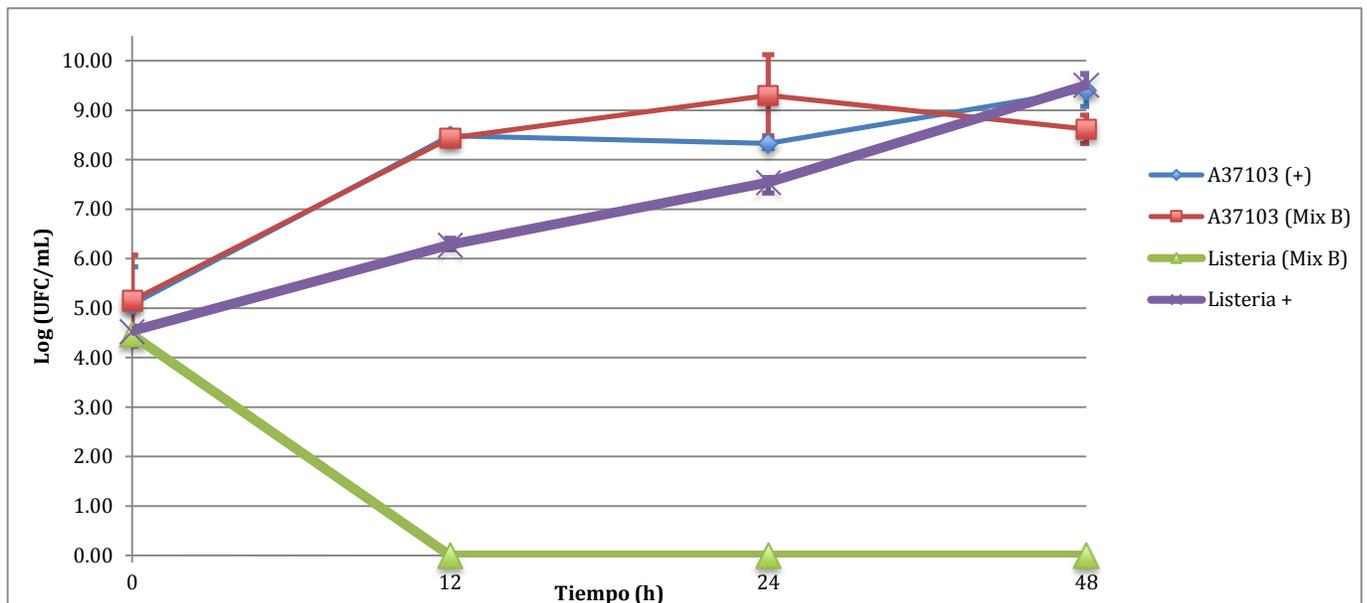
## Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol



**Figura 25. Crecimiento de la cepa A45208 y de *Listeria monocytogenes* respecto al tiempo.**

El crecimiento de la cepa A45208 alcanzó cuentas más altas al tiempo 24 (Figura 25), siendo este el tiempo en que la bacteria alcanza la fase estacionaria. En la Figura 25 se puede observar el crecimiento de las cepas de BAL y la bacteria indicadora, cada una por separado y en el mix (mezcla). Se puede ver que ambas bacterias al estar creciendo conjuntamente modifican sus patrones de crecimiento, en el caso de la BAL, que alcanzó cuentas más altas al tiempo 12, esto se puede deber a una competitividad por el medio y por tanto la producción de sustancias antimicrobianas, posibles bacteriocinas, aumenta, dando paso a la inhibición casi total de la bacteria indicadora al cabo de 12 horas de incubación.

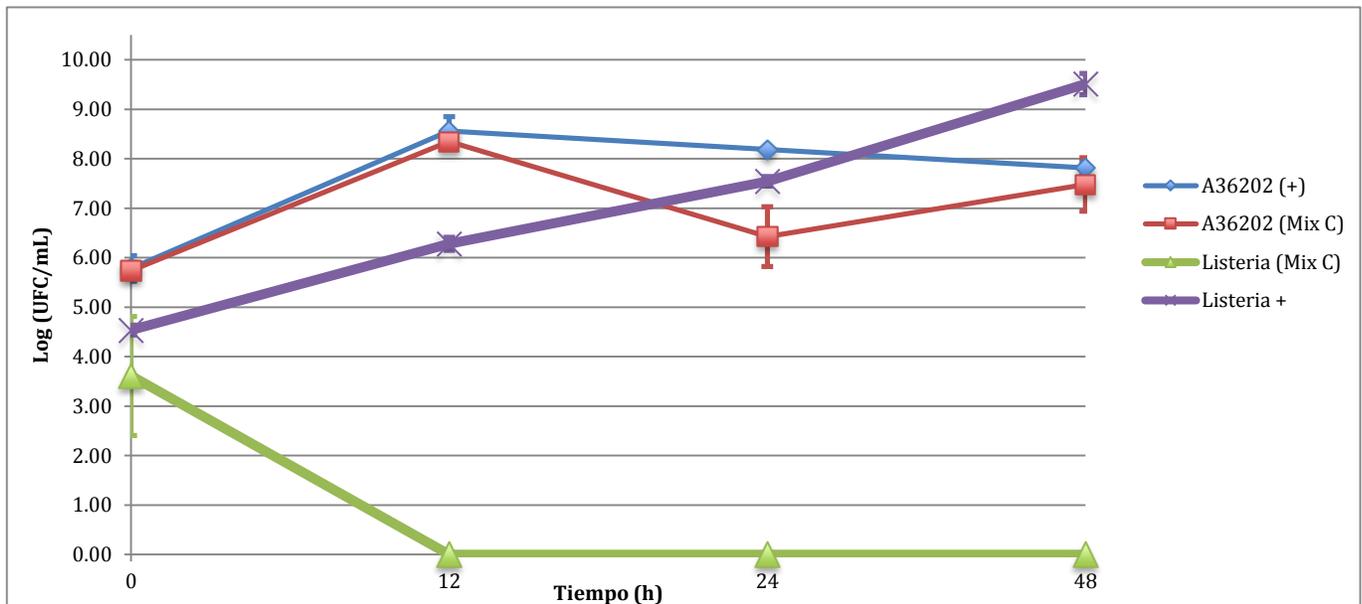
## Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol



**Figura 26. Crecimiento de la cepa A37103 y *Listeria monocytogenes* respecto al tiempo.**

En la Figura 26 se observa el crecimiento de la cepa A37103 y del microorganismo indicador. La cepa A37103 presenta patrones de crecimiento similares, en el mix (mezcla) y en el control, alcanzando cuentas mas altas al tiempo 24 y 48 para el mix (mezcla) y el control, respectivamente. *Listeria monocitogenes* en el control presenta crecimiento abundante aun al tiempo 48, pero en la mezcla, al estar en presencia de la BAL, se ve inhibida a las 12 horas de iniciado el experimento.

## Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol

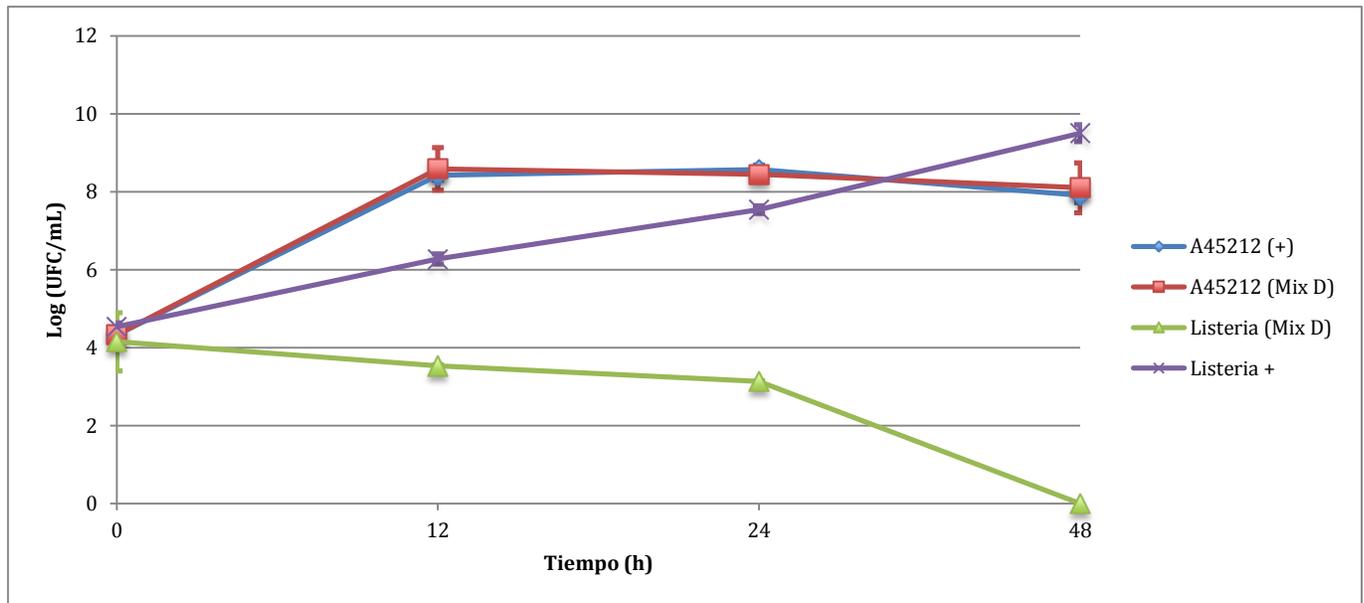


**Figura 27. Crecimiento de la cepa A36202 y *Listeria monocytogenes* respecto al tiempo.**

El crecimiento de la cepa A36202 (Figura 27) alcanzó cuentas más altas a las 12 horas de iniciado el tiempo de incubación, tanto en la mezcla como en el control. En el control de la BAL se observa la disminución de menos de una unidad logarítmica en el crecimiento al tiempo 48, al contrario del crecimiento en el mix (mezcla) que decrece aproximadamente una y media unidades logarítmicas en el tiempo 24.

El crecimiento de *Listeria monocytogenes* va en aumento desde el tiempo 0 hasta las 48 horas de comenzado el experimento. A diferencia del control de *Listeria monocytogenes*, en la mezcla, se observa una inhibición del crecimiento a tiempo 12.

## Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol

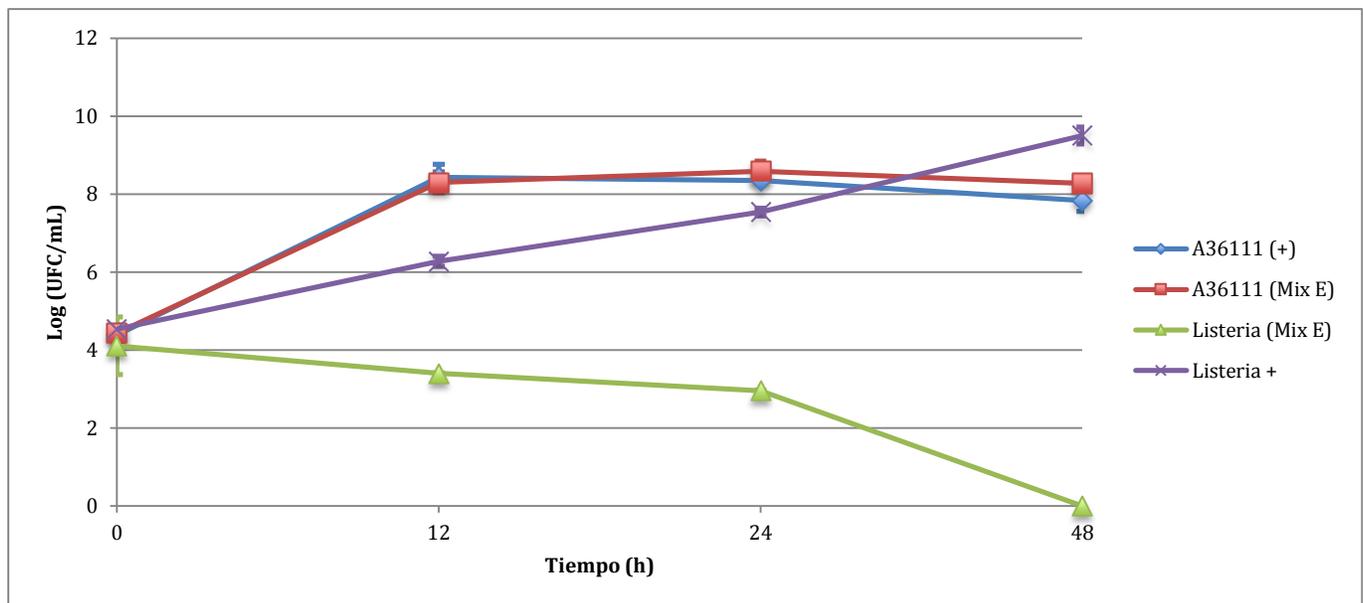


**Figura 28. Crecimiento de la cepa A45212 y *Listeria monocytogenes* respecto al tiempo.**

Para la cepa A45512 observamos la misma tendencia de crecimiento en el control y en el mix (mezcla) (Figura 28). Para el microorganismo indicador se ve un crecimiento continuo en el control, y en el mix se observa que el crecimiento disminuye una unidad logarítmica para el tiempo 24, y para el tiempo 48 se ve una inhibición total de la bacteria.

A diferencia de las demás cepas que inhibieron al microorganismo indicador en un tiempo de 12 horas, la cepa A45212, caracterizada previamente como un *Lactococcus lactis*, y el halo de inhibición en las pruebas de difusión en agar fue menor que las demás cepas probadas en la prueba de reto.

## Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol



**Figura 29. Crecimiento de la cepa A36111 y *Listeria monocytogenes* respecto al tiempo.**

La cepa A36111 presentó el mismo crecimiento, tanto en la mezcla como en el control, teniendo las cuentas más altas al tiempo 24, y comenzando a disminuir a partir de ese momento (Figura 29). El crecimiento de *Listeria monocytogenes* se ve inhibido en la mezcla hasta transcurridas 48 horas de iniciado el experimento. Su comportamiento coincide con el observado en la cepa A45212.

En las figuras 25, 26 y 27 se puede observar que el crecimiento de *L. monocytogenes* se vio inhibido en su totalidad a partir de las 12 horas de empezado el experimento. Esto, sumado a que sabemos que *L. monocytogenes* puede sobrevivir en condiciones acidas (pH de 4.5 aproximadamente) [26], nos indica que las cepas A45208, A37103 y A36202 producen compuestos antimicrobianos, posibles bacteriocinas. Los resultados indican que las cepas descritas fueron más eficientes que las otras cepas para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*.

En las gráficas (figuras 28 y 29) se observa que el crecimiento de *Listeria monocytogenes* no se inhibe por completo sino hasta después de las 24 horas de iniciado el experimento, lo cual indicaría una producción menor o un tipo diferente de posibles bacteriocinas de parte de las cepas A45212 y A3611, las cuales no inhiben efectivamente el crecimiento de *L. monocytogenes*.

Estos resultados se compararon con lo observado en las pruebas de difusión en agar, donde se puede observar que los sobrenadantes de las cepas A45208 y A37103 forman un halo de inhibición mayor, lo cual se podría relacionar con el tiempo que tardaron en inhibir por completo a *L. monocytogenes*. A diferencia de esas cepas, los sobrenadantes de las cepas A45212 y A36111 formaron halos más pequeños y el tiempo en que inhibieron por completo a *L. monocytogenes* fue mayor.

### **Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol**

La cepa A36202 a pesar de presentar un halo de inhibición menor, logró inhibir a *L. monocytogenes* en un corto tiempo, la razón podría ser que esta cepa es un *Enterococcus sulfureus* y que las posibles bacteriocinas generadas estén más activas, suponiendo esto debido a que en estudios previos se presentaron cepas de *Enterococcus* que producen bacteriocinas capaces de inhibir a *S. bovis* [50]. Los tiempos a los que las cepas de BAL inhiben al microorganismo indicador, son alrededor de las 12 horas, para las bacterias lácticas que producen una mayor cantidad de compuestos antimicrobianos, lo cual al compararlo con las pruebas realizadas por Sánchez Valenzuela et al. (2008) se observa que los tiempos de inhibición de los microorganismos indicadores también son aproximadamente de 12 a 24 horas.

## 7 Conclusiones.

La mitad de las bacterias ácido lácticas de la colección evaluada y aisladas del pozol producen compuestos antimicrobianos, posibles bacteriocinas, los cuales inhiben el crecimiento de *Listeria monocytogenes* pero no inhiben a *Salmonella* Typhimurium.

La mayoría de las posibles bacteriocinas liberadas por las cepas de *Streptococcus* sp. son resistentes al calor y presentan actividad a pH entre 7.00 y 8.00.

La producción de bacteriocinas se da debido a la competencia por el medio, esto se observa en las cepas A45208, A37103 y A36202, ya que al estar en crecimiento junto con el organismo indicador, su crecimiento es mayor y logran inhibirlo en pocas horas.

## **8 Perspectivas.**

Para conocer la naturaleza de las posibles bacteriocinas, y determinar si son o no bacteriocinas, se tendrán que realizar pruebas en las cuales se traten los sobrenadantes con una enzima (proteasa).

Las posibles bacteriocinas podrían aislarse, purificarse y estudiarse fuera de una matriz tan compleja como lo es un medio de cultivo o un alimento.

Las bacteriocinas aisladas, después de los debidos estudios toxicológicos, podrían utilizarse en la industria de los alimentos para mejorar la inocuidad y la calidad de los alimentos, desde productos lácteos hasta productos cárnicos.

## 9 Bibliografía.

1. Ulloa, M., Herrera, T. and Lappe, P. (1987) Fermentaciones tradicionales indígenas de México. Serie de investigaciones Sociales No. 16: 13-20. México, Instituto Nacional Indigenista.
2. Wachter, C., Cañas, A., Bárzana, E., Lappe, P., Ulloa, M. and Owens, J. D. (2000) Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiology* 17: 251-256.
3. Wachter, C., Cañas, A., Cook, P.E., Bárzana, E. and Owens, J.D. (1993) Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9:269-274.
4. Ben Omar, N., y F. Ampe. (2000). Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:9, 3664-3673
5. Bearson, S. Bearson, B. Foster, J. W. (1997) Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters* Vol. 142, 12: 173-180.
6. Ramírez, J. C., Rosas, P., Velazquez, M. Y., Ulloa, J. A., Arce, F. (2011) Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente* Año 2, No. 7, 1-16.
7. Carr, F. J., Chill, D. y Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28(4):281-370.
8. Parra, R. A., (2012), Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional los alimentos. *Facultad De Ciencias Agropecuarias*, Vol 8. No 1: 93-105.
9. Hernandez-Mendoza, A., Robles, V. J., Angulo, J., De La Cruz, J., García, H. S.

**Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol**

- (2007), Preparation of a whey-based probiotic product with *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium bifidum*, Journal Food Technology and Biotechnology. Vol 45: 27-31.
10. Savadogo, A., Cheik Ouattara, A. T., Bassole, H. N., Traore, S. A. (2006), Bacteriocins and lactic acid bacteria- a mini review. African Journal of Biotechnology. Vol 5: 678-683.
  11. Gobbetti, M., Calasso, M. (2014) *Streptococcus*. Encyclopedia of Food Microbiology. Vol. 3: 535-553.
  12. Batt, C.A. (2014) *Lactococcus*. Encyclopedia of Food Microbiology. Vol. 2: 439-441.
  13. Giraffa, G. (2014) *Enterococcus*. Encyclopedia of Food Microbiology. Vol. 1: 674-679.
  14. Rea MC, Ross RP, Cotter PD, Hill C. (2011) Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. In Prokaryotic Antimicrobial Peptides. Edited by Drider D, Rebuffat S. New York: Springer:29-53.
  15. Cotter PD, Hill C, Ross RP (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nat Rev Microbiol 3:777–788.
  16. Kozak W, Bardowski J, Dobrzanski WT (1978) Lactostreptocins – acid bacteriocins produced by lactic streptococci. J Dairy Res 45:247–257.
  17. Georgalaki, M., Papadimitriou, K., Anastasiou, R., Pot, B., Van Driessche, G., Devreese, B. and Tsakalidou, E. (2013) Macedovicin, the second food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. Food Microbiology 33: 124-130.
  18. Klaenhammer TR (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev 12:39–85.

**Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol**

19. Monroy Dosta, M. C., Castro Barrera, T., Fernandez Perrino, F. J., Mayorga Reyes, L. (2009) Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS* 73:63-72.
20. Brötz, H., Sahl, H. G., (2009) New insights into the mechanism of action of lantibiotics-diverse biological effects by binding to the same molecular target, *J. Antimicrob. Chemother*, 46,1-6.
21. Cintas, L. M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I. F. & Hernández, P. E., (2001) Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, *F. Scn, Tech. Inter.*, 74, 281- 305.
22. Zacharof, M. P. and Lovitt, R.W. (2012), Bacteriocins produced by lactic acid bacteria, a review article. *APCBEE Procedia* 2: 50-56.
23. Hendriksen, R. S., Vieira, A. R., Karlslose, S., Lo Fo Wong, D. M. A., Jensen, A. B., Wegner, H. C. and Aarestrup, F. M. (2011) Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization global foodborne infections network country data bank: Results of Quality Assured Laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease*. Vol 8, 8: 1-14.
24. Scallan, E., Hokstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M., Roy, S. LK., Jones, J. L. and Griffin, P. M. (2011) Foodborne illness acquired in the United States- Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*. Vol 17, 1:7-15.
25. Hald. T. (2013) Pathogen Updates: Salmonella. *Foodborne Infections and Intoxications*. Chapter 5: 67-97.
26. Wang, S. and Orsi, R. H. (2013) Listeria. *Foodborne Infections and Intoxications*. Chapter 11: 199-216.
27. Nieto-Lozano, J. C., Reguera-Useros, J. I., Peláez-Martínez, M. C. and Hardisson

**Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol**

- de la Torre, A. (2002) Bacteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry. *Meat Science* 62: 237-243.
28. Díaz-Ruiz, G., Guyot, J. P., Ruiz-Teran, F., Morlon-Guyot, J. and 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 dough. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4367-4374.
29. Ampe, F., Ben Omar, N., 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*. Vol 65, No 12: 5464-5473.
30. Escalante, A., Wachter, C., Farrés, 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.
31. Rodríguez, J.M., Martínez, M.I., Horn, N., Dodd, H.M. (2003) Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 80: 101-116.
32. Cascales, L., Craik, D.J. (2010) Naturally occurring circular proteins: distribution, biosynthesis and evolution. *The Royal Society of Chemistry*, 8: 5035-5047.
33. Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. (2013) Bacteriocins – A viable alternative to antibiotics?. *Nature Reviews of Microbiology*. 11: 95-105.
34. Todo Chiapas. 5 bebidas tradicionales de Chiapas. [En línea] (Actualizada el 23 de

**Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol**

- diciembre de 2011). Disponible en: <http://todochiapas.mx/2011/12/5-bebidas-tradicionales-de-chiapas/> (Ultimo acceso el 11 de marzo de 2015).
35. Todar's Online Textbook of Bacteriology. [En línea] (Actualizada en 2012). Disponible en: [http://textbookofbacteriology.net/Listeria\\_2.html](http://textbookofbacteriology.net/Listeria_2.html) (Ultimo acceso el 12 de marzo de 2015).
36. Todar's Online Textbook of Bacteriology. [En línea] (Actualizada en 2012). Disponible en: <http://textbookofbacteriology.net/salmonella.html> (Ultimo acceso el 12 de marzo de 2015).
37. Pathogenic Microbiology. [En línea] (Actualizada en agosto del 2000). Disponible en: <http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/PathogenDescriptions/Streptococcus.htm> (Ultimo acceso el 12 de marzo de 2015).
38. Biological & Biomaterials Preparation, Imaging, & Characterization Facility. [En línea] (Actualizada el 27 de enero de 2012). Disponible en: [http://www.ansci.wisc.edu/bbpic/Images/s900/L-lactis08A\\_HQ.jpg](http://www.ansci.wisc.edu/bbpic/Images/s900/L-lactis08A_HQ.jpg) (Ultimo acceso el 12 de marzo de 2015).
39. Centers for Disease Control and Prevention. [En línea] (Actualizada el 18 de marzo de 2005). Disponible en: <http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/209/209.tif> (Ultimo acceso el 12 de marzo de 2015).
40. Macwana, S., Muriana, P.M. (2012) Spontaneous bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* as a susceptibility screen for identifying different mechanism of resistance and modes of action by bacteriocins of lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 88: 7-13.
41. Mendoza-Mendoza, B., Rodríguez-Hernández, A.-I., Vargas-Torres, A., Díaz-Ruiz,

**Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol**

- G., Montiel, R., Ramos-Aboites, H.-E., Castro-Rosas, J., Chavarría-Hernández, N. (2013) Characterization of the effects on the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in solid culture in contact with caseinate base edible films added with antilisterial activity from *Streptococcus* sp. ABMX isolated from Pozol, an indigenous Mexican beverage. *International Food Research Journal*. 20: 2917-2925.
42. Gomez, S., Cosson, C., Deschamps, A.M. (1997) Evidence for a bacteriocin-like substance produced by a new strain of *Streptococcus* sp., inhibitory to Gram-positive Food-borne pathogens. *Research in Microbiology*. 148: 757-766.
43. López M., J.E., Ochoa Z., A., Santoyo P., G., Anaya L., J.L., Medina M., E., MARTINEZ T., M., Loeza L., P.D. (2008) Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*. 39: 49-57.
44. Tavera Montes, Francisco Leonardo. Producción de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas aisladas de pozol para la inhibición de bacterias patógenas. Dirigida por Gloria Díaz Ruiz. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. 2010.
45. Rodríguez Saavedra, Carolina. Estudio sobre interacciones negativas de bacterias lácticas del pozol. Dirigida por Gloria Díaz Ruiz. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. 2011.
46. Arokiyamy, A., Sivakumar P., K. (2012) Antibacterial spectrum, and mode of action of bacteriocin produced by *Lactobacillus* sp., isolated from traditional dairy products. *International Journal of PharmTech Research*. 4: 315-320.
47. Rossi, F., Marzotto, M., Cremonese, S., Rizzotti, L., Torriani, S. (2013) Diversity of

**Estudio del efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol**

- Streptococcus thermophilus* in bacteriocin production: inhibitory spectrum and occurrence of thermophilin genes. *Food Microbiology*. 35: 27-33.
48. Masdea, L., Kulik, E.M., Hauser-Gerspach, I., Ramseir, A.M., Fillipi, A., Waltimo, W. (2012) Antimicrobial activity of *Streptococcus salivarius* K12 on bacteria involved in oral malodour. *Archives of Oral Biology*. 57: 1041-1047.
49. Balakrishnan, M., Simmonds, R. S., Carne, A., Tagg, J. R. (2000) *Streptococcus mutans* strain N produces a novel low molecular mass non-lantibiotic bacteriocin. *FEMS Microbiology Letters*. 183: 165-169.
50. Morovsky, M., Pristas, P., Czikkova, S., Javorsky, P. (1998) A bacteriocin-mediated antagonism by *Enterococcus faecium* BC25 against ruminal *Streptococcus bovis*. *Microbiological Research*. 153: 277-281.
51. Sánchez Valenzuela., A., Díaz Ruiz, G., Ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas López, R., Martínez Cañamero, M., Ortega, E., Gálvez, A. (2008) Inhibition of food poisoning and pathogenic bacteria by *Lactobacillus plantarum* strain 2.9 isolated from ben salga, both in a culture medium and food. *Food Control*. 19: 842-848.