



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**Expresión del gen estructural e inductor de la
bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* y
su efecto en la variación de la actividad
antimicrobiana**

T E S I S
Para obtener el grado de
Maestra en Biotecnología
P r e s e n t a:

I.A. Luz Adriana López Arvizu

Directora de Tesis: Dra. Edith Ponce Alquicira

Asesores:

Dr. Israel García Cano

Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes

México D.F. Julio, 2015



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

Fecha : 24/07/2015
Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA de la alumna LUZ ADRIANA LOPEZ ARVIZU, matrícula 2133801904, quien cumplió con los 140 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha veintisiete de julio del 2015 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

EXPRESION DEL GEN ESTRUCTURAL E INDUCTOR DE LA BACTERIOCINA PRODUCIDA POR *Enterococcus faecium* Y SU EFECTO EN LA VARIACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 180 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobado

JURADO

Presidenta

Secretaria

Gabriela Mariana Rodríguez Serrano

DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ
SERRANO

Teresita del Rosario Sainz Espuñes

DRA. TERESITA DEL ROSARIO SAINZ
ESPUÑES

Vocal

Vocal

Israel García Cano

DR. ISRAEL GARCIA CANO

Carolina Peña Montes

DRA. CAROLINA PEÑA MONTES

México D.F. a 27 de Julio del 2015.

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

**Expresión del gen estructural e inductor de la bacteriocina producida por *Enterococcus
faecium* y su efecto en la variación de la actividad antimicrobiana**

que presentó:

I.A. Luz Adriana López Arvizu



Comité tutorial:

Director: Dra. Edith Ponce Alquicira



Asesor: Dr. Israel García Cano



Asesor: Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes



Sinodales:

Dr. Francisco José Fernández Perrino
Biología UAM-Iztapalapa



Dra. Carolina Peña Montes
Alimentos y Biotecnología, Fac. de Química UNAM



“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465 en el nivel internacional.”

DEDICATORIA

A mi HIJA

Tesoro preciado, regalo inmerecido de Dios.

Porque has llenado mi vida de bellos momentos. Has sido el principal motivo de superación en esta lucha por la vida.

Eres alegría y luz en mi camino, entusiasmo y optimismo en días difíciles.

Hermosa, amiga mía, te dedico este logro diciéndote que el esfuerzo, la paciencia, la honestidad, la constancia y la humildad siempre acompañen todas las cosas que emprendas en la vida.

Te quiero Madi

AGRADECIMIENTO

Gracias Dios por amarme. Porque has puesto a mi lado a un hombre maravilloso; mi amado Jacob, quien me ha apoyado en todas mis decisiones y me ha acompañado con cariño y paciencia en este logro. Gracias por mi hija Madai que con cariño y comprensión me alienta.

Por darme unos padres: Evita y Nazario, que siempre me impulsan a ser mejor sin olvidarme de la humildad. Te doy gracias Dios también por mis hermanos: Eli, Laura e Israel, quienes se alegran y comparten cada triunfo en mi vida.

Gracias te doy Dios mío porque has puesto en mi camino personas tan bendecidas como la Dra. Edith Ponce, que me brinda su apoyo, me orienta y corrige con especial cuidado; gracias por la Dra. Tere, que con tal gentileza me ha brindado su ayuda. Te agradezco el apoyo de la Dra. Jeny; y como no agradeceré la amistad y asesoría ilimitada del Dr. Israel García Cano.

Te agradezco la vida de todas las personas con las que he compartido experiencias a lo largo de estos dos años, cada una de ellas ha sido valiosa e indispensable en este trayecto, ya que han aportado maravillosas lecciones de vida en la realización de mis logros.

Gracias Señor Jesucristo por ser la piedra angular en mi vida, por caminar conmigo y mostrarme tus misericordias cada mañana.

ÍNDICE GENERAL

Contenido

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1.1 Características generales de las BAL	3
1.1.2 Importancia tecnológica de las BAL	5
1.1.3 Compuestos antimicrobianos producidos por BAL	5
1.2 Clasificación y géneros representativos de BAL	6
1.2.1 Género <i>Enterococcus</i>	7
1.2.2 Importancia biotecnológica de los <i>Enterococcus</i>	7
1.3 Bacteriocinas	8
1.3.1 Características generales de bacteriocinas	10
1.4 Clasificación de bacteriocinas	11
1.5 Modo de acción de las bacteriocinas	15
1.6 Biosíntesis de bacteriocinas	17
1.7 Producción y secreción de bacteriocinas	20
1.8 Factores que contribuyen al efecto antagonico de las bacteriocinas	21
1.9 PCR en tiempo real	22
1.9.1 Cuantificación Relativa	23
2 ANTECEDENTES	24
3 JUSTIFICACIÓN	26
4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	28
4.1 HIPÓTESIS	28
4.2 OBJETIVO GENERAL	28
4.2.1 Objetivos específicos	28
5 METODOLOGÍA	29
5.1 Metodología General	29

Etapa 1	29
5.2 Condiciones de crecimiento de las cepas.....	29
5.2.1 Crecimiento de las cepas <i>Enterococcus faecium</i>	29
5.2.2 Crecimiento de la cepa <i>Listeria innocua</i> ATCC33090.....	30
5.3 Obtención del extracto crudo.....	30
5.4 Determinación de la actividad inhibitoria.....	31
5.5 Extracción de DNA.....	32
5.6 PCR (Reacción en cadena de la DNA polimerasa)	32
5.7 Extracción de RNA.....	34
5.8 Cuantificación de mRNA.....	36
5.8.1 RT (Retro-Transcripción)	36
5.8.2 PCR en tiempo real	36
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1 Determinación de la actividad antimicrobiana.....	39
6.1.1 Efecto de etanol en cepas de <i>Enterococcus faecium</i>	45
6.1.2 Efecto de H ₂ O ₂ en cepas de <i>Enterococcus faecium</i>	49
6.1.3 Efecto de NaCl en cepas de <i>Enterococcus faecium</i>	53
6.2 Identificación molecular de cepas y genes	57
6.2.1 Obtención del DNA total.....	57
6.2.2 Amplificación del 16S rDNA.....	58
6.2.3 Secuenciación de 16S rDNA	58
6.2.4 Amplificación del gen <i>entA</i>	59
6.2.5 Secuenciación del gen <i>entA</i>	60
6.3 Cinética de crecimiento y determinación de la actividad antimicrobiana de la cepa MXVK29	62
6.4 Obtención de RNA de la cepa MXVK29	65
6.5 RT (Retro-Transcripción).....	66
6.6 PCR en tiempo real	68
6.5.1 Estandarización de qPCR con SYBR Green.....	68
6.5.2 Validación del gen de referencia.....	70
6.5.3 Cuantificación relativa por el método CT comparativo.....	71

8. CONCLUSIONES	82
9 PERSPECTIVAS	83
10 TRABAJO PRESENTADO	84
11 REFERENCIAS	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular producidos por bacterias lácticas.	6
Tabla 2. Clasificación de bacteriocinas	12
Tabla 3. Cebadores universales utilizados para amplificar el gen 16S rDNA	33
Tabla 4. Cebadores universales utilizados para amplificar gen <i>entA</i>	33
Tabla 5. Composición de las reacciones de amplificación	34
Tabla 6. Cebadores utilizados para amplificar 92 pb del gen 16S rDNA	37
Tabla 7. Parámetros de la cinética de crecimiento de <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29 en presencia de etanol	39
Tabla 8. Parámetros de la cinética de crecimiento de <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29 en presencia de H ₂ O ₂	40
Tabla 9. Parámetros de la cinética de crecimiento de <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29 en presencia de cloruro de sodio.	40
Tabla 10. Parámetros de la cinética de crecimiento de <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en presencia de etanol.....	41
Tabla 11. Parámetros de la cinética de crecimiento de <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en presencia de H ₂ O ₂	42
Tabla 12. . Parámetros de la cinética de crecimiento de <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en presencia de cloruro de sodio.	42
Tabla 13. Análisis de la varianza de la actividad antimicrobiana de <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en presencia de etanol	48
Tabla 14. Comparación de medias por Duncan de la actividad antimicrobiana de <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en presencia de etanol	48
Tabla 15. Análisis de la varianza de la actividad antimicrobiana de <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en presencia de peróxido	51
Tabla 16. Comparación de medias por Duncan de la actividad antimicrobiana de <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en presencia de peróxido.....	52
Tabla 17. Análisis de la varianza de la actividad antimicrobiana de <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en presencia de NaCl	55
Tabla 18. Comparación de medias por Duncan de la actividad antimicrobiana de <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en presencia de NaCl	55
Tabla 19. Resultado de BLAST en la base de datos del NCBI del 16S rDNA de cepas de <i>Enterococcus faecium</i>	59
Tabla 20. Resultado de BLAST en la base de datos del NCBI para el gen <i>entA</i> de la cepa <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29.....	61
Tabla 21. Resultado de BLAST en la base de datos del NCBI para el gen <i>entA</i> de la cepa <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3	61
Tabla 22. Análisis de la varianza de la actividad antimicrobiana de <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29.....	63
Tabla 23. Comparación de medias por Duncan de la actividad antimicrobiana de <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29	64
Tabla 24. Resultado de BLAST en la base de datos del NCBI para los genes <i>entA</i> , <i>entF</i> y gen de referencia de la cepa <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29.....	67

Tabla 25. Datos de CT y linearización de diluciones del calibrador para la validación de eficiencias de los genes <i>entA</i> , <i>entF</i> y gen de referencia de la cepa <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29	70
Tabla 26. Eficiencias para los genes <i>entA</i> , <i>entF</i> y gen de referencia de la cepa <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29	71
Tabla 27. Cuantificación relativa en n° de veces de expresión de los genes <i>entA</i> , <i>entF</i> de la cepa <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29 por el método CT comparativo	75
Tabla 28. Cálculo de las diferencias en no. de veces de expresión de los genes <i>entA</i> , <i>entF</i> de la cepa <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29 por el método CT comparativo (Ensayo 2).....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de las bacteriocinas de la clase IIa	14
Figura 2. Subclase 1 de bacteriocinas tipo IIa	15
Figura 3. Modo de acción de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas	16
Figura 4. Síntesis y regulación de la enterocina A	19
Figura 5. Proceso de la técnica PCR-tiempo real	22
Figura 6. Esquema general de trabajo	29
Figura 7. Representación de halos observados por la técnica de difusión en agar	44
Figura 8. <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29 en presencia de 1% de etanol	45
Figura 9. <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en presencia de 1% etanol	46
Figura 10. <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en presencia 2% etanol	46
Figura 11. <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en presencia de 3% etanol	47
Figura 12. <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en presencia de 6% etanol	47
Figura 13. Gráficos de medias de la actividad antimicrobiana de <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en relación a la adición etanol y tiempo de cultivo.	48
Figura 14. <i>Enterococcus faecium</i> UAMI 3 en presencia de 0.5 mM H ₂ O ₂	49
Figura 15. <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en presencia de 2 mM H ₂ O ₂	50
Figura 16. <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en presencia de 3.5 mM H ₂ O ₂	50
Figura 17. <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en presencia de 5 mM H ₂ O ₂	51
Figura 18. Gráficos de medias de la actividad antimicrobiana de <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en relación a la adición peróxido y tiempo de cultivo	52
Figura 19. <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en presencia de 1% NaCl	53
Figura 20. <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en presencia de 2% NaCl	53
Figura 21. <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en presencia de 3% NaCl	54
Figura 22. <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en presencia de 6% NaCl	54
Figura 23. . Gráfico de medias de la actividad antimicrobiana de <i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3 en relación a la adición de NaCl y tiempo de cultivo.	55
Figura 24. DNA total de cepas de <i>E. faecium</i>	57
Figura 25. 16S rDNA de cepas de <i>E. faecium</i> amplificado por PCR	58
Figura 26. Genes que codifican para enterocinas de cepas de <i>E. faecium</i> amplificados por PCR	60
Figura 27. Crecimiento celular y actividad antimicrobiana de <i>E. faecium</i> MXVK29	63
Figura 28. Gráfico de medias de la actividad antimicrobiana de <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29 en relación al tiempo de cultivo.	64
Figura 29. Perfil electroforético de RNA total de <i>E. faecium</i> MXVK29	65
Figura 30. Perfil electroforético de fragmentos de DNA de <i>E. faecium</i> MXVK29, en diferentes puntos del crecimiento celular (8, 16, 24h)	66
Figura 31. Curvas Melt de cDNA de <i>E. faecium</i> MXVK29 con diluciones a partir del calibrador (tiempo 0 de cultivo) para cada uno de los genes <i>entA</i> , <i>entF</i> y gen de referencia	69
Figura 32. Validación del gen de referencia para la cuantificación de los genes <i>entA</i> y <i>entF</i> de la cepa <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29	70
Figura 33. Amplificación de <i>entA</i> por PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green para cDNA de <i>E. faecium</i> MXVK29 a las 0, 8, 12, 16 h.	72
Figura 34. Amplificación de <i>entA</i> por PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green para cDNA de <i>E. faecium</i> MXVK29 a las 18, 20 y 24 h.	72

Figura 35. Amplificación de <i>entF</i> por PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green para cDNA de <i>E. faecium</i> MXVK29 a las 8, 12, 16 y 18 h.	73
Figura 36. Amplificación de <i>entF</i> por PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green para cDNA de <i>E. faecium</i> MXVK29 a las 20, 24 y 0 h.	73
Figura 37. Amplificación del gen de referencia por PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green para cDNA de <i>E. faecium</i> MXVK29 a las 12, 16, 18 y 20 h.	74
Figura 38. Amplificación del gen de referencia por PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green para cDNA de <i>E. faecium</i> MXVK29 a las 24, 0 y 8 h.	74
Figura 39. Cuantificación relativa del gen <i>entA</i> de <i>E. faecium</i> MXVK29 en número de veces de diferencia de expresión por el método CT comparativo, PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green.	75
Figura 40. Cuantificación relativa del gen <i>entF</i> de <i>E. faecium</i> MXVK29 en número de veces de diferencia de expresión por el método CT comparativo, PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green.	76
Figura 41. Amplificación de <i>entA</i> por PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green para cDNA de <i>E. faecium</i> MXVK29 a las 0, 8, 12, 16, 18, 20 y 24 h (Ensayo 2).	77
Figura 42. Amplificación de <i>entF</i> por PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green para cDNA de <i>E. faecium</i> MXVK29 a las 0, 8, 12, 16, 18, 20 y 24 h (Ensayo 2).	78
Figura 43. Amplificación del gen de referencia por PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green para cDNA de <i>E. faecium</i> MXVK29 a las 0, 8, 12, 16, 18, 20 y 24 h (Ensayo 2).	78
Figura 44. Cuantificación relativa del gen <i>entA</i> de <i>E. faecium</i> MXVK29 en no. veces de diferencia de expresión por el método CT compartivo, PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green (Ensayo 2)	79
Figura 45. Cuantificación relativa del gen <i>entF</i> de <i>E. faecium</i> MXVK29 en no. veces de diferencia de expresión por el método CT comparativo, PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green (Ensayo 2)	80

RESUMEN

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana. Entre los microorganismos productores de bacteriocinas, las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido ampliamente estudiadas, destacando la nisina, las pediocinas y enterocinas, entre otras. Dentro del grupo de las enterocinas, la enterocina A es producida por *Enterococcus faecium* y se caracteriza por presentar inhibición contra *Listeria monocytogenes*, además su regulación está mediada por sistemas de transducción de señales. Los factores que activan estos sistemas incluyen la presencia de otra bacteria competidora o algún tipo de estrés, como pueden ser: la acidificación, adición de NaCl, etanol y peróxido de hidrógeno, entre otros. El objetivo de este trabajo fue evaluar la correlación de la variación en la actividad antimicrobiana y la expresión génica del inductor y gen estructural de la enterocina A por medio de PCR en tiempo real.

Para cumplir el objetivo de este trabajo, se incubaron las cepas a 35°C en medio CGB con adición de cloruro de sodio (1-6%), etanol (1-6%) y peróxido de hidrógeno (0.5-5 mM), tomando como control un cultivo sin adición de alguna sustancia. Se obtuvieron extractos crudos de cada uno de los cultivos a las 8, 16 y 24 h, los cuales se sometieron a la técnica de difusión en agar y se determinó la concentración de proteína total por el método de Bradford, reportando la actividad antimicrobiana como mm del halo de inhibición/mg prot., observando variación en la actividad de la cepa UAMI-3, mientras que la cepa MXVK29 no presentó actividad antimicrobiana en las condiciones de estrés evaluadas.

Al realizar las amplificaciones de los genes a cuantificar (*entA*, *entF*), la cepa UAMI-3 no amplificó para el gen *entA*, es decir, la proteína causante de la actividad inhibitoria no es la enterocina A, sin embargo, se observó el estímulo causado por el estrés aplicado. La cuantificación relativa por PCR en tiempo real se llevó a cabo para la cepa MXVK29 a diferentes tiempos de cultivo (8, 12, 16, 18, 20 y 24 h) observando un máximo de expresión de ambos genes a las 24 h, lo que concuerda con el máximo determinado de actividad antibacteriana por la técnica de difusión en agar, con una tendencia de expresión promedio de 7:1 (*entF*: *entA*).

Palabras clave: BAL, bacteriocinas, *Enterococcus faecium*

ABSTRACT

Bacteriocins are peptides with antimicrobial activity. Among the microorganisms producing bacteriocin, lactic acid bacteria (LAB) are widely studied. The enterocina A, is a peptide produced by *Enterococcus faecium*, which presents inhibition against *Listeria monocytogenes*. Its regulation is mediated through signal transduction systems. The factors that activate these systems include, the presence of other competing bacteria or some form of stress, such as: acidification, addition of NaCl, ethanol and hydrogen peroxide, among others. The aim of this study was to evaluate the correlation of the variation in antimicrobial activity and the gene expression of inductor and structural gene of enterocin A, by real time PCR.

To meet the objective of this work, the strains were grown at 35°C in CGB with added sodium (1-6%), ethanol (1-6%) and hydrogen peroxide (0.5-5mM) chloride, as control condition a culture without addition of any substance was chosen. Crude extracts of each culture at 8, 16 and 24 h were obtained, which were subjected to agar diffusion technique and to total protein quantification assay by the Bradford method. Antimicrobial activity was reported as an inhibition halo (mm / mg protein). It was observed a variation in antimicrobial activity in the UAMI-3 strain, while no variation in the strain MXVK29 for all the stress conditions evaluated.

After performing amplifications of genes to quantify (*entA*, *entF*), the UAMI-3 strain not showed amplification for the gene *entA*, which means that the protein causing inhibitory activity is not enterocina A. However, it was observed the stimulation caused by the stress applied. The relative quantification by real time PCR was performed for MXVK29 strain culture at different times (8, 12, 16, 18, 20 and 24 h), it was observed a maximum expression of both genes at 24h, which is consistent with the maximum antibacterial activity determined by the agar diffusion method, noting a trend of average expression ratio of 7: 1 (*entF:entA*).

Keywords: BAL, bacteriocins, Enterococcus faecium

1 INTRODUCCIÓN

Los alimentos pueden actuar como vehículos de diversos tipos de microorganismos patógenos y alterantes que causan deterioro en periodos relativamente cortos; por ello, la industria alimentaria tiene la necesidad de diseñar técnicas de conservación que permitan aumentar la vida útil, sin alterar las características fisicoquímicas, sensoriales y el valor nutricional (Bedolla, 2004).

En las últimas décadas se han desarrollado tecnologías enfocadas al mantenimiento y conservación de los alimentos de manera “natural”, con el fin de encontrar productos con mayor vida útil y a la vez ofrecer al consumidor alimentos con mínimo procesamiento (Camargo *et al.*, 2009).

Dentro de estas tecnologías se encuentran las bacterias ácido lácticas (BAL), utilizadas principalmente como cultivos iniciadores en la elaboración de productos lácteos y productos cárnicos fermentados y las más ampliamente estudiadas como productoras de bacteriocinas (Doyle y Beuchat, 2007). Estos compuestos son péptidos antimicrobianos, producidos como una estrategia de competencia por nutrientes. Su utilización en alimentos está encaminada a reducir los niveles de microorganismos patógenos presentes, alargando su vida útil (Cheftel, 1995), aunque tienen el potencial de cubrir un campo muy amplio de otras aplicaciones, como el sector médico.

De las bacteriocinas sintetizadas por BAL, la nisina es la única aplicada a nivel comercial. Se ha utilizado como bioconservador de alimentos, además es considerada como producto seguro con nivel GRAS (generalmente reconocidos como seguros, por sus

siglas en inglés) y con autorización para su aplicación por la FDA (Food and Drug Administration) Aunque en México no existe una legislación para bacteriocinas, el acuerdo por el que se determinan los aditivos en alimentos publicado en DOF (Diario Oficial de la Federación) en 2012 refiere lo establecido por la FDA (Chen y Hoover, 2003).

La adición de bacteriocinas en los alimentos representa una excelente estrategia para el control de bacterias patógenas perjudiciales para la salud humana, como son *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolítica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Bacillus cereus*, entre otras (De la Fuente y Barboza, 2010).

La enterocina A, es un péptido antimicrobiano producido principalmente por *Enterococcus faecium* que presenta inhibición contra *L. monocytogenes* (Yahua, 2012).

1.1 Bacterias ácido lácticas

El conocimiento de cultivos lácticos se originó en el siglo XVIII, cuando agricultores de África, Asia y Europa observaron el comportamiento de la leche cruda en los meses cálidos. La leche coagulaba y bajo estas condiciones presentaba un sabor diferente, en ocasiones agradable, entonces los campesinos fueron seleccionando las de mejor sabor. Sin embargo, el concepto de BAL fue desarrollado en los primeros años del siglo pasado. El nombre fue creado a partir de observaciones de las bacterias causantes de la fermentación y coagulación de la leche, siendo definidas en 1919 por Orla-Jensen como “aquellas que forman un grupo natural de cocos y bacilos Gram-positivos, inmóviles, no esporulados que fermentan azúcares produciendo ácido láctico” (Bouzar *et al.*, 1997; Bertrand, 2003; Blanco *et al.*, 2006).

En la industria de los alimentos, las BAL se emplean principalmente como cultivos iniciadores para la elaboración de productos lácteos tales como yogur, leches mantequillas, quesos madurados, col agria, embutidos (salami y chorizo) y bebidas alcohólicas como la cerveza y sidra, entre otros, produciendo cambios específicos en el aroma, sabor, textura, cuerpo, acidez, humedad, digestibilidad y aspecto de los mismos (Hammes y Tichaczek, 1994; Leveau y Bouix, 2000; Doyle y Beuchat, 2007).

1.1.1 Características generales de las BAL

Las BAL poseen características ecológicas y metabólicas de importancia económica y tecnológica en los alimentos. Su clasificación se basa en la morfología, la forma de fermentar la glucosa, su desarrollo a diferentes temperaturas, la configuración del ácido

láctico producido, la habilidad de crecer a altas concentraciones de sal y su tolerancia a la acidez.

La mayoría de las BAL sólo pueden obtener energía a partir de azúcares y otros compuestos relacionados. Debido a su limitada capacidad biosintética, estos microorganismos son muy exigentes nutricionalmente y requieren factores de crecimiento complejos como aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Martínez Fernández, 1996). Por lo tanto se localizan frecuentemente en hábitats ricos en nutrientes, caracterizados por la presencia de carbohidratos solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas, y con bajas tensiones de oxígeno como: la leche y productos lácteos, productos cárnicos y vegetales fermentados, frutas y hortalizas frescas, ensilados, pescado y derivados de la pesca (Monroy-Dosta *et al.*, 2009).

En la actualidad, el grupo de las BAL está conformado por cocos, cocobacilos o bacilos Gram-positivos, generalmente inmóviles y no esporulados, catalasa y oxidasa negativas, obtienen energía exclusivamente por fermentación de azúcares produciendo ácido láctico y son anaerobias o aerotolerantes (Madigan *et al.*, 2004).

La mayoría de las BAL son mesófilas, aunque algunas son capaces de crecer a temperaturas de 5°C y 45°C. Toleran bien concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajos que el resto de las bacterias (algunas pueden crecer a pH 3, otras entre 6 y 9, pero la mayoría crece a un pH entre 4 y 4.5), además pueden crecer a altas concentraciones de sal. (Jay, 2000; Axelsson, 2004).

1.1.2 Importancia tecnológica de las BAL

Las BAL son microorganismos importantes, industrialmente reconocidas por su capacidad de conservación así como por sus beneficios para la salud y nutrición. Inicialmente se utilizaron para retardar el deterioro y preservar los alimentos a través de fermentaciones naturales, posteriormente se fueron encontrando aplicaciones comerciales como cultivos iniciadores para la industria lechera, cárnica, en elaborados vegetales y en bebidas fermentadas (Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2010).

En las dos últimas décadas las BAL han recibido mucha atención, particularmente los géneros utilizados como cultivos iniciadores. Las investigaciones se enfocan en el aislamiento e identificación de nuevas cepas con el fin de estudiar su potencial uso como cultivos iniciadores (Alvarado, 2000).

1.1.3 Compuestos antimicrobianos producidos por BAL

Las bacterias lácticas son microorganismos GRAS (Gould, 1996) y son conocidas por producir, durante su crecimiento, sustancias que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Esta característica se utiliza para la inhibición de bacterias indeseables o patógenas en la fabricación de los alimentos. Entre los principales metabolitos que producen las bacterias lácticas están compuestos de bajo peso molecular como ácidos orgánicos, diacetilo, reuterina, acetaldehído, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Leveau y Bouix, 2000).

En la tabla 1 se describen las sustancias con actividad antibacteriana, producidas por BAL.

Tabla 1. Compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular producidos por bacterias lácticas.

Compuestos	Microorganismos productores	Microorganismos sensibles
Ácido láctico	Todas las bacterias lácticas	Todos los microorganismos
Ácido acético	Bacterias lácticas heterofermentativas	Todos los microorganismos
Alcoholes	Levaduras, bacterias lácticas heterofermentativas	Todos los microorganismos dependientes del pH
CO₂	Bacterias lácticas heterofermentativas	La mayoría de los microorganismos
Diacetilo	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Amplio espectro: bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas y hongos
Peróxido de hidrógeno	Algunas bacterias anaerobias facultativas, la mayoría de las aerobias incluyendo <i>Pseudomonas sp.</i> y <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Microorganismos dependientes de las moléculas que contienen hierro
Ácido benzoico Ácido mevalónico Lactona Metilhidantoina	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pantoea agglomerans</i> (bacteria Gram-negativa), <i>Fusarium avenaceum</i>

Fuente: Helander *et al.*, 1997

1.2 Clasificación y géneros representativos de BAL

El grupo de las BAL está comprendido por aproximadamente 20 géneros, siendo los más representativos: *Carnobacterium*, ***Enterococcus***, *Lactococcus*, *Lactosphaera*,

Leuconostoc, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* (Davidson *et al.*, 1995; Axelsson, 2004).

Aunque el grupo está definido con poca exactitud, todos los representantes comparten la propiedad de producir ácido láctico a partir de las hexosas.

Según la fermentación de la lactosa las BAL se clasifican en homofermentativas y heterofermentativas (Jay, 2000).

1.2.1 Género *Enterococcus*

El término “enterococo” fue utilizado por primera vez en 1899 por Thiercelin, para referirse a un diplococo Gram-positivo encontrado en el intestino humano.

El género *Enterococcus* pertenece al grupo de bacterias ácido lácticas Gram-positivas, no forman esporas, son catalasa negativos, oxidasa negativos, anaerobios facultativos y con forma de cocos simples, agrupados por pares o en cadenas, presenta crecimiento óptimo a temperaturas de 35°C, aunque algunas especies del género crecen a temperaturas de 10 – 45°C, en presencia de NaCl al 6.5%, a pH 9.6 y pueden sobrevivir a tratamientos de 60°C durante 30 min. Además son capaces de producir enterocinas efectivas contra muchas bacterias lácticas y algunos microorganismos deteriorantes y patógenos como listerias (Villani *et al.*, 1993; Aymerich *et al.*, 1996; Du Toit *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2002; Foulquié *et al.*, 2003; Abriouel *et al.*, 2005; Kang y Lee, 2005).

1.2.2 Importancia biotecnológica de los *Enterococcus*

Los enterococos se han utilizado desde hace años en la producción de alimentos por su importante contribución al desarrollo del aroma en quesos y productos cárnicos, como

probióticos en alimentos para humanos y animales y como cultivos bioprotectores en productos lácteos y cárnicos (Aymerich *et al.*, 2000a).

La resistencia de los enterococos a temperaturas de pasteurización, y su adaptabilidad a diferentes sustratos y condiciones de crecimiento (temperaturas bajas y altas, pH extremo, salinidad) implican que pueden ser encontrados en cualquier producto alimenticio fabricado a partir de materias primas crudas como leche o carne, y en alimentos sometidos a un tratamiento térmico. Esto significa que esta bacteria puede soportar las condiciones a las que es sometido un alimento durante su producción, y que los enterococos pueden ser parte habitual de la microbiota del alimento terminado, especialmente quesos y carnes fermentadas (Álvarez, 2008).

1.3 Bacteriocinas

La primera bacteriocina fue identificada por Gratia en 1925 como una proteína antimicrobiana producida por *Escherichia coli* y nombrada colicina. El término “bacteriocinas” fue propuesto por primera vez por Jacob y colaboradores en 1953 para referirse a las sustancias proteicas con actividad antimicrobiana de origen bacteriano (Marcos *et al.*, 2013). Recientemente se han definido como “péptidos termoestables producidos por bacterias que son activos contra otras bacterias, y su producción tiene un mecanismo de inmunidad específico” (Cotter *et al.*, 2005).

Aunque las bacteriocinas se pueden encontrar en numerosas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, las producidas por las BAL son las más utilizadas en la industria de alimentos. Esta tendencia refleja la creciente conciencia de los consumidores de los

riesgos que se derivan no sólo de los agentes patógenos transmitidos por los alimentos, sino también de los conservantes químicos usados para controlarlos. Por el contrario, el uso de BAL y/o sus metabolitos para la conservación de alimentos es generalmente aceptado por los consumidores como algo natural y benéfico para la salud (Parra-Huertas, 2010).

Los criterios para considerar a un compuesto antimicrobiano producido por microorganismos Gram-positivos como bacteriocinas, son:

- ✓ Un estrecho espectro inhibitorio de actividad, fundamentalmente sobre especies filogenéticamente relacionadas a la especie productora.
- ✓ La presencia de un sitio proteico biológicamente activo.
- ✓ Un mecanismo de acción bactericida (produce muerte) o bacteriostático (que impide crecimiento).
- ✓ La unión a receptores específicos celulares.
- ✓ La producción de bacteriocina por determinantes genéticos ligados a plásmidos o cromosomas y la inmunidad de la célula productora frente a su propia bacteriocina (Tagg *et al.*, 1976).

González *et al.* (2003) señalaron que la acción antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimentaria, ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos puros que en un momento dado podrían reemplazar a los conservadores químicos (ya que tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman derivados tóxicos).

1.3.1 Características generales de bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos, en su mayoría termoestables, con actividad antimicrobiana, sintetizados ribosomalmente por BAL como parte de su mecanismo de defensa. Son activas en amplios valores de pH, solubles en agua, no imparten sabor o aromas, tienen efecto bactericida o bacteriostático y espectro de inhibición característico en cada una de ellas (Nettles, 1993; Fernández, 2000).

En la mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL se ha demostrado cierta resistencia al calentamiento, pudiendo tolerar tratamientos equivalentes al de pasteurización. La resistencia a la temperatura, sin embargo, depende del estado de purificación de la bacteriocina, decreciendo en bacteriocinas purificadas y parcialmente purificadas (Martin, 2002).

Las bacteriocinas se inactivan, al menos, por una enzima proteolítica de origen pancreático (tripsina y alfa-quimiotripsina) y gástrico (pepsina), característica que hace de estos metabolitos bacterianos sustancias seguras para ser incluidas como biopreservantes de los alimentos, puesto que serían inactivadas durante su paso por el tracto gastrointestinal. Adicionalmente, se han encontrado otras bacteriocinas sensibles a enzimas no proteolíticas, como la leuconocina S que se inactiva por una amilasa (Vázquez *et al.*, 2009).

Todas las bacteriocinas tienen un componente proteico esencial para su función bactericida. Existen algunas bacteriocinas que contienen varias cadenas de aminoácidos en su estructura o incluso están unidas a otras macromoléculas (lípidos o carbohidratos).

Las bacteriocinas presentan en su estructura conglomerados de aminoácidos cargados positivamente. Los residuos de aminoácidos tienen funciones específicas dentro de la proteína, como es el caso de la lantionina, donde confieren una mayor estabilidad en la conformación de la bacteriocina. En otros casos, como la deshidroalanina, deshidrobutirina y la cistina (Cys-Cys) proveen a la molécula de grupos reactivos que incrementan su actividad biológica. Las bacteriocinas que contienen lantibióticos en su estructura presentan conformaciones bastante similares. Son péptidos helicoidales anfifílicos, con mayor flexibilidad en soluciones acuosas que en soluciones lipofílicas (Jack *et al.*, 1995; Cristobal, 2008).

La nisina tiene su máxima solubilidad y estabilidad a pH 2.0, disminuyendo en la medida que aumenta el pH e inactivándose irreversiblemente a pH 7.0, mientras que las lactoestreptocinas son estables y activas en un intervalo de pH de 4.2 a 5.0 y se inactivan reversiblemente entre pH 7.0 y 8.0. Por el contrario, muchas de las bacteriocinas producidas por BAL resisten a la exposición a un amplio intervalo de pH, entre 3.0 y 9.0. La tolerancia a valores de pH extremos entre 1.0 a 2.0 y 10.0 a 11.0 ha sido reportada para la acidocina B y la bavaracina A (Martin, 2002).

1.4 Clasificación de bacteriocinas

La clase I son los lantibióticos, que se modifican después de la traducción; son péptidos que contienen residuos lantionina y metil-lantionina. La Clase II consta de pequeños péptidos que no contienen residuos modificados. Cotter y colaboradores sugirieron en 2005 dividir la clase II de bacteriocinas en varias subclases: Clase IIa (bacteriocinas tipo pediocina), clase IIb (bacteriocinas de dos péptidos) y clase IIc (bacteriocinas circulares).

Sin embargo, otros han sugerido considerar las bacteriocinas circulares como una clase separada. La clase III de bacteriocinas, son grandes y termolábiles (Van *et al.*, 2002).

En la tabla 2 se muestra un compendio de Diez-Aldama (2011) y Marcos *et al.* (2013), quienes agruparon la clasificación de muchas de las bacteriocinas actualmente caracterizadas.

Tabla 2. Clasificación de bacteriocinas

Clase	Características	Subclase	Microorganismo Productor	Bacteriocina
I Lantibióticos	Péptidos pequeños (<5 kDa) termoestables activos a nivel de la membrana. Péptidos que contienen β-lantionina Modificados postraduccionalmente	IA: Péptidos lineales y catiónicos	<i>Lactococcus lactis</i>	Nisina A
			<i>Lactococcus lactis</i>	Nisina Z
			<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Epidermina
			<i>Lactobacillus sake</i>	Lactocina S
			<i>Lactococcus lactis</i>	Lacticina 481
		IB: Péptidos globulares e hidrófobos	<i>Bacillus subtilis</i>	Mersacidina
		<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	Cinamicina	
II No lantibióticos	Péptidos pequeños (<10 kDa) No lineales. No modificados postraduccionalmente. Termoestables. Actúan a nivel de la membrana	II a: Potente actividad inhibitoria frente a <i>Listeria</i>	<i>Leuconostoc gelidum</i>	Leucocina A
			<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediocina PA-1
			<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Mesenterocina Y105
			<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Acidocina A
			<i>Enterococcus faecium</i>	Enterocina A
			<i>Lactobacillus sake</i>	Sakacina A
			<i>Lactobacillus curvatus</i>	Curvacina A
			<i>Lactobacillus bavaricus</i>	Bavaricina A
			<i>Carnobacterium piscicola</i>	Pisicolicina 126
		II b: Compuesto por dos péptidos	<i>Lactococcus lactis</i>	Lactococcina G
			<i>Lactococcus lactis</i>	Lactococcina M
			<i>Lactobacillus casei</i>	Lactocina 705
			<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Lactacina F
			<i>Leuconostoc</i>	Leucocina A
			<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plantaricina A
			<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plantaricina S
			<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plantaricina EF
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plantaricina JK	
		II c: Requieren de un péptido líder	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Acidocina B
			<i>Carnobacterium piscicola</i>	Carnobacteriocina A
<i>Carnobacterium divergens</i>	Divergina A			

			<i>Enterococcus faecium</i>	Enterocina P
III	Péptidos grandes (>30 kDa)		<i>Lactobacillus helveticus</i>	Helveticina J
			<i>Enterococcus faecalis</i>	Enterolisina A
			<i>Lactobacillus helveticus</i>	Helveticina V-1829
IV	Bacteriocinas complejas, una parte proteica y una o más fracciones lípidicas o glicosídicas		<i>Clostridium beijerinckii</i>	Circularina A
			<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	Leuconocinas S
			<i>Lactobacillus helveticus</i>	Lactocina 27
V	De estructura circular, no modificadas postraduccionalmente		<i>Streptococcus faecalis</i>	Enterocina AS-48

Fuente: (Diez, 2011; Marcos *et al.*, 2013).

Las bacteriocinas clase Ila constan generalmente de 37-48 aminoácidos de longitud y se caracterizan por no tener un amplio espectro antimicrobiano; son potentes inhibidores de las especies de *Listeria* y muestran actividad a bajas concentraciones. Son estables al calor, y no sufren modificaciones después de la traducción más allá de la eliminación proteolítica de un péptido líder y la formación de un extremo N-terminal conservado con un puente disulfuro (aunque algunos miembros contienen un C-terminal de puente disulfuro adicional). La región N-terminal contiene una secuencia de aminoácidos característica YGNGV, aunque las variantes con la secuencia YGNGL alternas han sido también clasificadas en la clase Ila. Una bacteriocina clase Ila representante se muestra en la figura 1. Ha habido un número de revisiones exhaustivas que describen aspectos de la genética, la biosíntesis, la inmunidad, estructura, modo de acción y la aplicación de clase Ila de bacteriocinas en alimentos (Cintas *et al.*, 2000).

Las bacteriocinas de la clase Ila inhiben el desarrollo de las bacterias susceptibles formando poros en sus membranas, lo que resulta en la pérdida de la fuerza protón-motriz y el agotamiento de ATP. Se cree que estas bacteriocinas catiónicas son atraídas a las células bacterianas a través de una interacción electrostática inicial.

Posteriormente, la bacteriocina se inserta en la membrana a través de su extremo anfifílico C terminal e induce la formación de poros. Este mecanismo de acción depende de una manosa fosfotransferasa (MPT), complejo de proteína que se encuentra en las membranas de los organismos susceptibles, aunque la naturaleza exacta del mecanismo aún no está clara (Cintas *et al.*, 2000).

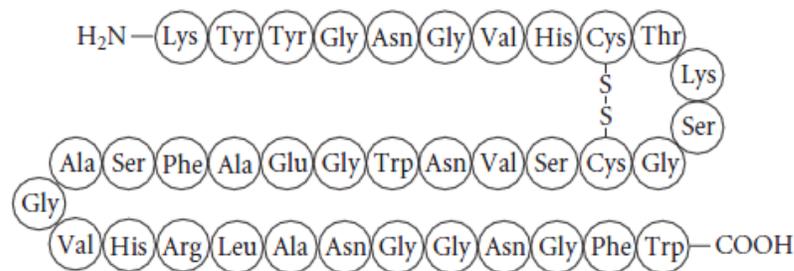


Figura 1. Representación de las bacteriocinas de la clase IIa (Leucocina A) (Cintas *et al.*, 2000) Recientemente se han definido nuevos esquemas de clasificación de bacteriocinas, que tienen en cuenta la composición, estructura tridimensional (3D) y el modo de acción de las mismas. La clasificación de las bacteriocinas de clase IIa ha sido ampliamente definida por primera vez con base en la región conservada N-terminal, la "caja pediocina", y luego subdividida en cuatro subclases con base en alineamientos de secuencias menos conservadas de la región C-terminal.

La enterocina A quedó clasificada dentro de la primera subclase (Figura 2).

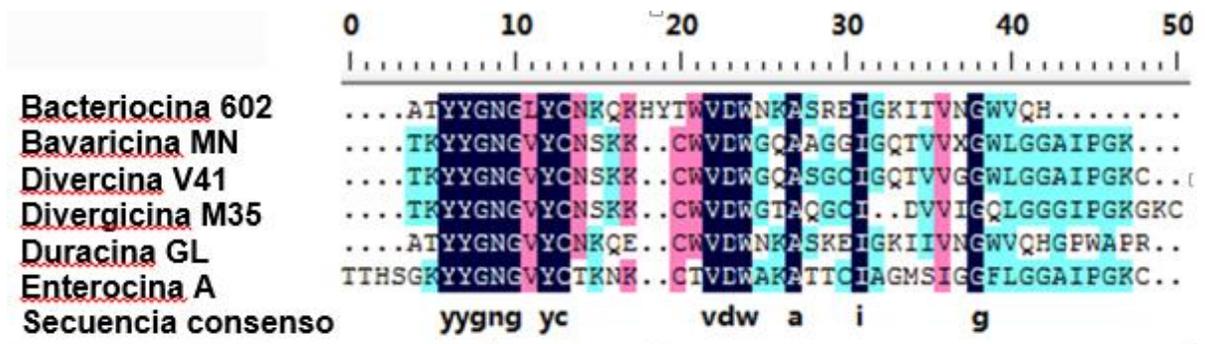


Figura 2. Subclase 1 de bacteriocinas tipo Ila (Yahua *et al.*, 2012)

1.5 Modo de acción de las bacteriocinas

El modo de acción de las bacteriocinas está determinado por la composición de la membrana citoplasmática, la estructura y la expresión de una proteína de inmunidad, además de la composición química del ambiente (Martínez, 2000; Monroy-Dosta *et al.*, 2009).

La formación de poros en la membrana citoplasmática de células sensibles es un mecanismo de acción común presentado por las bacteriocinas (González *et al.*, 2003), lo que provoca la salida de compuestos pequeños, pérdida de iones K^+ , ATP o la alteración de la fuerza motriz de protones. La pérdida de estas sustancias origina a su vez una pérdida potencial de membrana, consumo de las reservas energéticas celulares, descenso en la síntesis de DNA, RNA y proteínas, originando finalmente la inhibición o muerte celular (Vázquez *et al.*, 2009).

En la figura 3 se observa un modelo que muestra el mecanismo de acción dual de la nisina. En la etapa 1 la nisina posee una carga neta positiva que incrementa su interacción con las cargas negativas de los componentes de la pared celular. Posteriormente en la etapa 2, la nisina se une al lípido II (principal transportador de las

subunidades de peptidoglucano del citoplasma a la pared celular) interfiriendo con su síntesis, lo que llevaría a la bacteria a la muerte celular. Finalmente en la etapa 3, adicionalmente, varias moléculas de nisina utilizan al lípido II para anclarse e insertarse en la membrana celular y comenzar con la formación de los poros, lo que lleva a la bacteria a una rápida muerte celular.

En general, los péptidos de clase II tienen una estructura helicoidal anfifílica que les permite ser insertados en la membrana de la célula diana, lo que conduce a la despolarización y la muerte. La interacción inicial con los fosfolípidos de la membrana aniónica se lleva a cabo en el extremo N-terminal de los péptidos. El extremo C-terminal del péptido es más hidrofóbico y se cree que está involucrado en las interacciones hidrófobas con la membrana. Las grandes proteínas bacteriolíticas (o bacteriocinas de Clase III), como la lisostafina, pueden actuar directamente sobre la pared celular de las

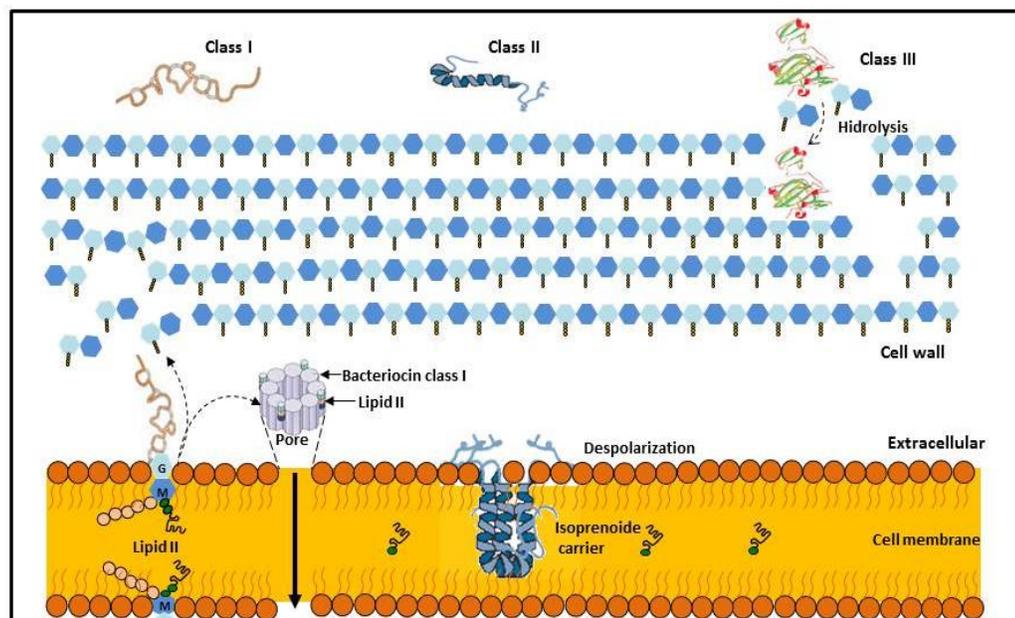


Figura 3. Modo de acción de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. GlcNAc=N-acetilglucosamina; MurNAc=ácido N-acetilmurámico (Álvarez, *et al.*, 2011).

células diana Gram-positivos, lo que lleva a la muerte y lisis celular. La figura 3 muestra el modo de acción propuesto para las bacteriocinas producidas por BAL.

1.6 Biosíntesis de bacteriocinas

La síntesis de bacteriocinas se produce generalmente, cuando las bacterias se encuentran en situaciones de estrés. Como es habitual en las rutas metabólicas de los microorganismos, la síntesis de las bacteriocinas también depende del ecosistema, pH, potencial de óxido-reducción, cantidad de nutrientes, fase de crecimiento, temperatura y oxígeno disponible (Cheftel, 1995).

Debido a su naturaleza proteica, las bacteriocinas son sintetizadas mediante mecanismos ribosomales que involucran transcripción y traducción. Los genes que codifican la producción de las bacteriocinas y la inmunidad a las mismas están usualmente organizados en grupos de operones localizados en el cromosoma o en plásmidos (Chen y Hoover, 2003; Yin *et al.*, 2003; Djamel *et al.*, 2006). Por lo menos cuatro genes son requeridos para la producción de bacteriocinas de la clase IIa: el gen estructural de la prebacteriocina, el gen de inmunidad, el gen que codifica para el sistema de secreción ABC de la bacteriocina y el gen de inducción (Ennahar *et al.*, 2000; Nes *et al.*, 2002).

Muchas bacteriocinas son sintetizadas biológicamente como un prepéptido inactivo que porta un péptido líder N-terminal. La biosíntesis de las bacteriocinas parte, en general, de la formación del prepéptido, el cual es modificado hasta obtenerse un prepéptido

maduro. Este prepéptido es llamado bacteriocina madura cuando cruza la membrana plasmática (Chen y Hoover, 2003).

El operón de la enterocina A (no lantibiótico) de *Enterococcus faecium* (Figura 4) contiene los genes que codifican la pre-enterocina (*entA*), además de los genes que codifican la proteína involucrada en la autoprotección de la cepa productora (*entI*), el gen de inducción de la síntesis de la bacteriocina (*entF*), los genes de las proteínas involucradas en su transporte extracelular (*entT* y *entD*), así como los genes de las proteínas involucradas en la regulación de la síntesis de la bacteriocina (*entK* y *entR*). En el caso de los lantibióticos, estos poseen adicionalmente los genes que codifican las enzimas de modificación de la bacteriocina. La regulación de la síntesis de las bacteriocinas está mediada por dos sistemas de transducción de señales constituidos por dos o tres componentes. Los factores que activan estos sistemas incluyen la presencia de otra bacteria competidora, estrés por temperatura o pH y un mecanismo de “censo poblacional” o “*quorum sensing*”. Un ejemplo interesante de esto es el sistema de tres componentes que regula la síntesis de la enterocina A de *E. faecium*, el cual está regulado por un mecanismo de censo poblacional. Este sistema incluye una proteína histidina-cinasa (HPK, por sus siglas en inglés *Histidine Protein Kinase*), situada en la membrana citoplásmica, la cual recibe y transduce señales extracelulares; un regulador de respuesta citoplásmica (RR, del inglés *Response Regulator*), el cual media una respuesta adaptativa que generalmente es un cambio en la expresión de los genes y un factor de inducción (IF, del inglés *Induction Factor*), cuya presencia es detectada por la proteína HPK.

En este caso, el sistema se dispara como una consecuencia del exceso del IF a través de una lenta acumulación durante el crecimiento celular, HPK detecta esta concentración e inicia la cascada de señales que activa la transcripción de los genes involucrados en la síntesis de la enterocina A (López *et al.*, 2008).

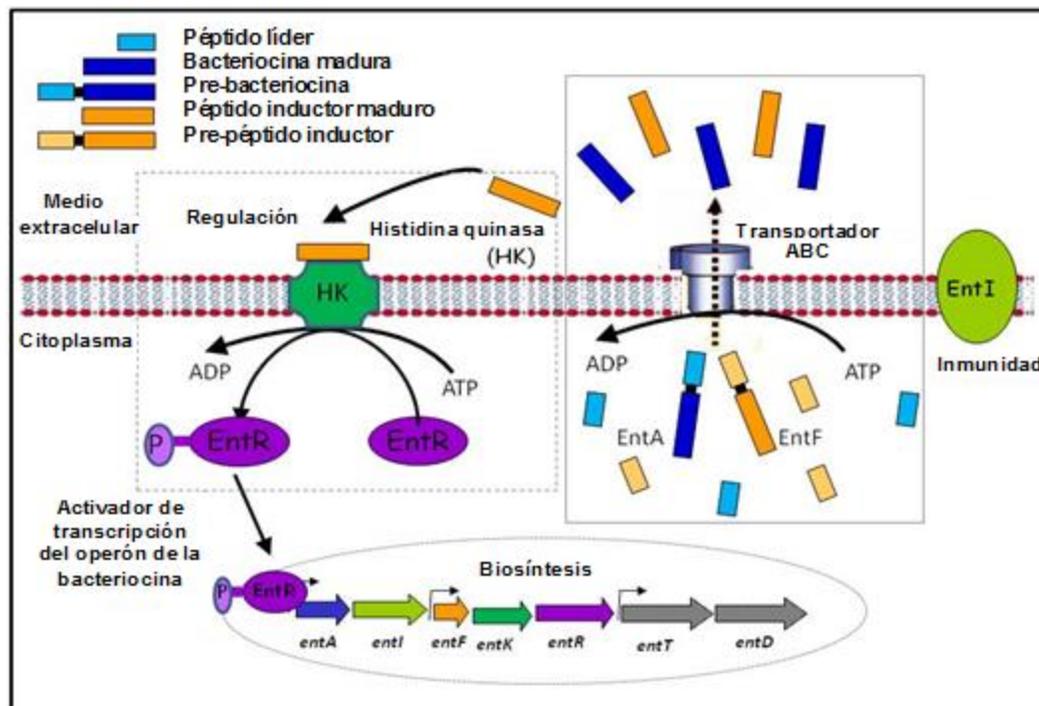


Figura 4. Síntesis y regulación de la enterocina A (Álvarez *et al.*, 2011).

Otros ejemplos de este tipo de regulación incluyen numerosos miembros de la clase II, como la sakacina P y la sakacina A de *Lactobacillus sakei*. Por otra parte, algunos ejemplos de regulación mediada por sistemas de dos componentes incluyen a numerosos antibióticos, por ejemplo, la subtilisina de *Bacillus subtilis* y la nisina de *L. lactis*. En estos sistemas, las bacteriocinas tienen una función dual ya que poseen actividad antimicrobiana y actúan como una molécula señal induciendo su propia síntesis (López *et al.*, 2008).

1.7 Producción y secreción de bacteriocinas

La producción de bacteriocinas depende del crecimiento y actividad fisiológica de la cepa productora. De hecho, la mayoría de las bacteriocinas que se han estudiado hasta el momento presentan una cinética característica de un metabolito primario y, en consecuencia, su producción está correlacionada con el aumento de la biomasa. Por otro lado, el control del pH a lo largo de la fermentación puede resultar en valores más altos de su actividad (Martínez, 1996).

La secreción de las bacteriocinas a través de la membrana citoplasmática se produce por la actividad de transportadores específicos de tipo ABC. Estos complejos proteicos presentan dos dominios claramente diferenciados: a) un dominio de unión a ATP en el extremo carboxilo, donde se genera la energía necesaria para el transporte mediante la hidrólisis de ATP y b) una región hidrofóbica e integrada en la membrana en el extremo amino que reconoce y transporta el sustrato. Los transportadores ABC de las bacteriocinas de la clase II contienen, además, un dominio con actividad proteolítica en su región amino que reconoce específicamente la secuencia consenso Gly-2-Gly-1. Por lo tanto, estos transportadores tienen una doble función: translocar la bacteriocina al exterior y actuar como peptidasas específicas (Martínez, 1996).

La producción de las bacteriocinas depende del crecimiento y actividad fisiológica de la cepa productora, estando correlacionada la biomasa obtenida con la cantidad de bacteriocina producida. Consecuentemente, la naturaleza de la cepa productora, la composición del medio de cultivo (relación entre carbono, nitrógeno y fósforo), las condiciones de fermentación (temperatura, tiempo de crecimiento, pH inicial y final,

generalmente entre 5.5 a 6.0, agitación, aireación, etc., son factores muy importantes que influyen en la producción de las bacteriocinas. Hay BAL que producen más de una bacteriocina y en este caso el pH y temperatura del medio juegan un papel muy importante en dicha producción (Yin *et al.*, 2004).

La producción de bacteriocinas de BAL está usualmente asociada con la fase de crecimiento de la cepa y dicha producción cesa al final de la fase exponencial (algunas veces antes de que termine el crecimiento). Esto puede ser atribuido a la adsorción de la bacteriocina a las células productoras o a la degradación de las mismas por proteasas (Alquicira-Paez, 2006).

1.8 Factores que contribuyen al efecto antagónico de las bacteriocinas

Entre las principales limitaciones en el uso de las bacteriocinas en los alimentos están su estrecho espectro de actividad antimicrobiana, su bajo poder de acción frente a bacterias Gram-negativas y levaduras y la existencia de cepas resistentes.

Para contrarrestar la resistencia que presentan algunos microorganismos a las bacteriocinas, se estudia la posibilidad de combinarlas con otros factores de inhibición, los cuales incrementarían la efectividad en la acción antimicrobiana de éstas. Ejemplos de estos factores son las tradicionales barreras comúnmente usadas en alimentos, tales como la acidificación, la adición de NaCl, las temperaturas de refrigeración y la utilización de atmósfera modificada con la incorporación de dióxido de carbono (Ningun y Chen, 1994; De Martinis *et al.*, 1997).

Otra manera de potenciar la actividad inhibitoria de una bacteriocina es combinándola con factores antimicrobianos que sean además favorables a su actividad. El NaCl

modifica el balance osmótico del ambiente que rodea a la bacteria y en este ambiente con reducida actividad de agua el microorganismo pierde agua para restablecer el equilibrio osmótico. La pérdida de agua resulta en una reducción de la actividad metabólica, deteniéndose el crecimiento de la bacteria. La concentración de NaCl requerida para limitar el crecimiento microbiano depende de la fase de crecimiento de los microorganismos y de la temperatura (Barbosa *et al.*, 1997).

1.9 PCR en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, también conocido como Real Time PCR (RT-PCR) tiene la capacidad de monitorear el progreso de la reacción de PCR. En esta técnica, la cantidad de DNA se cuantifica mediante un sistema de detección con un colorante que se une inespecíficamente a cualquier DNA que se esté amplificando. Se mide de continuo el cDNA para determinar en qué ciclo de la PCR se alcanza un valor umbral (Figura 5). Cuanto antes se alcance (número de ciclos más bajo) mayor será la concentración inicial del mRNA. En cada ciclo de amplificación la fluorescencia es detectada mediante láser por el termociclador (Bustin, 2000).

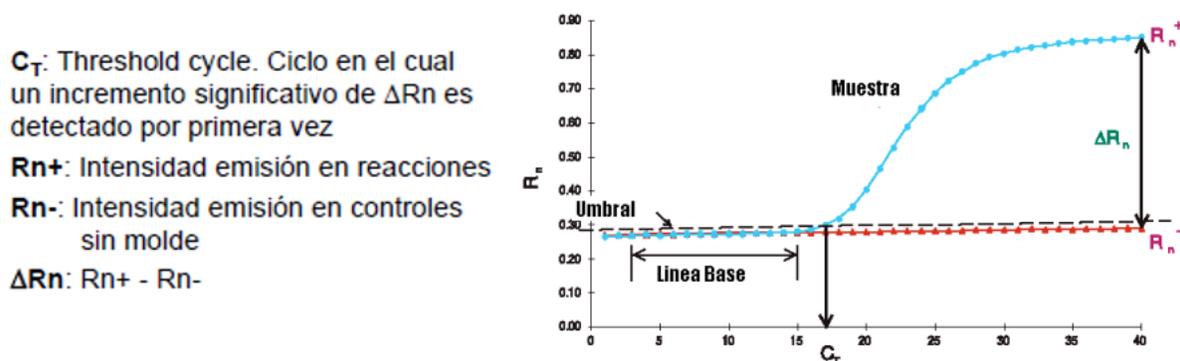


Figura 5. Proceso de la técnica PCR-tiempo real

Las químicas de detección utilizadas para la técnica de PCR en tiempo real son: agentes intercalantes fluorescentes, sondas hidrolizadas, Hairpins probes y sondas de hibridación. Dentro de los agentes intercalantes fluorescentes, el más utilizado es el SYBR Green, que se une al DNA de doble cadena dando un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR.

1.9.1 Cuantificación Relativa

Por definición, cuantificación relativa es la “comparación del ácido nucleico blanco con respecto a una muestra de referencia o calibrador”. Los resultados se expresan como un cambio en el número de veces que un mRNA se expresa en una muestra con respecto al calibrador. Este cambio puede ser positivo o negativo, ya que el calibrador por definición tiene un valor de 1 o bien 100%. Para realizar la cuantificación relativa por el método del CT comparativo es necesario validar la eficiencia de amplificación, es decir, corroborar la uniformidad en los niveles de expresión del gen endógeno en las condiciones experimentales a comparar. (Pfaffl, 2001)

Las consideraciones en la elección del gen endógeno son: (Tellin *et al.*, 1999)

- Genes cuya función biológica esté lo más alejada posible de nuestro gen de interés.
- Uniformidad en los niveles de expresión entre las condiciones experimentales a comparar, así como entre las muestras.
- Eficiencia similar entre el gen de interés y el de referencia.

2 ANTECEDENTES

La dos cepas de estudio de este trabajo corresponden al género y especie *Enterococcus faecium*, ambas fueron aisladas de chorizo.

La cepa *Enterococcus faecium* MXVK29, fue aislada por el grupo de trabajo del Dr. Collins, de la Queen's University of Belfast, más tarde en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa se observó que la cepa tenía la capacidad de sintetizar un péptido antimicrobiano, mismo que se pudo identificar como enterocina A. En un trabajo posterior al aislamiento de la cepa se observó que la enterocina A producida por *Enterococcus faecium* MXVK29, con un espectro de inhibición principalmente contra *Listeria* (microorganismo responsable de deterioro en alimentos y de enfermedades en el ser humano), presentaba una actividad máxima de inhibición durante la fase estacionaria de crecimiento en la cual disminuye la expresión de la mayoría de los genes necesarios para el crecimiento y aumenta la expresión de genes relacionados con funciones que aseguran la viabilidad celular (ya sea durante la inanición o como respuesta a diversos factores de estrés). Posteriormente, en 2011 se logró secuenciar parte del operón de la enterocina A, secuencia que incluye el gen estructural, gen de inmunidad y gen inductor (Álvarez *et al.*, 2011).

La cepa UAMI-3 aislada por el grupo de trabajo a cargo de la Dra. Edith Ponce Alquicira en la Universidad Autónoma Metropolitana, también presenta actividad antimicrobiana y actualmente está siendo caracterizada en un trabajo paralelo a éste, para corroborar si la actividad es debida también a enterocina A.

Otros grupos de trabajo han aplicado diferentes factores de estrés como: cambios en la temperatura, la adición de altas concentraciones de NaCl, etanol y peróxido en el crecimiento de cepas de *Enterococcus faecium* productoras de enterocina A, observando que estos factores de estrés modifican la actividad inhibitoria. Observaron también que al adicionar diferentes concentraciones de factor inductor la producción de enterocina A tenía cambios significativos y comprobaron que al aumentar las concentraciones del factor inductor la expresión del gen estructural aumentaba (Mendoza *et al.*, 1999; Cintas *et al.*, 2000; Hichey *et al.*, 2003; Lebreton *et al.*, 2012).

3 JUSTIFICACIÓN

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana, por lo que se utilizan como conservadores naturales en alimentos, además de ser considerados inocuos toxicológicamente debido a su naturaleza proteica.

Se conoce que la regulación de la síntesis de las bacteriocinas está mediada por sistemas de transducción de señales. La presencia de otra bacteria competidora, el estrés por condiciones extremas de temperatura y pH, la adición de sustancias como NaCl, etanol, peróxido de hidrógeno (entre otros), así como un mecanismo de *quorum sensing* son factores que se pueden emplear para incrementar las señales que activan su producción.

Aunque existen trabajos en los que se ha observado que el sistema de regulación de enterocinas se dispara como una consecuencia del exceso del factor de inducción (IF) a través de una lenta acumulación durante el crecimiento celular; no hay muchos estudios que describan la variación de la expresión génica, sólo se ha descrito que la actividad de inhibición se ve modificada.

En un proyecto de investigación previo, se logró secuenciar parte del operón de la enterocina A producida por *Enterococcus faecium* MXV29. Esta secuencia incluye el gen estructural, gen de inmunidad y gen inductor.

Por lo anterior, es importante conocer la expresión del gen estructural y gen inductor cuando se observan cambios en la actividad de inhibición y definir la posible relación que existe entre la expresión de ambos genes y la variación de la actividad. Para identificar

esta variación se puede someter a la cepa bajo diferentes factores de estrés o definir cuáles son los puntos del crecimiento celular en los que la cepa presenta diferencias en la actividad inhibitoria.

Si se logra determinar algún tipo de correlación entre ambos genes, se podrá en un futuro próximo diseñar un sistema en el cual se pueda adicionar el factor de inducción en concentraciones adecuadas para lograr una sobreexpresión del gen que codifica para la enterocina A.

4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 HIPÓTESIS

- ▶ Si la actividad antimicrobiana tiene variación a lo largo del crecimiento celular o por algún tipo de estrés, entonces esto será consecuencia de cambios en la expresión del gen estructural y gen inductor de la enterocina A.

4.2 OBJETIVO GENERAL

- ▶ Evaluar la correlación de la variación en la actividad antimicrobiana y la expresión génica del gen inductor y gen estructural de la enterocina A.

4.2.1 Objetivos específicos

- ▶ Identificar la variación en la actividad antimicrobiana producida por cepas de *Enterococcus faecium* durante el crecimiento celular o al ser sometidas a estrés.
- ▶ Detectar si el cambio en la producción de enterocina A está relacionado con la expresión del gen estructural y del gen inductor.

5 METODOLOGÍA

5.1 Metodología General

La figura 6 resume la estrategia del trabajo experimental realizado, que comprendió dos etapas (1) crecimiento de las cepas y detección de la actividad antimicrobiana bajo diferentes condiciones de estrés y, (2) el estudio de la expresión de la enterocina.

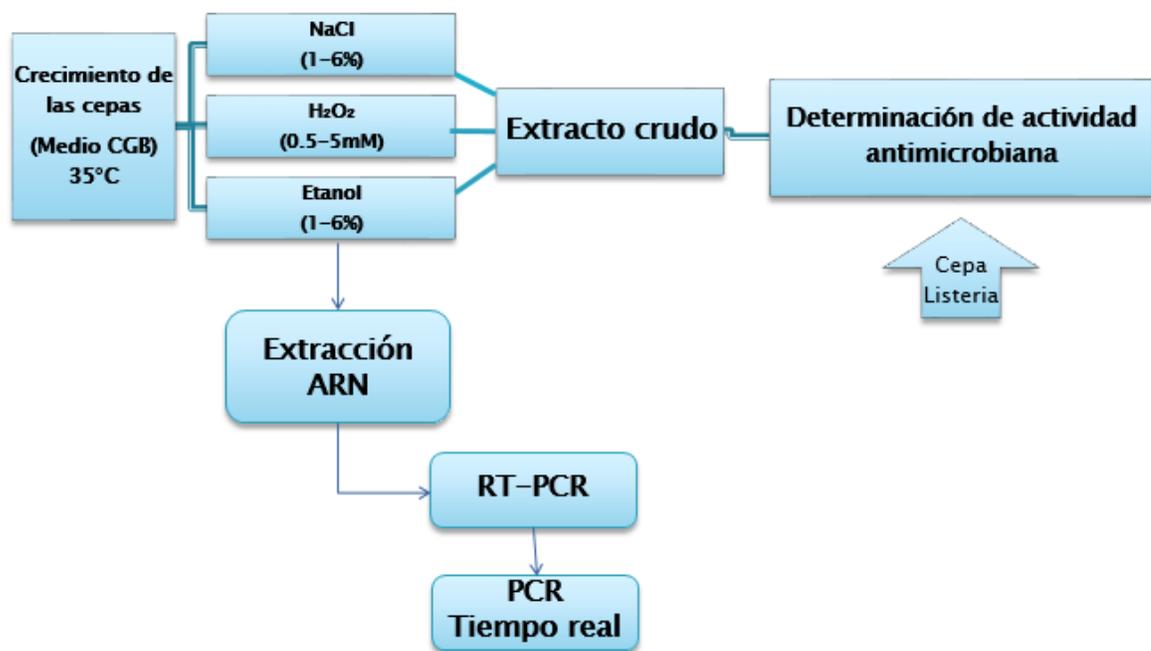


Figura 6. Esquema general de trabajo

Etapa 1

5.2 Condiciones de crecimiento de las cepas

5.2.1 Crecimiento de las cepas *Enterococcus faecium*

Las cepas *Enterococcus faecium* se reactivaron en medio CGB (Caldo Caseína Glucosa; extracto de levadura 0.5% (Bioxon, México), peptona biotriptasa 2% (Bioxon, México),

dextrosa 1% (Bioxon, México), sulfato de manganeso 0.005% (J.T. Baker, México), citrato de amonio 0.2% (J.T. Baker, México), fosfato disódico 0.2% (J.T. Baker, México), sulfato de magnesio 0.01% (J.T. Baker, México), tween 80 0.10% (Hycel, México), a pH 7 y 35°C durante 18 h. Posteriormente se realizó la re-siembra con 1% de inculo.

5.2.2 Crecimiento de la cepa *Listeria innocua* ATCC33090

La cepa de *Listeria innocua* fue incubada a 35°C en caldo TSB (soya-tripticaseína, Difco Laboratories, Detroit, Michigan), durante 24 h para su uso posterior en la determinación de la actividad inhibitoria.

5.3 Obtención del extracto crudo

En cada una de las fermentaciones de *Enterococcus faecium* sin adición de agentes estresantes y en aquellas sometidas a los diferentes factores de estrés como fue la adición de diferentes concentraciones de NaCl (1%, 2%, 3%, 6%), etanol (1%, 2%, 3%, 6%) y peróxido de hidrógeno (0.5 mM, 2 mM, 3.5 mM, 5 mM), se tomaron muestras de 10 mL a lo largo del crecimiento que permitieron obtener un extracto crudo. Cada una de las muestras se centrifugó a 3100 x g durante 10 min a 4°C, obteniendo sobrenadantes que se ajustaron a pH 6.5. Posteriormente se filtraron a través de membranas estériles Millipore (Durapore® Membrane Filters, GV, Irlanda) con tamaño de poro de 0.22 µm. El filtrado obtenido se denominó extracto crudo.

Para determinar la actividad de los extractos crudos, se utilizaron controles con las diferentes concentraciones de los factores estresantes pero sin inculo, para descartar la presencia de halos de inhibición derivados de dichos factores.

5.4 Determinación de la actividad inhibitoria

La actividad inhibitoria se midió por el método de difusión en agar (Schillinger y Lücke, 1989) con modificaciones, utilizando *Listeria innocua* ATCC33090 como cepa sensible. La técnica consistió en depositar 150 µL del extracto crudo en pozos hechos con una pipeta Pasteur estéril en medio CST semisólido (0.8% de agar bacteriológico), sobre una capa del mismo medio pero con 1.5% de agar bacteriológico. El medio semisólido fue previamente inoculado con 70 µL de un cultivo en fase logarítmica (10^6 - 10^7 UFC/mL, D.O._{600nm} = 0.3) de la cepa sensible. La actividad del compuesto antimicrobiano tipo bacteriocina se evaluó determinando el halo de inhibición formado, una vez incubada la placa a 35°C durante 24 h.

La actividad de bacteriocina se reportó como mm del halo de inhibición por mg de proteína. La actividad antimicrobiana se calculó con los mm de los halos obtenidos en cajas por difusión en agar y con los valores de proteína total determinados en un lector de placas (Synergy HF, Biotek, USA), por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se obtuvo primero la determinación de proteína de mg/mL, se calculó la proteína presente en 150 µL adicionados y finalmente se determinó los mm de halo de inhibición por mg de proteína de cada uno de los extractos crudos obtenidos en las diferentes condiciones aplicadas.

$$\text{Actividad inhibitoria} = \frac{\text{Promedio halo (mm)}}{\text{mg proteína del extracto crudo}}$$

Etapa 2

5.5 Extracción de DNA

La extracción de DNA total se realizó con un Kit de la Marca Promega con número de catálogo A1120. Siguiendo las especificaciones del proveedor, la extracción inició con una centrifugación a partir de 1 mL de cultivo de 18 h para obtener el pellet que contiene el DNA. Posteriormente se adicionó lisozima (Sigma-Aldrich) para ayudar a romper la pared celular, en presencia de EDTA (que inhibe la acción de las nucleasas evitando degradación de los ácidos nucleicos), seguido de una purificación por precipitación, una extracción con solventes orgánicos que ayudó a precipitar proteínas y otras impurezas del DNA, una concentración por centrifugación, un lavado con etanol al 70% para eliminar las sales y su posterior resuspensión en tampón de baja fuerza iónica.

Para corroborar la presencia e integridad del DNA extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, utilizando buffer TAE (Tris-acetato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). En esta técnica el DNA fue sometido a un campo eléctrico y las moléculas de DNA (cargadas negativamente) migraron a través del campo eléctrico hacia el ánodo y de esta forma se pudo visualizar la fotografía del DNA contenido en el gel en un equipo Gel-Doc XR de la marca Bio-Rad utilizando software Image Lab versión 5.1.

5.6 PCR (Reacción en cadena de la DNA polimerasa)

Esta técnica permitió amplificar un segmento de la cadena de DNA a partir de cebadores universales para un fragmento de 16S rDNA, secuencia conocida que se muestra en la

tabla 3 (Weisburg, 1990). Con los amplicones de ambas cepas (UAMI-3 y MXVK29) se verificó su género y especie.

La técnica consistió en una desnaturalización de las dos cadenas de DNA que se separaron por temperatura. Después, por hibridación, el par de oligonucleótidos sintéticos fueron capaces de unirse a la secuencia de DNA, lo que se continuó con un proceso de elongación del fragmento gen que codifica el 16S rDNA.

Tabla 3. Cebadores universales utilizados para amplificar el gen 16S rDNA

Cebador	Secuencia 5' – 3'
fDI	ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
rDI	CccgggatccaagcttAAGGAGGTGATCCAGCC

Abreviaturas de cebadores: f, hacia adelante; r, hacia atrás; D, distal. Todas las secuencias de cebadores se presentan 5' a 3'. Secuencias de engarce que contienen sitios de restricción para clonación se designan con letras minúsculas. “f” contiene sitios *EcoRI* y *Sall*, y “r” contiene *HindIII*, *BamHI* y *XmaI* para el reconocimiento de secuencias (Weisburg, 1990).

De igual forma se amplificó el gen *entA* con los cebadores específicos que se muestran a continuación:

Tabla 4. Cebadores universales utilizados para amplificar gen *entA*

Cebador	Secuencia 5' – 3'
<i>entA</i>	AAATATTATGGAAATGGAGTGTAAT
	GCACTTCCCTGGAATTGCTC

(Álvarez, 2008)

La composición para las reacciones PCR en cada una de las amplificaciones realizadas se muestra en la siguiente tabla

Tabla 5. Composición de las reacciones de amplificación

Descripción	μL
Agua destilada	38.7
Cebador forward	1
Cebador reverse	1
dNTPs	1
DNA genómico	2.5
<i>Pfu</i>	0.8
Buffer	5

En cada uno de los casos se realizó una electroforesis para corroborar la presencia e integridad de los fragmentos de DNA. Para el fragmento 16S rDNA se utilizó un gel al 1%, mientras que para los genes que codifican para las enterocinas, el gel utilizado fue al 1.5% de agarosa. Posteriormente se cortaron las bandas de los amplicones y se purificaron con el kit miniprep Wizard SV gel and PCR Clean-Up (Promega). Los productos purificados fueron enviados a secuenciar a la empresa Macrogen en Seúl, Corea.

5.7 Extracción de RNA

Las consideraciones que se tomaron en cuenta al trabajar con RNA se deben a que las RNAsas (enzimas que rompen RNA) pueden estar presentes durante el procedimiento de manipulación del RNA para obtener la segunda cadena o cadena complementaria, por lo cual se tomaron en cuenta los siguientes aspectos:

- Siempre se utilizaron guantes de látex, para que bacterias o enzimas que pudieran estar presentes en la piel no contaminaran el RNA al realizar la extracción.
- Se utilizaron pipetas y micro pipetas estériles, reservadas para trabajo de RNA.
- Se utilizó material tratado con inhibidores de RNAsas, en un área restringida para trabajar con RNA.
- Las muestras para extracción fueron utilizadas siempre en fresco.
- Se trabajó en un espacio de trabajo limpio, tratando en autoclave todo el material dos veces.

La extracción de RNA se realizó con el reactivo Trizol (fenol, isotiocianato de guanidina y tiocianato de amonio) (Ambion), siguiendo las especificaciones del manual. La extracción consistió en cuatro fases: separación, aislamiento, lavado y resuspensión. Se homogenizaron las muestras a partir de cultivos de 16 y 24 h, se adicionó 0.75 mL de Trizol por cada 0.25 mL para separar proteínas, DNA y RNA; también se adicionó cloroformo (0.2 mL por cada 1 mL de Trizol utilizado) en la fase de separación. Para aislar el RNA se utilizó isopropanol y una vez aislado se lavó con etanol al 75% para resuspender en agua libre de RNAsas (Gerts, 2011).

Para verificar la integridad del RNA extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.4%, en condiciones desnaturizantes (formaldehído al 2.2%), utilizando un buffer MOPS (ácido 3-(n-morfolino)-propanosulfónico) 1x a pH 7.

Las muestras de extracción se almacenaron a -80°C.

5.8 Cuantificación de mRNA

5.8.1 RT (Retro-Transcripción)

Se realizó la reacción de síntesis de cDNA junto con una PCR utilizando cebadores específicos para amplificar los genes *entA*, *entF* y el gen de referencia (fragmento del 16S rDNA) a partir de RNA total, obteniéndose fragmentos de cDNA correspondientes a los transcritos.

Para la retro-transcripción se utilizó una transcriptasa inversa de dos pasos SuperScript III (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del proveedor, teniendo en cuenta que la cantidad de cDNA generado es proporcional al número de moléculas de RNA presente en las muestras evaluadas. La retrotranscripción en todos los casos se ajustó a 250 ng de RNA inicial (Bustin, 2000). Una vez obtenidos los transcritos, se realizó una reacción de PCR para amplificar los tres genes de interés, se purificaron y secuenciaron para verificar la identidad de los transcritos obtenidos. Posteriormente se realizó la PCR en tiempo real para la cuantificación de los RNA.

5.8.2 PCR en tiempo real

Por comparación con un control (fragmento del 16S rDNA) se pudieron determinar las diferencias de expresión de dos genes de interés *entA* y *entF* (gen estructural y gen inductor de la enterocina A).

Se utilizaron los cebadores nombrados como *genrefF* y *genrefR* (Tabla 6) para amplificar una región del 16S rDNA de 92 pb elegida con base en las secuencias del 16S rDNA completas de ambas cepas (UAMI-3, MXVK29), de la región en la que no se encontraron

diferencias entre ellas. Este gen fue usado como referencia para normalizar los resultados de amplificación por PCR en tiempo real de los genes *entA* y *entF*. Se ha reportado que las subunidades ribosomales como es el caso de 16S rDNA, pueden servir como genes de referencia, puesto que es un gen que está presente en cada una de las muestras y se expresa en niveles similares en los diferentes tipos de células (Tellin *et al.*, 1999), Roche (2002) también recomienda las subunidades ribosomales en la selección de genes endógenos para la normalización de resultados.

Tabla 6. Cebadores utilizados para amplificar 92 pb del gen 16S rDNA

Cebador	Secuencia 5' – 3'
<i>genrefF</i>	GCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
<i>genrefR</i>	CCGTGTCTCAGTCCCAATG

5.8.3 Cuantificación relativa por el método CT comparativo

Se realizó la cuantificación relativa por el método CT comparativo (Pfaffl, 2001). Para realizar la cuantificación relativa por el método del CT comparativo fue necesario validar la eficiencia de amplificación, es decir, corroborar la uniformidad en los niveles de expresión del gen endógeno en las condiciones experimentales a comparar.

Primero se calcularon las curvas de eficiencia evaluadas por PCR en tiempo real, de diluciones 1:3, 1:10, 1:50 y 1:80 a partir de una muestra de concentración conocida (tiempo 0 de cultivo) que se expresa en todos los genes analizados. Los valores de CT se linearizaron obteniendo un valor de pendiente con el que se calculó la eficiencia para cada uno de los genes evaluados con la siguiente fórmula:

$$E = 10^{-1/m}$$

Los valores resultantes de eficiencia deben estar entre 1.8 y 2.2, siendo 2 el valor de eficiencia que corresponde al 100% de amplificación.

Posteriormente se realizó el ensayo por PCR en tiempo real con muestras de 0, 8, 12, 16, 18, 20 y 24 h de cultivo de la cepa MXVK29. Con los datos de CT, se realizó la cuantificación relativa restando los valores de CT del control endógeno a los del blanco.

$$\Delta CT = CT_{\text{bco}} - CT_{\text{endógeno}}$$

Después se obtuvo el segundo Δ de la siguiente forma:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{tratamiento}} - \Delta CT_{\text{calibrador}}$$

Los resultados obtenidos de la cuantificación se graficaron para observar de manera clara las diferencias en número de veces.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Determinación de la actividad antimicrobiana

En la determinación de la actividad antimicrobiana para las cepas de *Enterococcus faecium* se evaluaron tres puntos en el crecimiento celular (8, 16 y 24 h). Se midió también densidad óptica a 600 nm para observar si existía una relación entre su crecimiento y la actividad inhibitoria; los datos de absorbancias medidas se muestran en las tablas 7 a la 12, en todos los casos el modelo que describe la curva de crecimiento al cual se ajustaron los datos fue: Baranyi y Roberts, siendo el más preciso en estimaciones de μ_{\max} (velocidad máxima específica de crecimiento), utilizado para bacterias lácticas (Cayré *et al.*, 2007).

Tabla 7. Parámetros de la cinética de crecimiento de *Enterococcus faecium* MXVK29 en presencia de etanol (DMfit <http://browser.combase.cc/DMFit.aspx> modelo Baranyi & Roberts).

Etanol	tiempo (h)	Promedio DO (600nm)	DS	R ²	μ_{\max}
Control	0	0.05	0.002	1	1.9 ± 0.003
	8	1.62	0.004		
	16	1.67	0.022		
	24	1.73	0.021		
1%	0	0.05	0.001	0.99	1.71 ± 0.04
	8	1.63	0.031		
	16	1.67	0.038		
	24	1.76	0.005		
2%	0	0.04	0.004	0.99	1.69 ± 0.01
	8	1.63	0.011		
	16	1.68	0.019		
	24	1.72	0.021		
3%	0	0.05	0.004	1	1.62 ± 0.001
	8	1.62	0.009		
	16	1.62	0.012		
	24	1.62	0.007		

6%	0	0.05	0.007	0.99	1.57 ± 0.04
	8	1.50	0.022		
	16	1.52	0.010		
	24	1.62	0.001		

Tabla 8. Parámetros de la cinética de crecimiento de *Enterococcus faecium* MXVK29 en presencia de H₂O₂ (DMfit <http://browser.combase.cc/DMFit.aspx> modelo Baranyi & Roberts).

Peróxido	tiempo (h)	Promedio DO (600nm)	DS	R ²	μ _{max}
Control	0	0.04	0.007	1	1.70 ± 0.003
	8	1.68	0.003		
	16	1.70	0.040		
	24	1.71	0.039		
0.5mM	0	0.04	0.003	0.99	1.75 ± 0.04
	8	1.69	0.010		
	16	1.71	0.045		
	24	1.80	0.043		
2 mM	0	0.04	0.002	0.99	1.69 ± 0.02
	8	1.67	0.008		
	16	1.68	0.030		
	24	1.72	0.009		
3.5 mM	0	0.04	0.007	0.99	1.71 ± 0.005
	8	1.65	0.019		
	16	1.71	0.003		
	24	1.72	0.005		
5 mM	0	0.04	0.003	1	1.75 ± 0.004
	8	1.30	0.005		
	16	1.75	0.044		
	24	1.76	0.020		

Tabla 9. Parámetros de la cinética de crecimiento de *Enterococcus faecium* MXVK29 en presencia de cloruro de sodio (DMfit <http://browser.combase.cc/DMFit.aspx> modelo Baranyi & Roberts).

NaCl	tiempo (h)	Promedio DO (600nm)	DS	R ²	μ _{max}
Control	0	0.05	0.001	0.99	1.70 ± 0.02
	8	1.62	0.021		
	16	1.67	0.010		
	24	1.73	0.026		

1%	0	0.04	0.000	0.99	1.69 ± 0.01
	8	1.63	0.034		
	16	1.68	0.019		
	24	1.72	0.024		
2%	0	0.04	0.006	1	1.67 ± 0.003
	8	1.58	0.012		
	16	1.67	0.034		
	24	1.68	0.000		
3%	0	0.04	0.002	0.99	1.64 ± 0.01
	8	1.52	0.022		
	16	1.63	0.022		
	24	1.66	0.041		
6%	0	0.04	0.001	0.99	1.36 ± 0.03
	8	0.86	0.016		
	16	1.32	0.014		
	24	1.40	0.007		

Tabla 10. Parámetros de la cinética de crecimiento de *Enterococcus faecium* UAMI-3 en presencia de etanol (DMfit <http://browser.combase.cc/DMFit.aspx> modelo Baranyi & Roberts).

Etanol	tiempo (h)	Promedio DO (600nm)	DS	R ²	μ _{max}
Control	0	0.05	0.003	0.996	1.97 ± 0.04
	8	1.84	0.007		
	16	1.93	0.041		
	24	2.01	0.014		
1%	0	0.05	0.002	0.992	2.03 ± 0.06
	8	1.96	0.014		
	16	1.97	0.006		
	24	2.10	0.009		
2%	0	0.04	0.000	0.979	2.02 ± 0.10
	8	1.93	0.006		
	16	1.92	0.024		
	24	2.13	0.020		
3%	0	0.05	0.003	1	1.94 ± 0.00
	8	1.73	0.033		
	16	1.94	0.013		
	24	1.95	0.009		

6%	0	0.05	0.005	0.996	1.81 ± 0.03
	8	1.57	0.003		
	16	1.78	0.012		
	24	1.86	0.011		

Tabla 11. Parámetros de la cinética de crecimiento de *Enterococcus faecium* UAMI-3 en presencia de H₂O₂ (DMfit <http://browser.combase.cc/DMFit.aspx> modelo Baranyi & Roberts).

Peróxido	tiempo (h)	Promedio DO (600nm)	DS	R ²	μ _{max}
Control	0	0.04	0.000	0.99	2.03 ± 0.02
	8	1.77	0.010		
	16	2.01	0.033		
	24	2.05	0.006		
0.5mM	0	0.04	0.000	0.99	2.03 ± 0.03
	8	1.78	0.005		
	16	2.00	0.002		
	24	2.07	0.028		
2 mM	0	0.04	0.002	0.98	2.00 ± 0.07
	8	1.93	0.006		
	16	1.93	0.026		
	24	2.07	0.122		
3.5 mM	0	0.04	0.008	0.99	2.09 ± 0.02
	8	1.81	0.039		
	16	2.06	0.101		
	24	2.12	0.027		
5 mM	0	0.04	0.009	1	1.94 ± 0.003
	8	1.76	0.120		
	16	1.94	0.069		
	24	1.95	0.061		

Tabla 12. Parámetros de la cinética de crecimiento de *Enterococcus faecium* UAMI-3 en presencia de cloruro de sodio (DMfit <http://browser.combase.cc/DMFit.aspx> modelo Baranyi & Roberts).

NaCl	tiempo (h)	Promedio DO (600nm)	DS	R ²	μ _{max}
Control	0	0.04	0.008	0.99	2.0213 ± 0.02
	8	1.73	0.074		
	16	2.00	0.152		
	24	2.04	0.093		
1%	0	0.04	0.006	0.99	1.958 ± 0.04
	8	1.71	0.087		

	16	1.91	0.063		
	24	2.00	0.140		
2%	0	0.04	0.005	0.99	1.931 ± 0.02
	8	1.68	0.114		
	16	1.90	0.145		
	24	1.96	0.093		
3%	0	0.04	0.007	0.99	1.937 ± 0.01
	8	1.63	0.038		
	16	1.92	0.061		
	24	1.95	0.048		
6%	0	0.04	0.003	1	1.83 ± 0.007
	8	0.99	0.062		
	16	1.75	0.081		
	24	1.83	0.061		

Con base en los valores calculados por el modelo de Baranyi y Roberts, se puede observar para ambas cepas (*Enterococcus faecium* UAMI-3 y MXVK29) que la μ_{max} fue disminuyendo al aumentar la concentración del factor de estrés, como resultado de la pérdida de agua en la célula, lo que provoca la reducción de la actividad metabólica, deteniendo el crecimiento de la bacteria (Barbosa *et al.*, 1997).

Se realizaron los gráficos correspondientes a cada condición de estrés aplicada con los datos obtenidos de densidades ópticas de crecimiento y las determinaciones de la actividad antimicrobiana en cada uno de los extractos, para poder observar si existían diferencias como efecto del estrés. En la figura 7 se muestra una representación de los halos observados por la técnica de difusión en agar en cada una de las condiciones evaluadas.

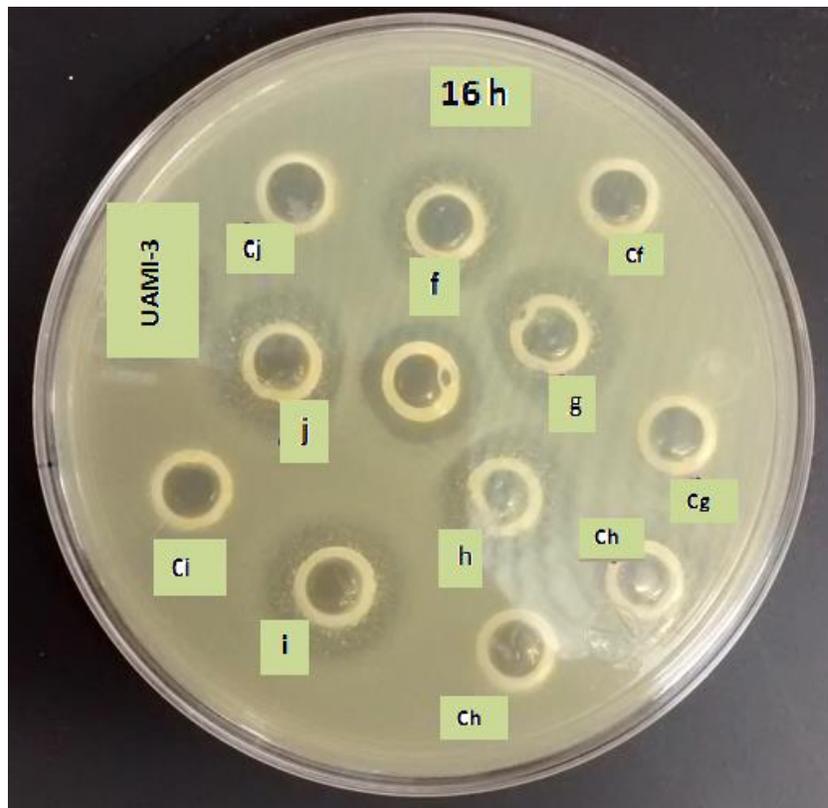


Figura 7. Representación de halos observados por la técnica de difusión en agar. Estrés con NaCl de la cepa *Enterococcus faecium* UAMI-3 a las 16 h de cultivo; f: 0%, g: 1%, h: 2%, i: 3%, j: 6%; Cf, Cg, Ch, Ci, Cj: Controles negativos (sin inóculo).

6.1.1 Efecto de etanol en cepas de *Enterococcus faecium*

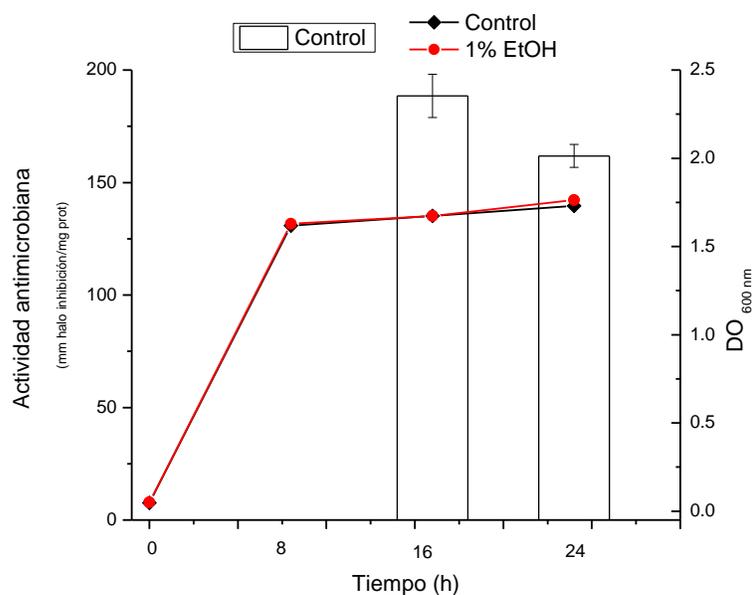


Figura 8. *Enterococcus faecium* MXVK29 en presencia de 1% de etanol

La cepa *Enterococcus faecium* MXVK29 sólo presentó halos de inhibición en la muestra control, por lo que solo se muestra un gráfico representativo en donde se observa la variación de la actividad a lo largo del crecimiento celular. En todas las condiciones de estrés aplicadas, la actividad antimicrobiana se inhibió.

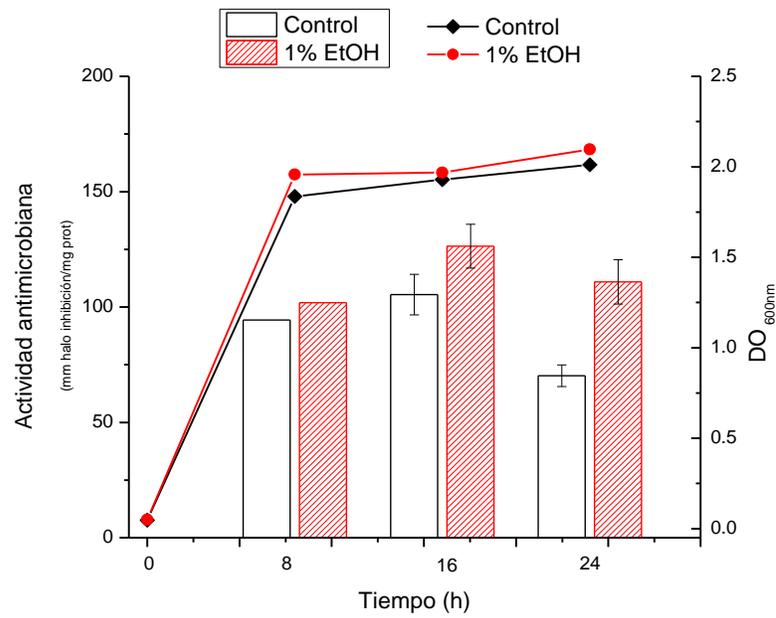


Figura 9. *Enterococcus faecium* UAMI-3 en presencia de 1% etanol

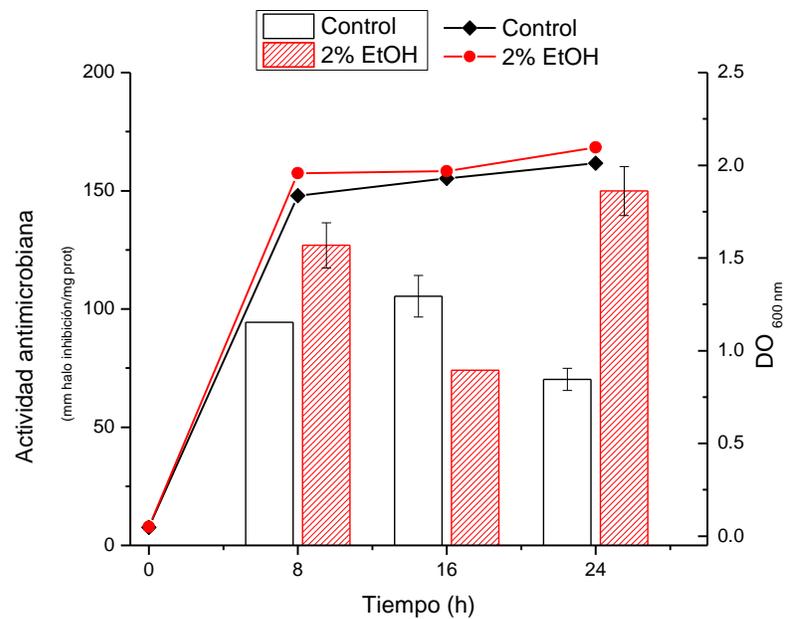


Figura 10. *Enterococcus faecium* UAMI-3 en presencia de 2% etanol

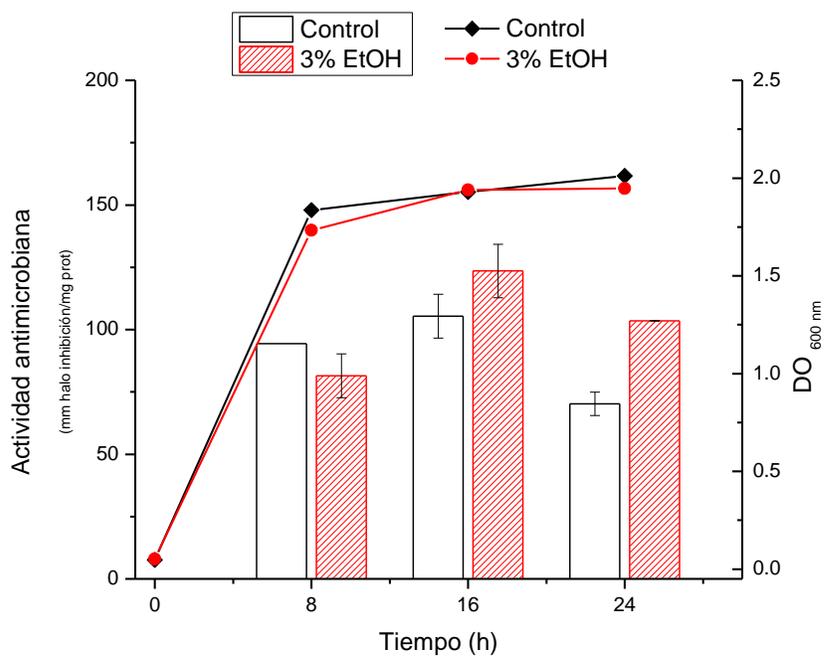


Figura 11. *Enterococcus faecium* UAMI-3 en presencia de 3% etanol

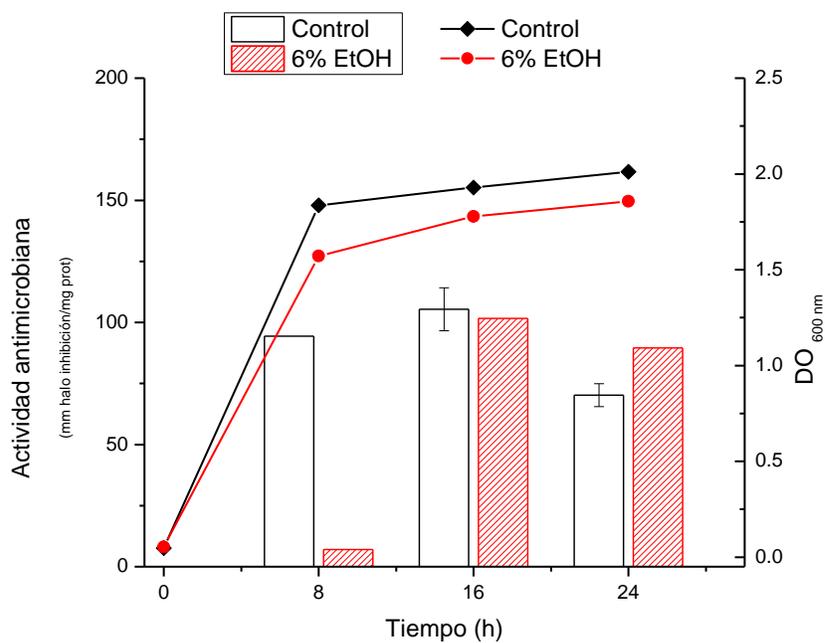


Figura 12. *Enterococcus faecium* UAMI-3 en presencia de 6% etanol

Tabla 13. Análisis de la varianza de la actividad antimicrobiana de *Enterococcus faecium* UAMI-3 en presencia de etanol

Fuente de variación	R ²	GDL	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	F	Pr > F
Modelo	0.804	7	124376.61	17768.08	30.46	< 0.0001
etanol		4	11432.87	2858.21	4.90	0.002
tiempo		3	112943.74	37647.91	64.54	< 0.0001
Error		52	30330.74	583.28		
Total corregido		59	154707.36			

Calculado contra el modelo $Y=Media(Y)$

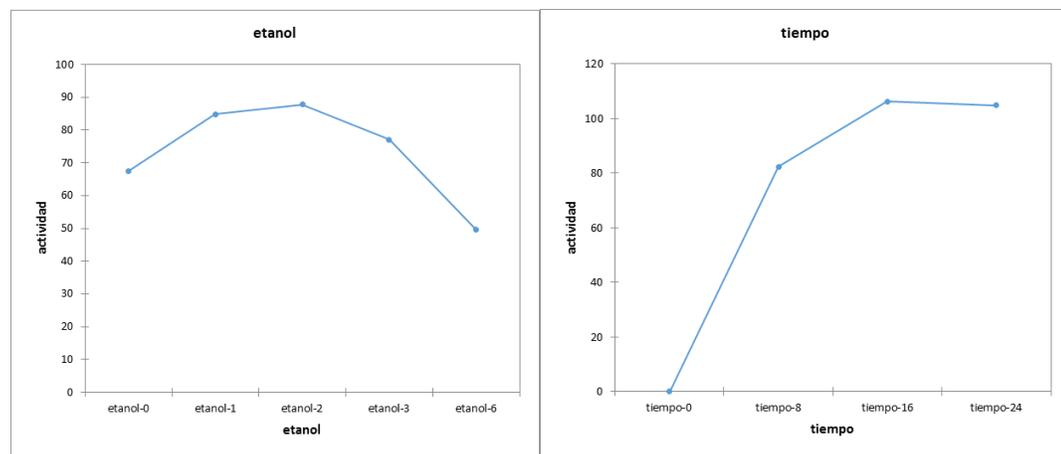


Figura 13. Gráficos de medias de la actividad antimicrobiana de *Enterococcus faecium* UAMI-3 en relación a la adición etanol y tiempo de cultivo.

Tabla 14. Comparación de medias por Duncan de la actividad antimicrobiana de *Enterococcus faecium* UAMI-3 en presencia de etanol

Etanol (%)	Media estimada	Grupos
2	87.74	A
1	84.78	A
3	77.10	A
0	67.48	A B
6	49.55	B

a. Grupo con la misma letra indica que no hay diferencias significativas a un intervalo de confianza de 95%

Se pudo observar que el efecto de etanol sobre *Enterococcus faecium* UAMI-3 provocó cambios en la actividad antimicrobiana, el análisis de varianza mostró que si hay diferencias significativas. El gráfico de medias (Figura 13) muestra que conforme se va aumentando la concentración del factor de estrés, la actividad disminuye. A una concentración del 6% no sólo se inhibió el crecimiento (Tabla 10), sino que la actividad antimicrobiana también se ve afectada. Esto probablemente a que el etanol interfiere con la forma de las proteínas, es decir, el etanol puede estar desnaturalizando a la enterocina y por ello esté perdiendo su actividad. En cuanto al crecimiento, el etanol podría estar solubilizando la membrana celular y por ello el crecimiento bacteriano es menor comparado con el control (Martínez y Gosset, 2007; Zuñiga y Santos, 2007).

6.1.2 Efecto de H₂O₂ en cepas de *Enterococcus faecium*

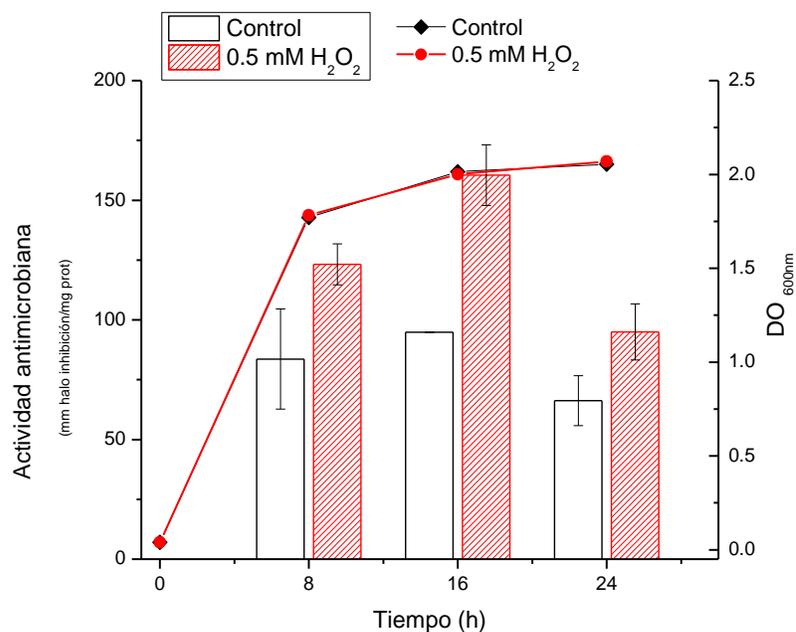


Figura 14. *Enterococcus faecium* UAMI 3 en presencia de 0.5 mM H₂O₂

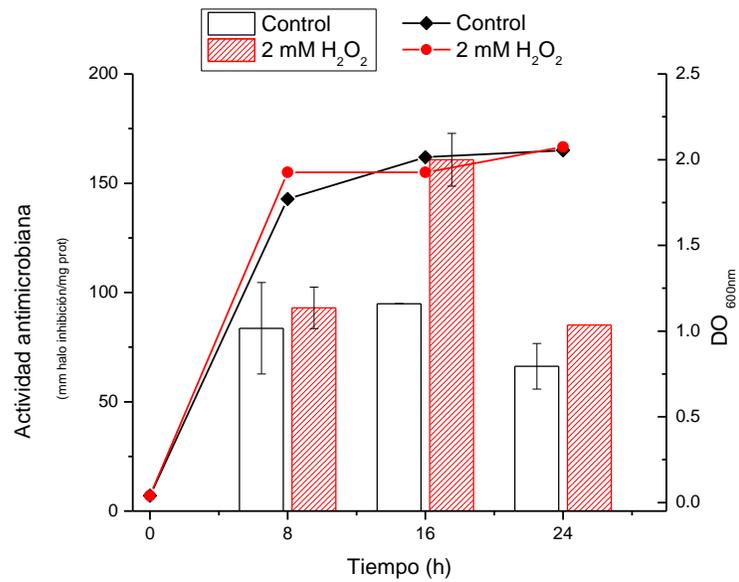


Figura 15. *Enterococcus faecium* UAMI-3 en presencia de 2 mM H₂O₂

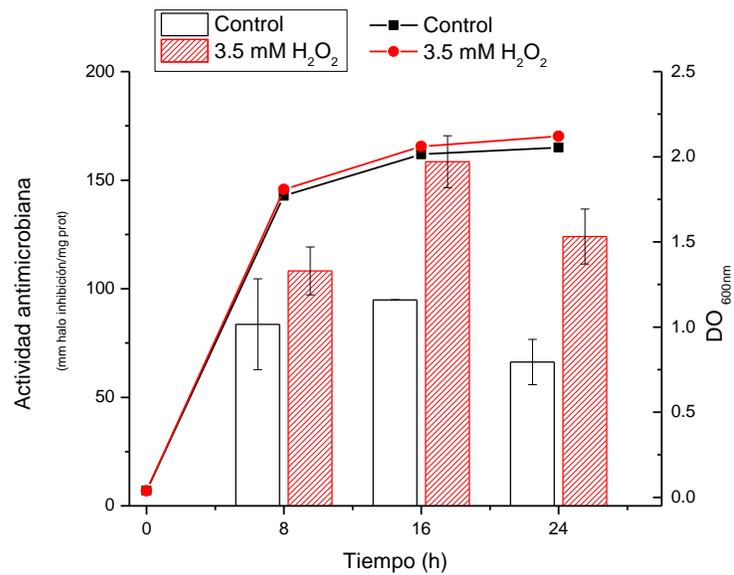


Figura 16. *Enterococcus faecium* UAMI-3 en presencia de 3.5 mM H₂O₂

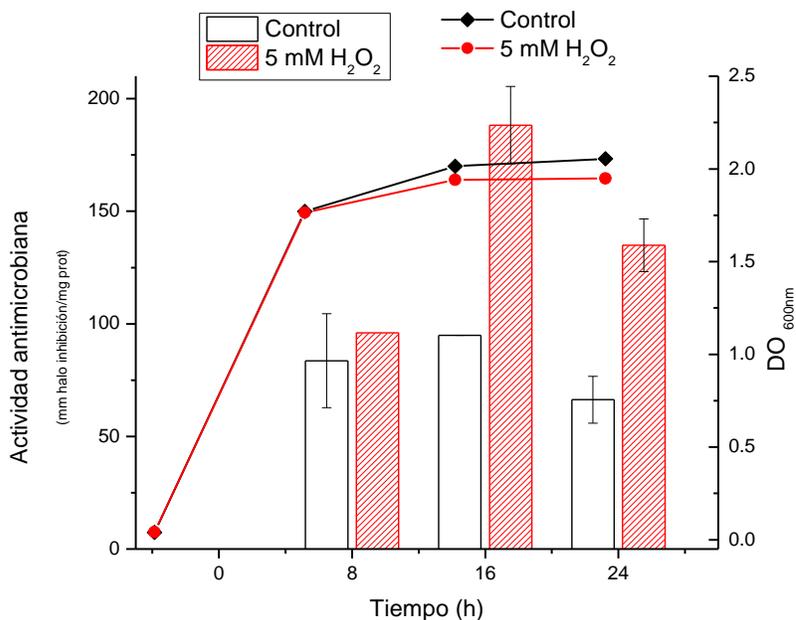


Figura 17. *Enterococcus faecium* UAMI-3 en presencia de 5 mM H₂O₂

Tabla 15. Análisis de la varianza de la actividad antimicrobiana de *Enterococcus faecium* UAMI-3 en presencia de peróxido

Fuente de variación	R ²	GDL	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	F	Pr > F
Modelo	0.921	7	197467.33	28209.61	86.85	< 0.0001
peróxido		4	13767.43	3441.85	10.59	< 0.0001
tiempo		3	183699.89	61233.30	188.53	< 0.0001
Error		52	16888.60	324.78		
Total corregido		59	214355.93			

Calculado contra el modelo $Y=Media(Y)$

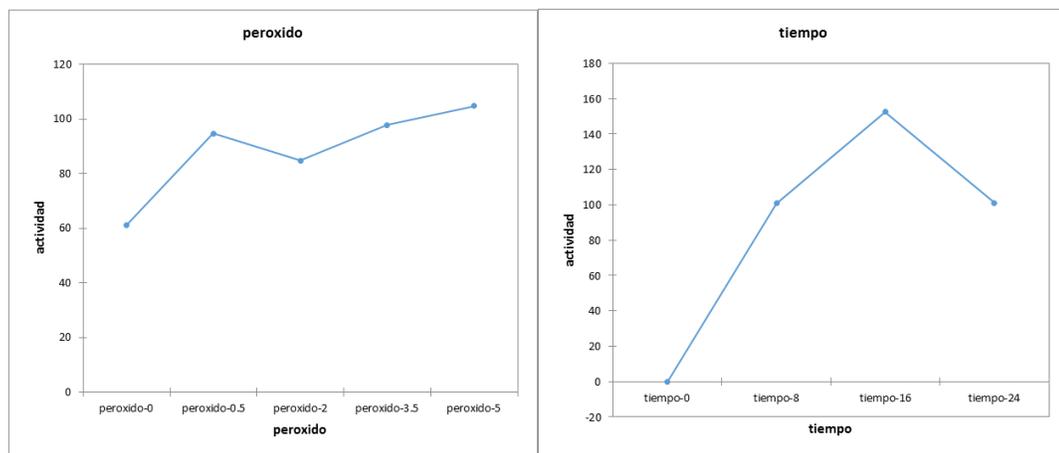


Figura 18. Gráficos de medias de la actividad antimicrobiana de *Enterococcus faecium* UAMI-3 en relación a la adición peróxido y tiempo de cultivo

Tabla 16. Comparación de medias por Duncan de la actividad antimicrobiana de *Enterococcus faecium* UAMI-3 en presencia de peróxido.

Peróxido (mM)	Media estimada	Grupos	
5	104.770	A	
3.5	97.695	A	B
0.5	94.672	A	B
2	84.699		B
0	61.195		C

a. Grupo con la misma letra indica que no hay diferencias significativas a un intervalo de confianza de 95%

El efecto de peróxido en *Enterococcus faecium* UAMI-3 provocó cambios en la actividad antimicrobiana, mostrando diferencias significativas de acuerdo al análisis de varianza (Tabla 15), mientras que la velocidad específica de crecimiento (Tabla 11) en los puntos evaluados no presentó mucha variación. En este caso, las concentraciones utilizadas de peróxido de hidrógeno probablemente sólo están estimulando a la célula para incrementar su actividad antimicrobiana (Figura 18) y no se encuentra en cantidad suficiente para solubilizar la membrana, ni modificar la conformación de la proteína causante de dicha actividad (Quesada, 2008). Al comparar los valores de las medias

(Tabla 16), se corrobora este comportamiento, la actividad antimicrobiana presente con 2 y 5 mM de peróxido es diferente con respecto al control.

6.1.3 Efecto de NaCl en cepas de *Enterococcus faecium*

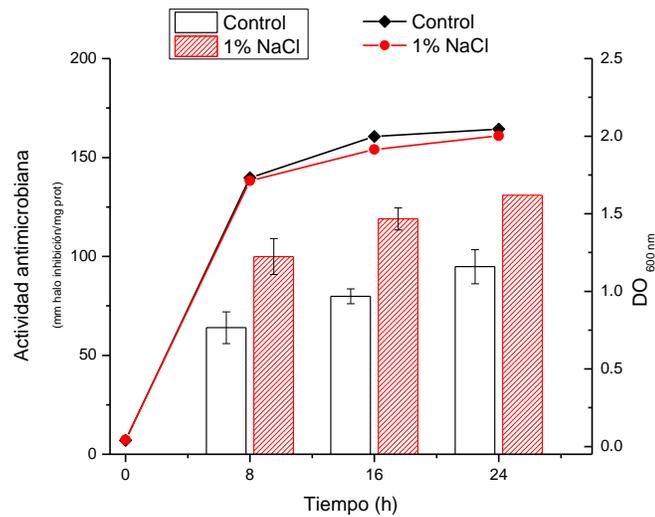


Figura 19. *Enterococcus faecium* UAMI-3 en presencia de 1% NaCl

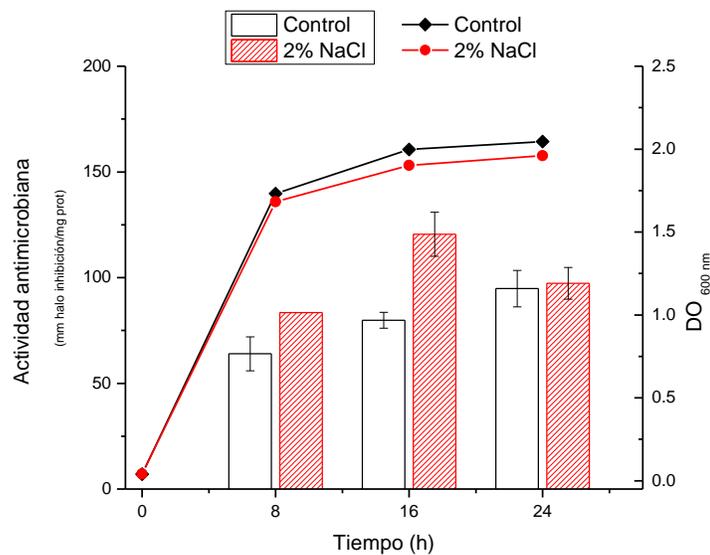


Figura 20. *Enterococcus faecium* UAMI-3 en presencia de 2% NaCl

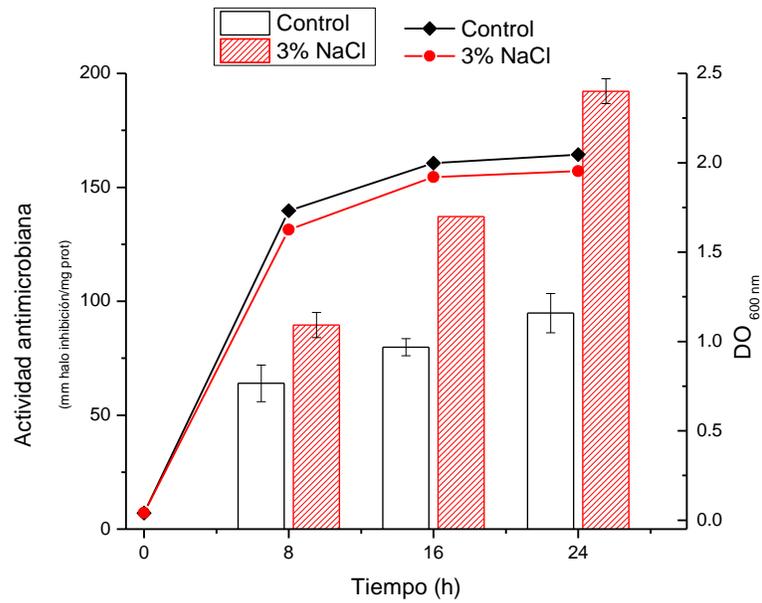


Figura 21. *Enterococcus faecium* UAMI-3 en presencia de 3% NaCl

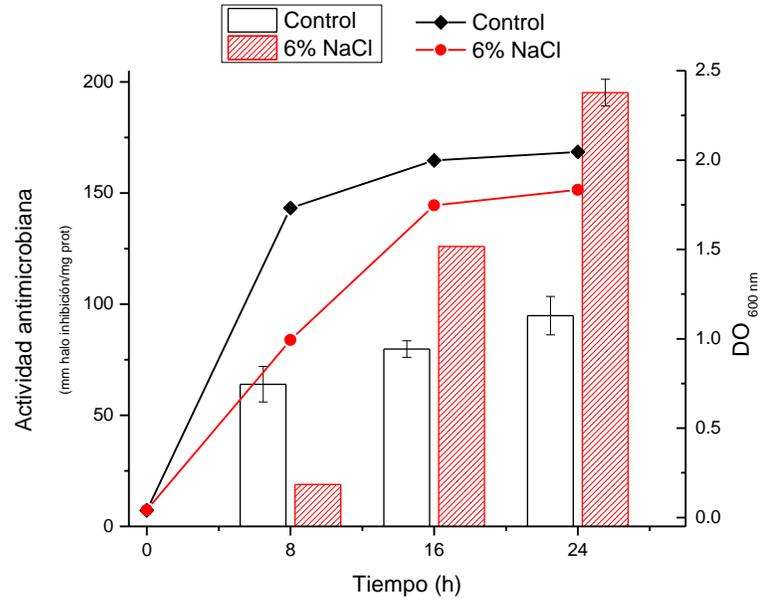


Figura 22. *Enterococcus faecium* UAMI-3 en presencia de 6% NaCl

Tabla 17. Análisis de la varianza de la actividad antimicrobiana de *Enterococcus faecium* UAMI-3 en presencia de NaCl

Fuente de variación	R ²	GDL	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	F	Pr > F
Modelo	0.843	7	187760.52	26822.93	39.95	< 0.0001
NaCl		4	13182.36	3295.59	4.90	0.002
tiempo		3	174578.15	58192.71	86.68	< 0.0001
Error		52	34906.53	671.28		
Total corregido		59	222667.06			

Calculado contra el modelo $Y=Media(Y)$

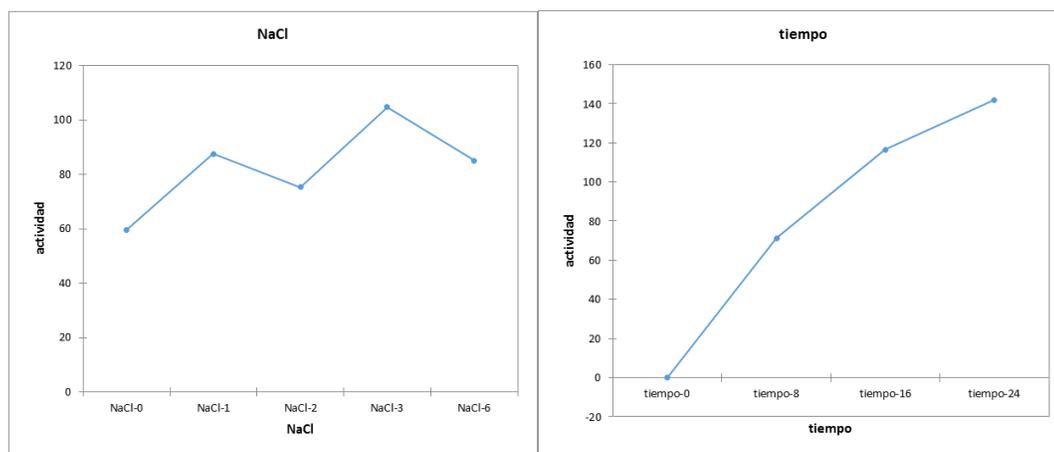


Figura 23. Gráfico de medias de la actividad antimicrobiana de *Enterococcus faecium* UAMI-3 en relación a la adición de NaCl y tiempo de cultivo.

Tabla 18. Comparación de medias por Duncan de la actividad antimicrobiana de *Enterococcus faecium* UAMI-3 en presencia de NaCl

NaCl (%)	Media estimada	Grupos		
3	104.722	A		
1	87.465	A	B	
6	85.001	A	B	
2	75.332		B	C
0	59.643			C

a. Grupo con la misma letra indica que no hay diferencias significativas a un intervalo de confianza de 95%

La cepa de *Enterococcus faecium* UAMI-3 también mostró cambios en la actividad antimicrobiana en presencia de cloruro de sodio, como lo muestra el análisis de varianza (Tabla 17), que confirma que estadísticamente hay diferencias significativas; mientras

que la velocidad específica de crecimiento sólo se mostró afectada a una concentración del 6% (Tabla 12). Como reportaron Mendoza *et al.* (1999), la presencia de cloruro de sodio en el cultivo puede alterar el equilibrio osmótico en la célula bacteriana, atenuando o aumentando el potencial en la producción de la enterocina (Figura 23). En el caso de estrés con NaCl se observó que a una concentración del 3% la actividad aumenta y es estadísticamente diferente con respecto al control (Tabla 18).

De manera general se pudo observar con base en todos los resultados obtenidos hasta este punto que el someter ambas cepas a condiciones de estrés provoca cambios en la actividad antimicrobiana. En el caso de *Enterococcus faecium* MXVK29 se inhibe por completo la actividad inhibitoria en todas las condiciones aplicadas. Es probable que las concentraciones del factor de estrés aplicadas causaran un desequilibrio celular en el que la bacteria no es capaz de producir el péptido antimicrobiano o tal vez se esté expresando la enterocina pero los factores de estrés la estén desnaturalizando como lo reporta Martínez y Gosset, (2007), Zuñiga y Santos (2007). Las posibles causas de este comportamiento podrían explicarse determinando si hay expresión génica o no de la enterocina causante de la actividad antibacteriana. En caso de estar expresándose, probablemente ésta no se encuentre en su forma activa. Para el caso de *Enterococcus faecium* UAMI-3 los cambios en la actividad antibacteriana son variables en cada una de las condiciones, en el caso de etanol, al aumentar la concentración la actividad disminuyó (Figura 13); al aumentar la concentración con peróxido, la actividad aumentó (Figura 18) y en el caso de NaCl solo se observó un aumento en la actividad al 3% (Figura 23).

6.2 Identificación molecular de cepas y genes

6.2.1 Obtención del DNA total

El DNA total obtenido de cultivos de *E. faecium* MXVK29 y UAMI-3 de 18 h de crecimiento se pudo visualizar en la fotografía del gel de agarosa, como se muestra en la figura 24.

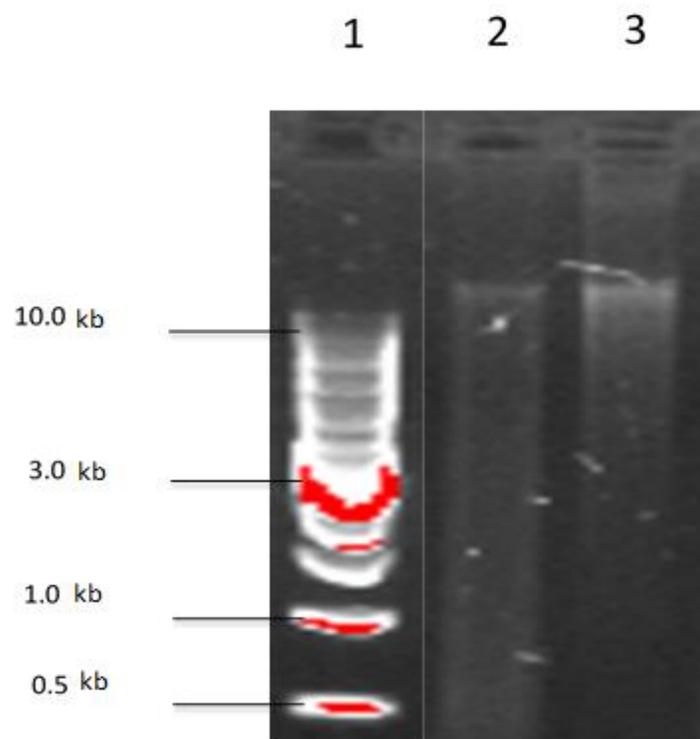


Figura 24. DNA total de cepas de *E. faecium*. Carril 1: Marcador 1 kb New England BioLabs
Carril 2: Cepa UAMI-3 Carril 3: Cepa MXVK29

Se puede observar que el DNA para ambas cepas se encuentra por arriba de las 10.0 kb, lo que indica que se tiene la integridad y el tamaño suficiente para realizar la amplificación del 16S rDNA y corroborar género y especie de las cepas con las que se ha estado trabajando.

6.2.2 Amplificación del 16S rDNA

La amplificación del 16S rDNA se obtuvo con cebadores universales por PCR y mostró que para ambas cepas de *E. faecium* corresponde al tamaño esperado, de alrededor de 1400 pb (Fig. 25), por lo que se cortaron las bandas y se enviaron a secuenciar, para poder corroborar género y especie de ambas cepas.

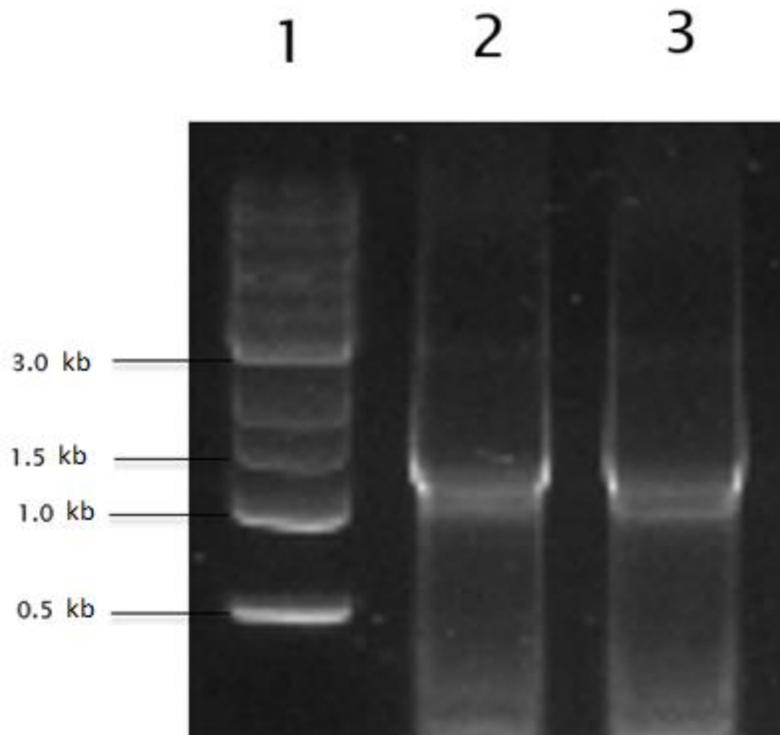


Figura 25. 16S rDNA de cepas de *E. faecium* amplificado por PCR. Carril 1: Marcador 1 kb New England BioLabs; Carril 2: Ceba MXVK29; Carril 3: Ceba UAMI-3

6.2.3 Secuenciación de 16S rDNA

Las secuencias obtenidas del 16S rDNA para cepas de *E. faecium* se analizaron en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) y con un porcentaje de identidad del 99% y un valor de expectativa de cero se corroboró su género y especie: *Enterococcus faecium* (Tabla 19).

Tabla 19. Resultado de BLAST en la base de datos del NCBI del 16S rDNA de cepas de *Enterococcus faecium*

	Descripción	E value	Identidad
Cepa 29	<i>Enterococcus faecium</i> 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	99%
Cepa 3	<i>Enterococcus faecium</i> T110, complete genome	0.0	99%

6.2.4 Amplificación del gen *entA*

Las amplificaciones del gen que codifica para la enterocina A obtenidas con cebadores específicos por PCR mostraron, para ambas cepas de *E. faecium* (Figura 26), que corresponden al tamaño esperado (entre las 100 y 150 pb), por lo que se cortaron las bandas y se enviaron a secuenciar, para poder comparar las secuencias en la base de datos del NCBI.

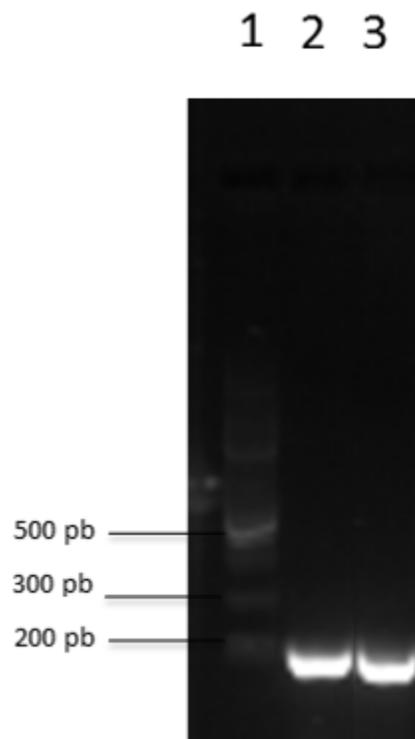


Figura 26. Genes que codifican para enterocinas de cepas de *E. faecium* amplificados por PCR y purificados para secuenciar. Carril 1: Marcador 100 pb New England BioLabs; Carril 2: Ceba UAMI-3 (*entA*); Carril 3: Ceba MXVK29 (*entA*)

6.2.5 Secuenciación del gen *entA*

Las secuencias obtenidas del gen *entA* de las cepas de *E. faecium* UAMI-3 y MXVK29, se analizaron en la base de datos NCBI y como se muestra en la tabla 20 los resultados para la cepa MXVK29 confirman que el amplicón secuenciado corresponde al gen que codifica para la enterocina A, con porcentaje de identidad del 100% y valor de expectativa bajo.

Tabla 20. Resultado de BLAST en la base de datos del NCBI para el gen *entA* de la cepa *Enterococcus faecium* MXVK29

	Descripción	E value	Identidad
<i>entA</i>	<i>Enterococcus faecium</i> partial enterocin A operon (<i>entAIFK</i> genes), strain MTCC 5153	9e-36	100%

Para la cepa UAMI-3 el resultado del BLAST en la base de datos NCBI se muestra en la tabla 21. Para el amplicón secuenciado del gen *entA* no se encontró similitud con ninguna secuencia reportada en la base de datos; la cepa probablemente no contiene este gen dentro de su genoma y los cebadores estén amplificando un sitio inespecífico lo que indica que la actividad antimicrobiana pueda deberse a una proteína diferente a la enterocina A.

Tabla 21. Resultado de BLAST en la base de datos del NCBI para el gen *entA* de la cepa *Enterococcus faecium* UAMI-3

	Descripción	E value	Identidad
<i>entA</i>	No significant similarity found		

Los resultados obtenidos hasta este punto revelan que con los datos que se tienen hasta el momento, sería complicado realizar la cuantificación de expresión génica de la cepa UAMI-3 debido a que no se conoce la secuencia del gen que codifica para la proteína causante del efecto antimicrobiano. Sin embargo es importante dejar en claro que la cepa *Enterococcus faecium* UAMI-3 presenta una variación interesante en cada una de las condiciones evaluadas, y aunque hasta el momento no se ha podido identificar qué

proteína determina el efecto antimicrobiano, esta cepa será una importante fuente de investigación en trabajos posteriores.

6.3 Cinética de crecimiento y determinación de la actividad antimicrobiana de la cepa MXVK29

Se corroboró la presencia del gen *entA* que codifica para la enterocina A en la cepa MXVK29, por lo que se decidió seguir trabajando con esta cepa para la cuantificación de la expresión de este gen y del gen inductor.

Por otro lado, los resultados de la determinación de la actividad antimicrobiana de esta cepa en las condiciones de estrés evaluadas, nos indican que dicha actividad se inhibe por completo. Estos efectos, probablemente no son exclusivos de esta cepa, pues Mendoza *et al.* (1999) encontraron que la respuesta al factor de inducción está influenciada por factores de estrés. Al igual que ellos, en el presente trabajo se observó que la presencia de etanol, cloruro de sodio y peróxido de hidrógeno atenuaron dicha respuesta, posiblemente influyeron negativamente en la unión del factor de inducción a su receptor; por lo que no se podría cuantificar la expresión génica bajo esas condiciones. Sin embargo, sí se puede cuantificar la variación de la expresión génica del inductor y gen estructural de la enterocina A a lo largo del crecimiento celular, sin interferencia de condiciones de estrés. Por tal motivo, se realizaron de nuevo cinéticas de crecimiento de la cepa y se determinaron algunos puntos del crecimiento (8, 16, 18, 20, 22 y 24 h de cultivo) para evaluar la actividad antimicrobiana y poder cuantificar posteriormente, la expresión génica de *entA* y *entF*. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 27.

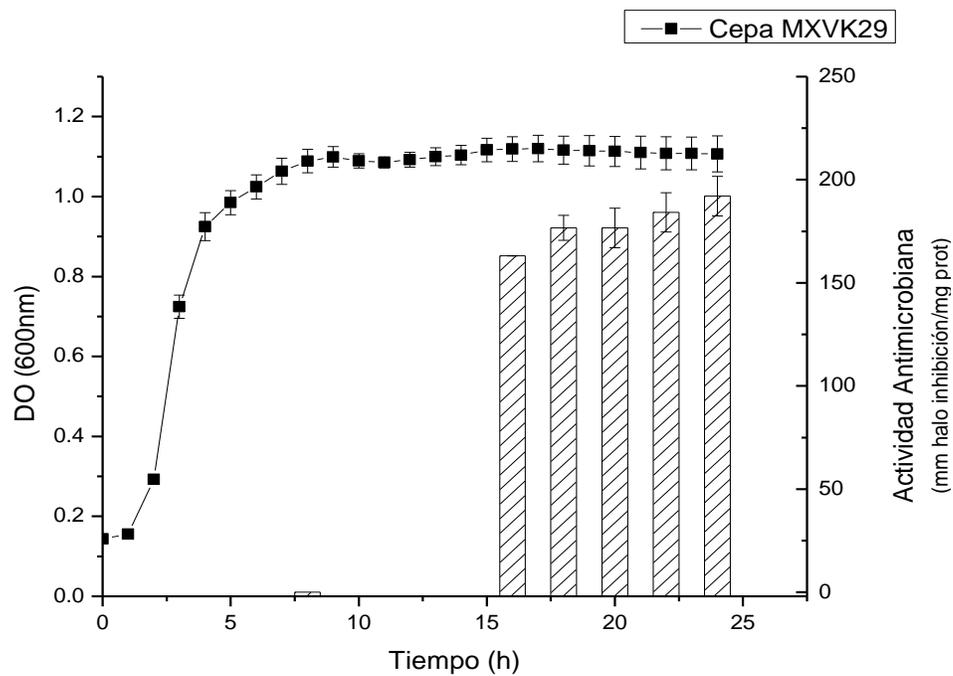


Figura 27. Crecimiento celular y actividad antimicrobiana de *E. faecium* MXVK29

Tabla 22. Análisis de la varianza de la actividad antimicrobiana de *Enterococcus faecium* MXVK29

Fuente de variación	R ²	GDL	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	F	Pr > F
Modelo	0.998	6	91983.358	15330.560	561.686	< 0.0001
tiempo		6	91983.358	15330.560	561.686	< 0.0001
Error		7	191.057	27.294		
Total corregido		13	92174.415			

Calculado contra el modelo Y=Media(Y)

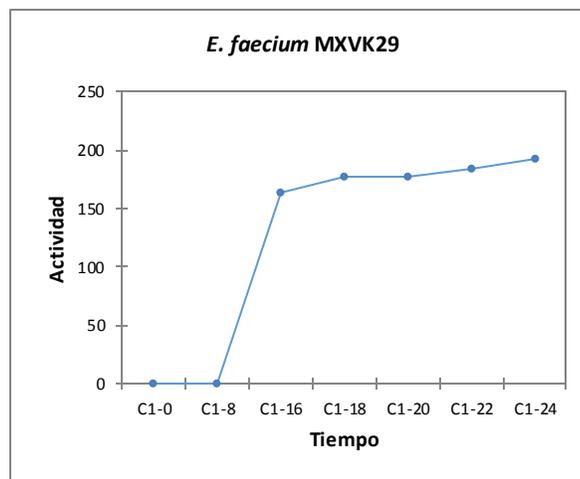


Figura 28. Gráfico de medias de la actividad antimicrobiana de *Enterococcus faecium* MXVK29 en relación al tiempo de cultivo.

Tabla 23. Comparación de medias por Duncan de la actividad antimicrobiana de *Enterococcus faecium* MXVK29

Categoría	Media estimada	Grupos
24	192.06	A
22	184.20	A B
18	176.63	B
20	176.63	B
16	163.12	C
0	0.00	D
8	0.00	D

a. Grupo con la misma letra indica que no hay diferencias significativas a un intervalo de confianza de 95%

Como se puede observar, estadísticamente (Tabla 22, 23 y Figura 28) la actividad antimicrobiana presentó variaciones en los puntos evaluados a lo largo del crecimiento celular, de manera que la cuantificación por PCR en tiempo real es viable.

6.4 Obtención de RNA de la cepa MXVK29

La extracción realizada con Trizol permitió obtener RNA total de *E. faecium* MXVK29 de dos tiempos de crecimiento 16 y 24 h. El RNA total se corrió en un gel de agarosa para mostrar las subunidades ribosomales 28s (banda superior) y 16s (banda inferior).

Las muestras de RNA fueron parcialmente separadas en el gel de agarosa que contienen formaldehído como agente desnaturizante del RNA para obtener su estructura secundaria. El gel fue teñido con Gel Red y visualizado en un digitalizador de imágenes (Gel-Doc XR, Bio-Rad) utilizando el software Image Lab versión 5.1, el cual muestra además de las 2 subunidades ribosomales una banda intensa en la parte inferior, que posiblemente corresponde a RNA que no se desnaturizó por completo y miRNA presente en la muestra (Figura 29).

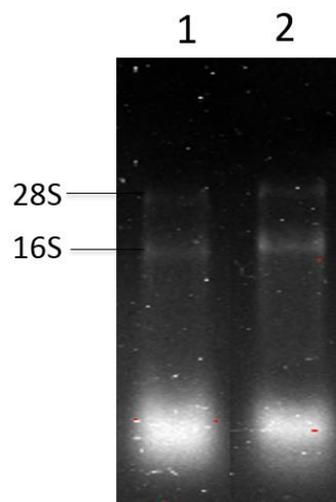


Figura 29. Perfil electroforético de RNA total de *E. faecium* MXVK29. Carril 1: RNA de un cultivo de 16 h; Carril 2: RNA de un cultivo de 24 h.

Para corroborar que el perfil electroforético corresponde a RNA se realizó una electroforesis adicional en donde se cargaron las muestras de RNA previamente tratadas

con RNAsa y un control de DNA genómico al que también se le dio el mismo tratamiento con RNAsa y se pudo observar, que en efecto las 2 muestras de RNA fueron digeridas por la enzima, mientras que el DNA cargado sufrió una mínima degradación, con lo que podemos determinar que la extracción de RNA total es adecuada para realizar posteriormente la retrotranscripción.

6.5 RT (Retro-Transcripción)

A partir del RNA obtenido en cada uno de los puntos a evaluar dentro de la cinética de crecimiento de la cepa *E. faecium* MXVK29 se realizó la retrotranscripción con cebadores específicos; obteniendo fragmentos de cDNA correspondientes a los genes *entA*, *entF* y al gen de referencia. Se pudieron visualizar por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.4%, después de realizar una PCR de punto final. (Figura 30)

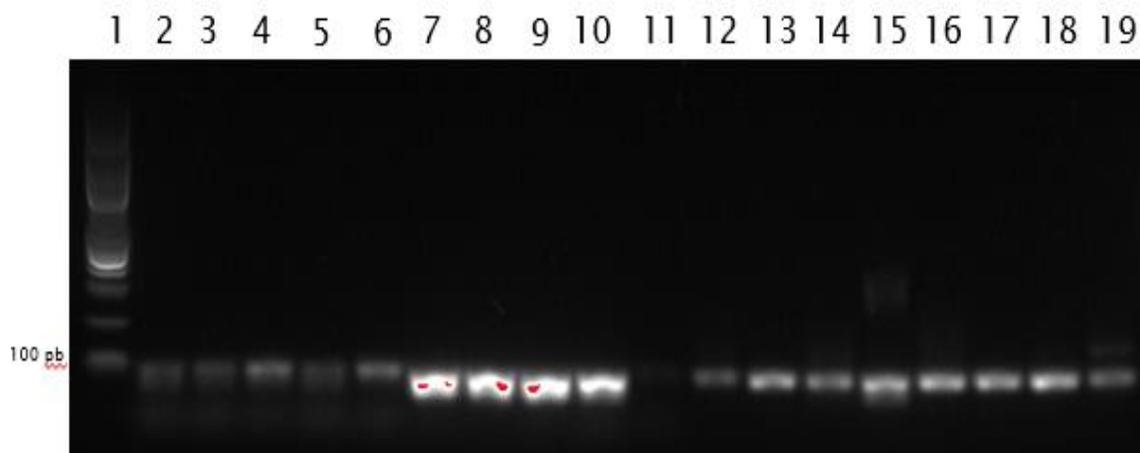


Figura 30. Perfil electroforético de fragmentos de DNA de *E. faecium* MXVK29, en diferentes puntos del crecimiento celular (8, 16, 24h). Carril 1: Marcador 100 pb New England BioLabs; Carril 2: *entA* (16 h); Carril 3: *entA* (8 h); Carril 4: *entA* (24 h); Carril 5: *entA* (16 h); Carril 6: *entA* (24 h); Carril 7: *gen ref* (24 h); Carril 8: *gen ref* (16 h); Carril 9: *gen ref* (24 h); Carril 10: *gen ref* (16 h); Carril 11: *entF* (8 h); Carril 12: *entF* (8 h); Carril 13: *entF* (16 h); Carril 14: *entF* (16 h); Carril 15: *gen ref* (8 h); Carril 16: *entF* (24 h); Carril 17: *entF* (24 h); Carril 18: *entF* (24 h); Carril 19: *entF* (16 h).

Se eligieron tres fragmentos para su purificación y secuenciación, correspondientes a los tres genes de interés (*entA*, *entF* y gen de referencia). Se pudo constatar que los amplicones corresponden a los genes que han de cuantificarse por PCR en tiempo real (Tabla 24).

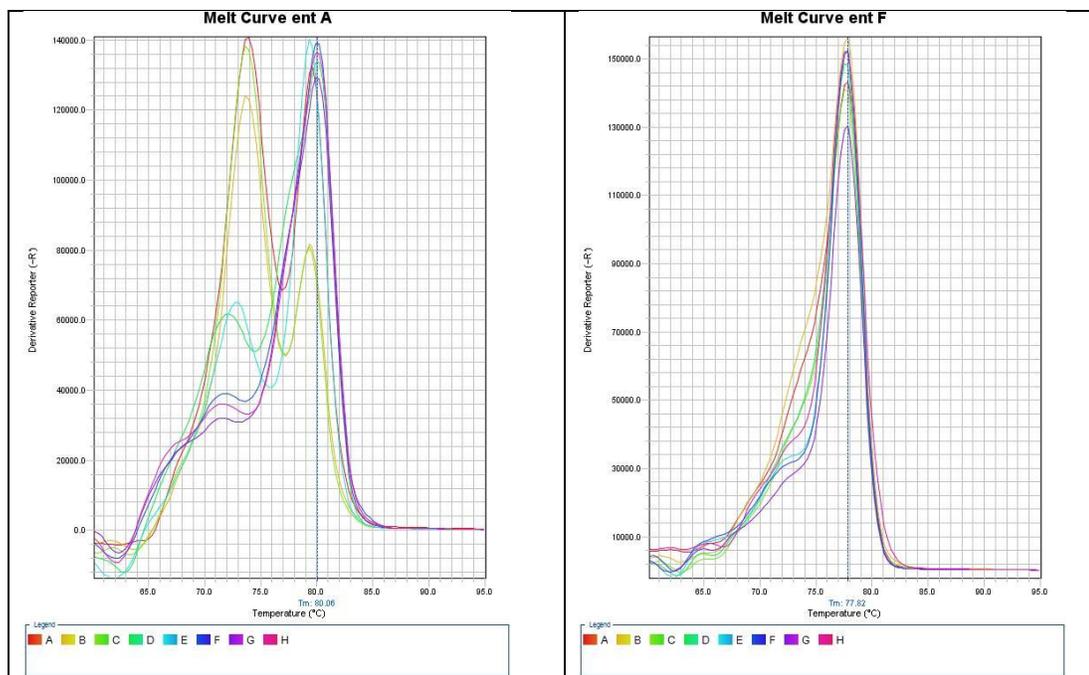
Tabla 24. Resultado de BLAST en la base de datos del NCBI para los genes *entA*, *entF* y gen de referencia de la cepa *Enterococcus faecium* MXVK29

	Descripción	E value	Ident
<i>entA</i>	<i>Enterococcus faecium</i> strain E5 enterocin A (<i>entA</i>) gene, partial cds	1e-39	98%
<i>entF</i>	<i>Enterococcus faecium</i> partial enterocin A operon (<i>entAIFK</i> genes), strain MTCC 5153	6e-175	100%
gen referencia	<i>Enterococcus faecium</i> strain SM31 partial cds	1e-179	99%

6.6 PCR en tiempo real

6.5.1 Estandarización de qPCR con SYBR Green

Con el cDNA molde del tiempo 0 de cultivo de la cepa *E. faecium* MXVK29 se muestran las curvas Melt (Figura 31) con sistema de detección SYBR Green en PCR en tiempo real, utilizando un termociclador StepOne™ Real-Time PCR Software v2.2 (Applied Biosystem).



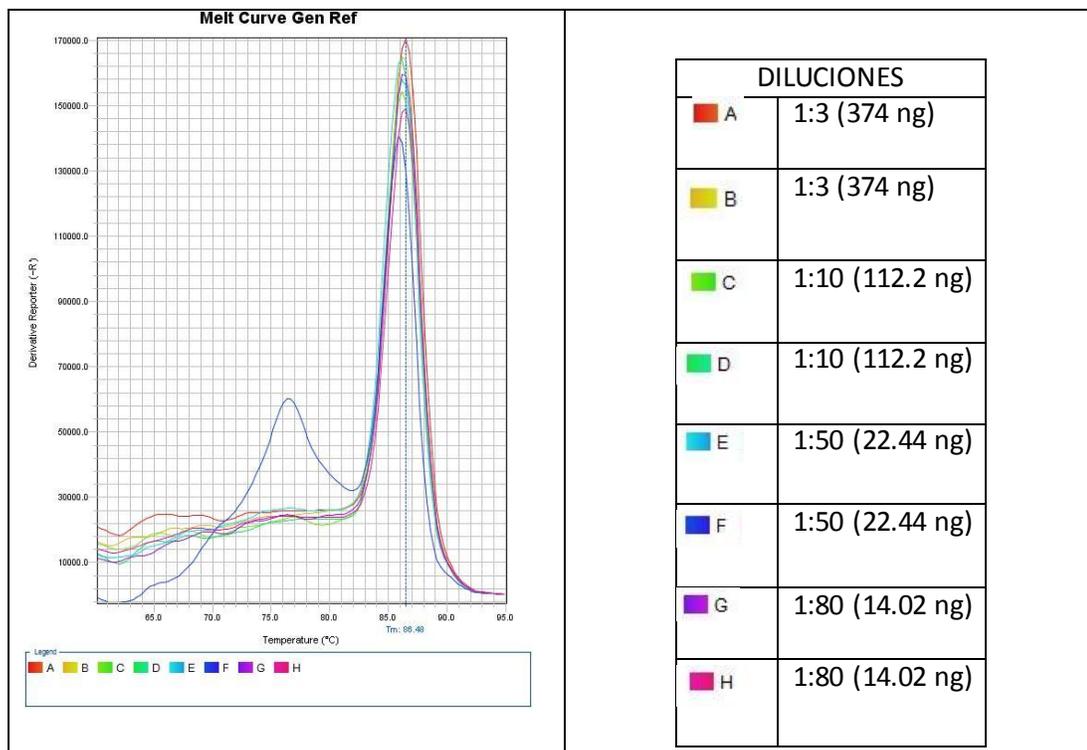


Figura 31. Curvas Melt de cDNA de *E. faecium* MXVK29 con diluciones a partir del calibrador (tiempo 0 de cultivo) para cada uno de los genes *entA*, *entF* y gen de referencia

Como se puede observar las curvas Melt para los tres genes muestran que cuanto más diluida se encuentra la muestra más específica es la amplificación. Después de corroborar que la amplificación corresponde a un solo producto en cada uno de los genes evaluados, se validaron las eficiencias de cada uno de los genes (*entA*, *entF* y gen de referencia).

6.5.2 Validación del gen de referencia

Tabla 25. Datos de CT y linearización de diluciones del calibrador para la validación de eficiencias de los genes *entA*, *entF* y gen de referencia de la cepa *Enterococcus faecium* MXVK29

Dilución	<i>entA</i>		<i>entF</i>		Gen Ref	
	log CONC	CT	log CONC	CT	log CONC	CT
1:3	2.57	20.75	2.57	23.25	2.57	14.9
1:3						
1:10	2.04	22.75	2.04	23.75	2.04	16.6
1:10						
1:50	1.35	23.75	1.35	26.1	1.35	17.75
1:50						
1:80	1.14	25.7	1.14	27.5	1.14	19.6

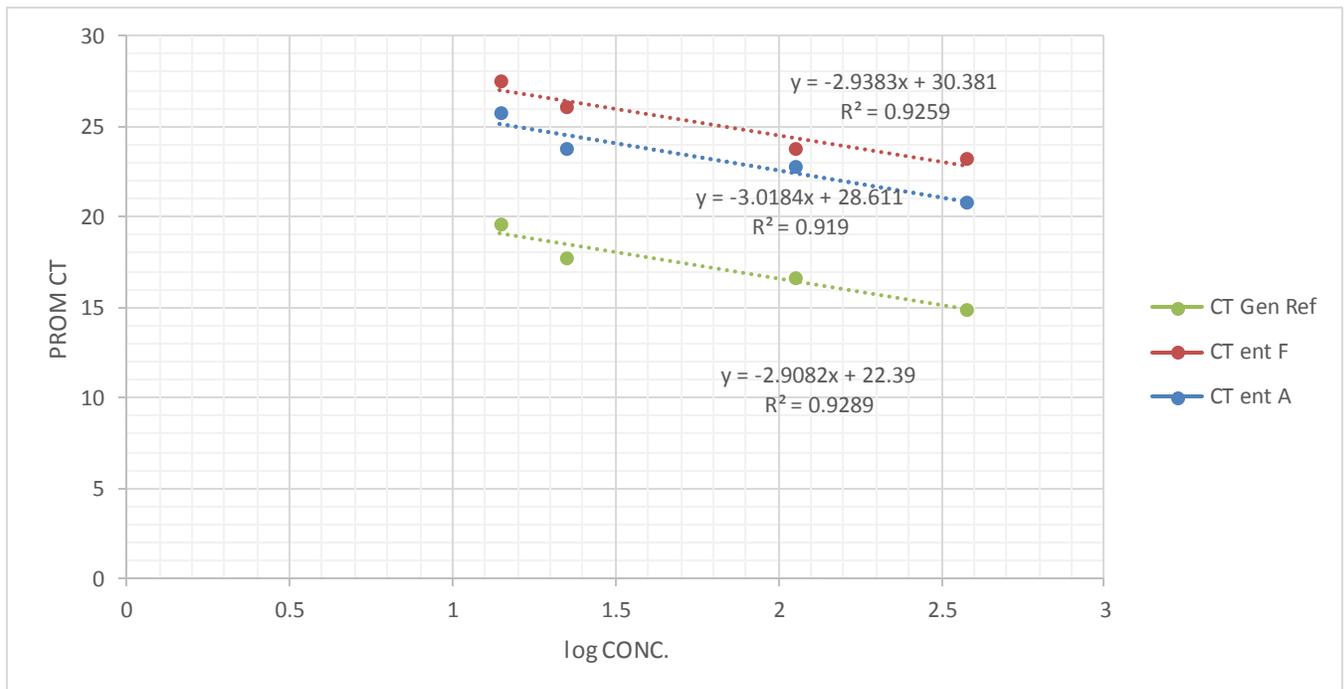


Figura 32. Validación del gen de referencia para la cuantificación de los genes *entA* y *entF* de la cepa *Enterococcus faecium* MXVK29

Tabla 26. Eficiencias para los genes *entA*, *entF* y gen de referencia de la cepa *Enterococcus faecium* MXVK29

Gen	Pendiente (m)	% Eficiencia Amplificación	Eficiencia $E=10^{(-1/m)}$
<i>entA</i>	-3.01	107	2.14
<i>entF</i>	-2.93	109	2.18
Gen Ref	-2.90	110	2.20

Se realizó la validación del gen de referencia y en la figura 32 se puede apreciar que las eficiencias son similares y comparables, es decir, que el gen de referencia evaluado sí servirá de normalizador en la cuantificación relativa de los genes *entA* y *entF*. En la Tabla 26 se puede observar que las tres eficiencias calculadas se encuentran dentro del intervalo permitido que va de 1.8 a 2.2. Sin embargo, los valores indican que en un segundo ensayo se debe incluir un punto más diluido para ajustar una eficiencia más cercana a 2, es decir al 100% de amplificación.

6.5.3 Cuantificación relativa por el método CT comparativo

La cuantificación relativa de los genes blanco se realizó en un primer ensayo con dos replicas (Figura 33-38). El cálculo de los valores de CT se realizó de forma manual, debido a que no se logró normalizar los valores para la cuantificación. Se utilizó el software Step-one.

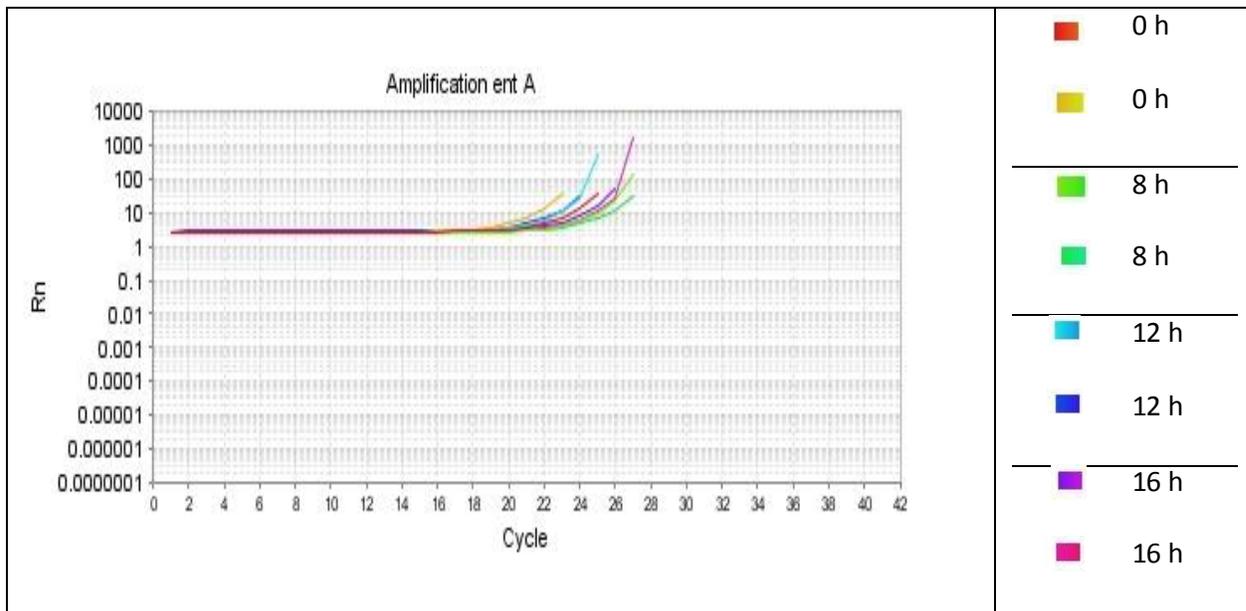


Figura 33. Amplificación de *entA* por PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green para cDNA de *E. faecium* MXVK29 a las 0, 8, 12, 16 h.

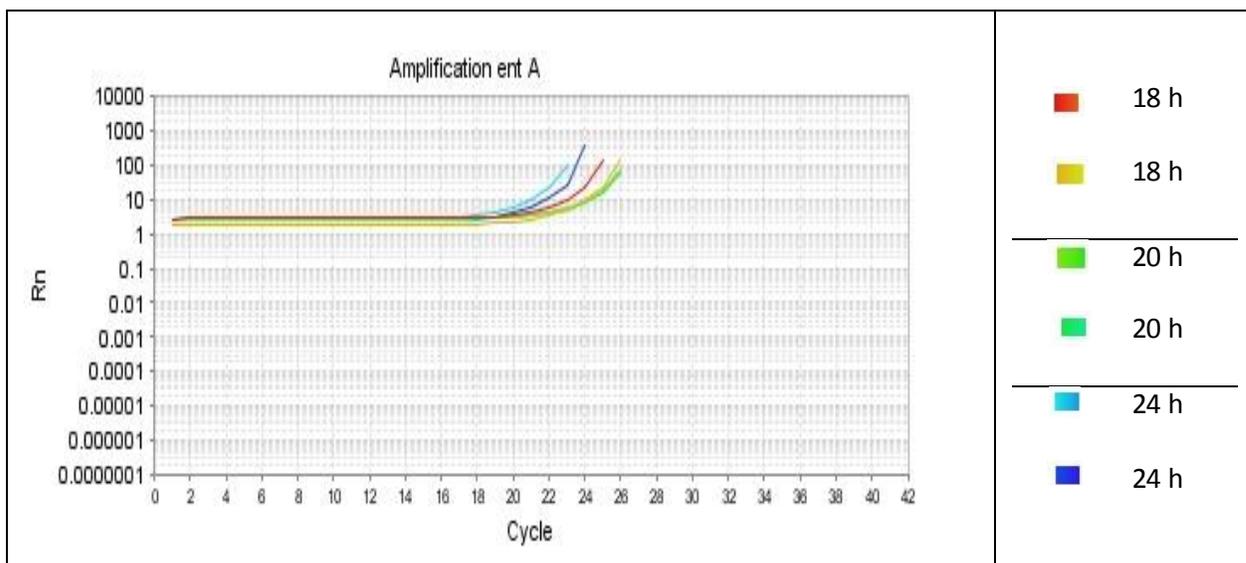


Figura 34. Amplificación de *entA* por PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green para cDNA de *E. faecium* MXVK29 a las 18, 20 y 24 h.

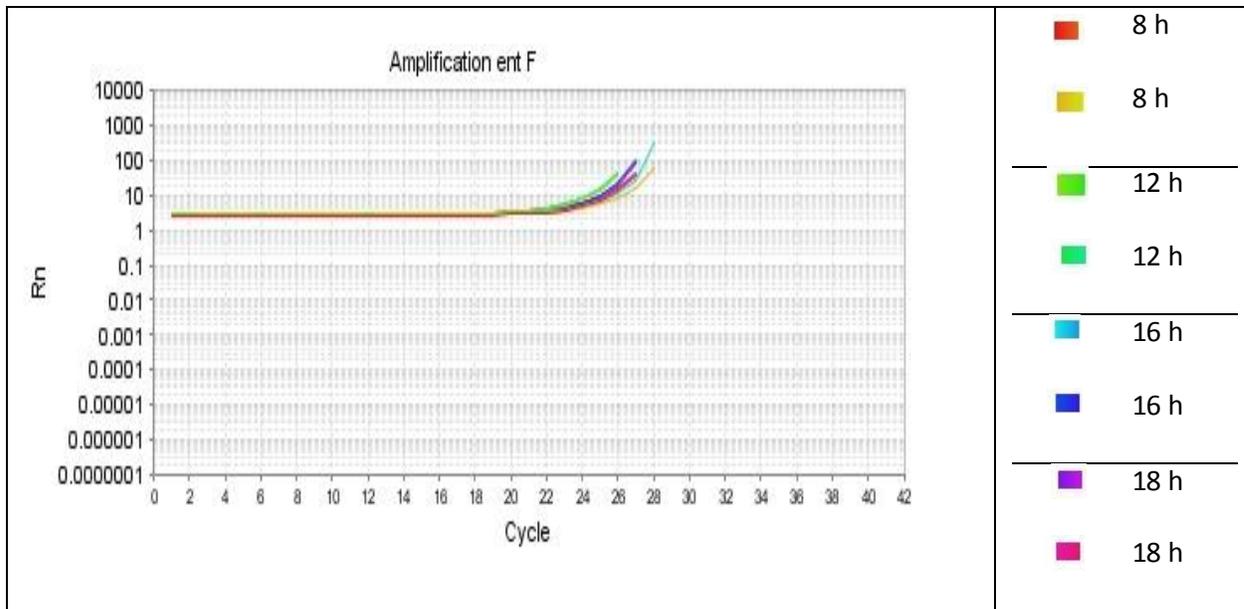


Figura 35. Amplificación de *entF* por PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green para cDNA de *E. faecium* MXVK29 a las 8, 12, 16 y 18 h.

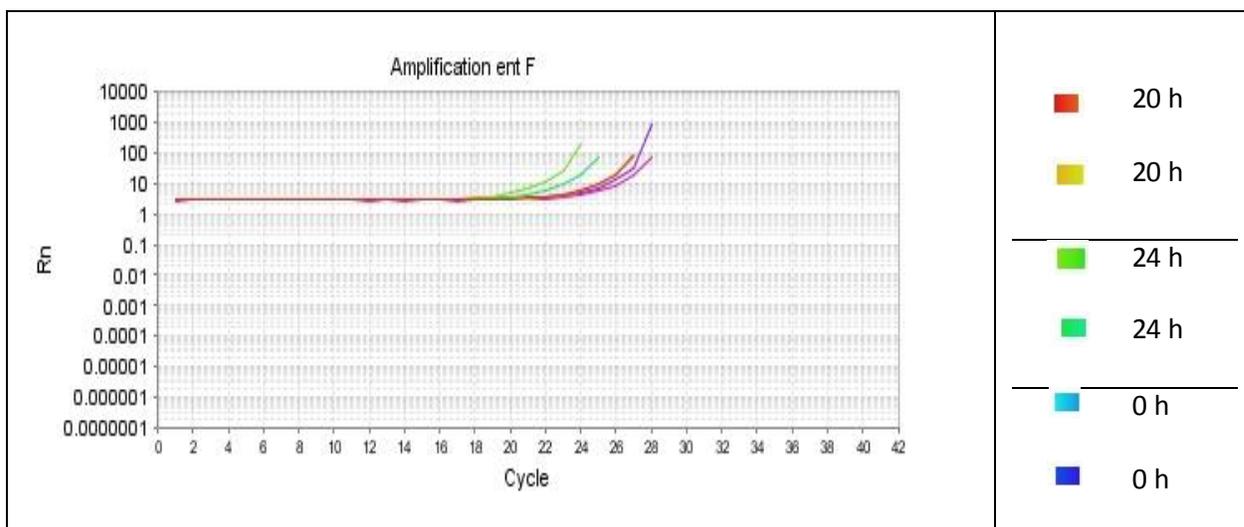


Figura 36. Amplificación de *entF* por PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green para cDNA de *E. faecium* MXVK29 a las 20, 24 y 0 h.

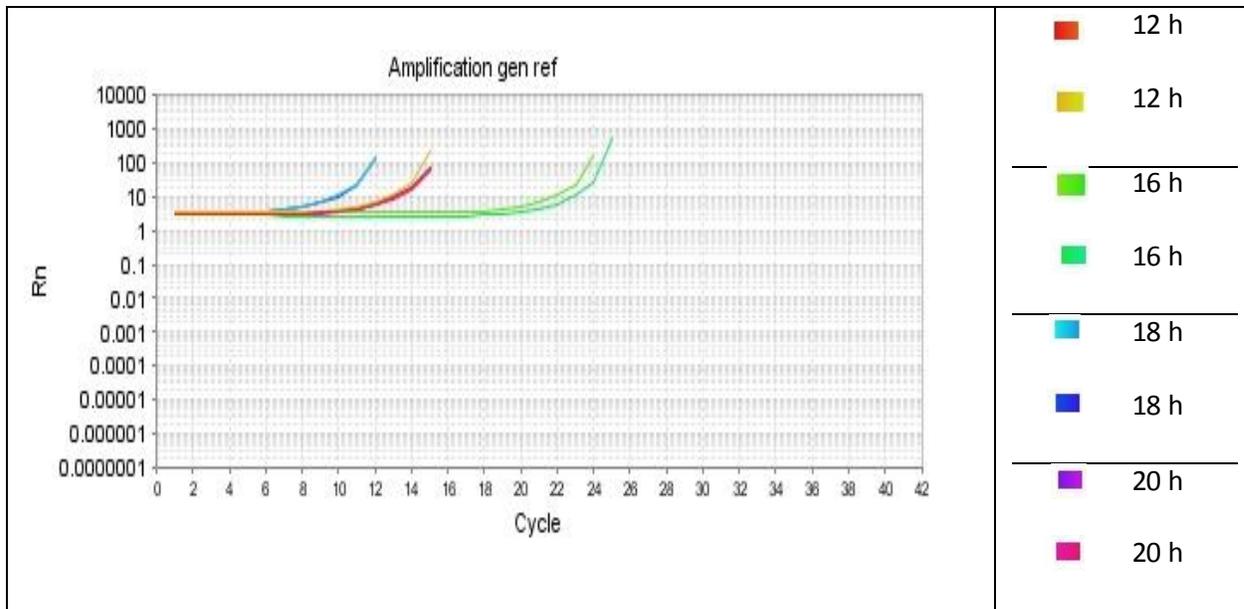


Figura 37. Amplificación del gen de referencia por PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green para cDNA de *E. faecium* MXVK29 a las 12, 16, 18 y 20 h.

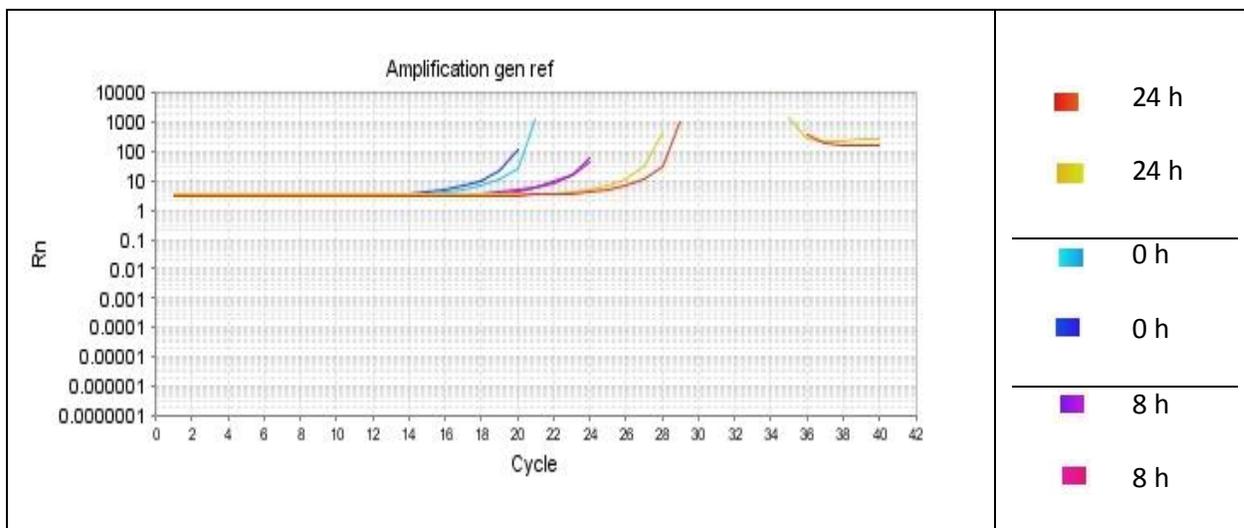


Figura 38. Amplificación del gen de referencia por PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green para cDNA de *E. faecium* MXVK29 a las 24, 0 y 8 h.

Tabla 27. Cuantificación relativa en n° de veces de expresión de los genes *entA*, *entF* de la cepa *Enterococcus faecium* MXVK29 por el método CT comparativo

GEN	Tiempo	PROM CT	PROM Gen Ref	ΔCT (CT _{bco} -CT _{gen-ref})	$\Delta\Delta CT$ (CT _{bco} - CT _{gen-ref})	No. veces diferencias (2) ^(-ΔΔCT)
	0	21.6	16.75	4.85	0	1.00
<i>entA</i>	8	24.2	18.25	5.95	1.1	0.466
	12	22.05	10.45	11.6	6.75	0.009
	16	24.05	20.85	3.2	-1.65	3.13
	18	22.1	9	13.1	8.25	0.003
	20	23	11.4	11.6	6.75	0.009
	24	20.4	24.75	-4.35	-9.2	588.13
<i>entF</i>	0	24.4	16.75	7.65	0	1.00
	8	27.1	18.25	8.85	1.2	0.43
	12	22.5	10.45	12.05	4.4	0.04
	16	24	20.85	3.15	-4.5	22.62
	18	24.1	9	15.1	7.45	0.005
	20	24	11.4	12.6	4.95	0.03
	24	20.5	24.75	-4.25	-11.9	3821.70

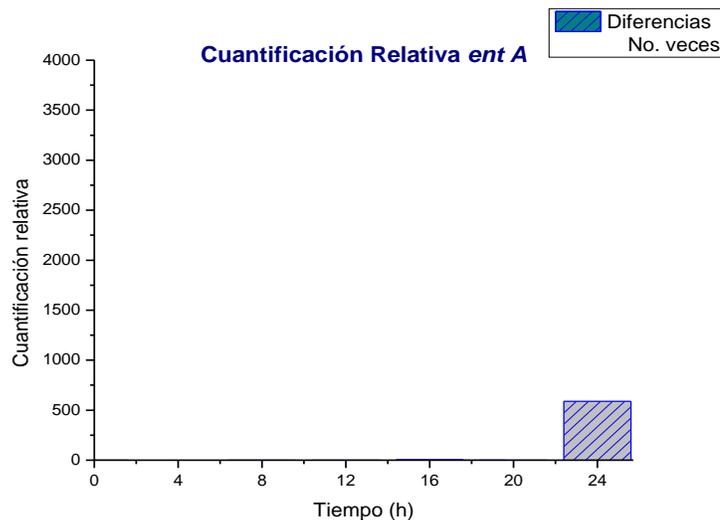


Figura 39. Cuantificación relativa del gen *entA* de *E. faecium* MXVK29 en número de veces de diferencia de expresión por el método CT comparativo, PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green

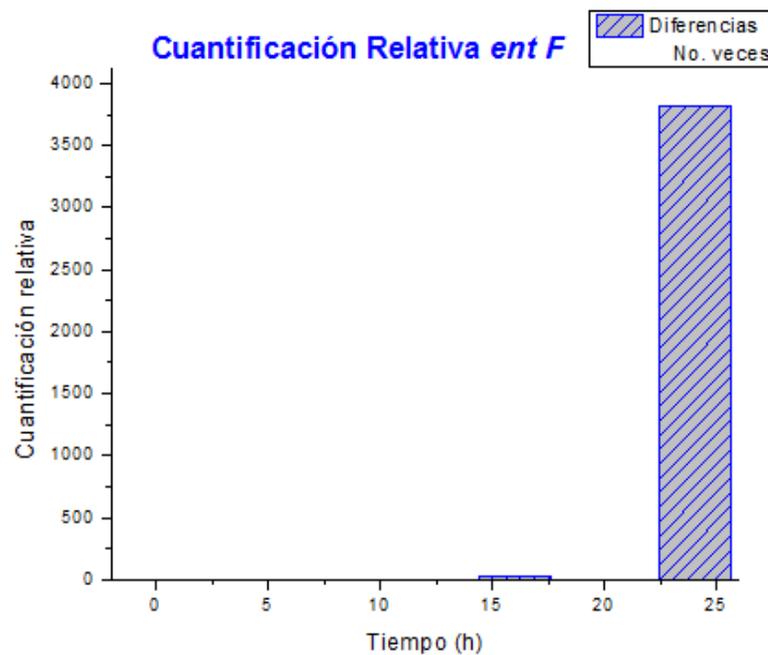


Figura 40. Cuantificación relativa del gen *entF* de *E. faecium* MXVK29 en número de veces de diferencia de expresión por el método CT comparativo, PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green

De manera general, se puede observar en las figuras de amplificación de cada uno de los genes evaluados que la tendencia de expresión no varía mucho a lo largo del tiempo de cultivo. En la cuantificación relativa que se realizó por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, se pudo observar, como se muestra en las figuras 39 y 40, que a las 16 h hubo diferencias de expresión y que el gen *entA* se expresó 3 veces más que el cultivo control (0 h) y *entF* 22 veces más que su control. Sin embargo el máximo de diferencias de expresión en número de veces se observó a las 24 h de cultivo, en las que *entF* se expresa 3,821 veces más y *entA* se expresa 588 veces más que su control.

Comparando este primer ensayo en PCR en tiempo real en un sistema de detección con SYBR Green, se puede observar que los resultados de actividad antibacteriana (Figura 27) coinciden con la tendencia de expresión del gen que codifica para la enterocina A,

en donde se observa que el máximo de actividad antibacteriana es a las 24 h, mientras que la diferencia en número de veces para *entA* también tiene su máximo a las 24 h.

En la búsqueda para determinar si esta aseveración es correcta, se realizó un segundo ensayo para corroborar la tendencia de expresión, en un termociclador Rotor Gene 6000 Software 1.7 (CORBETT).

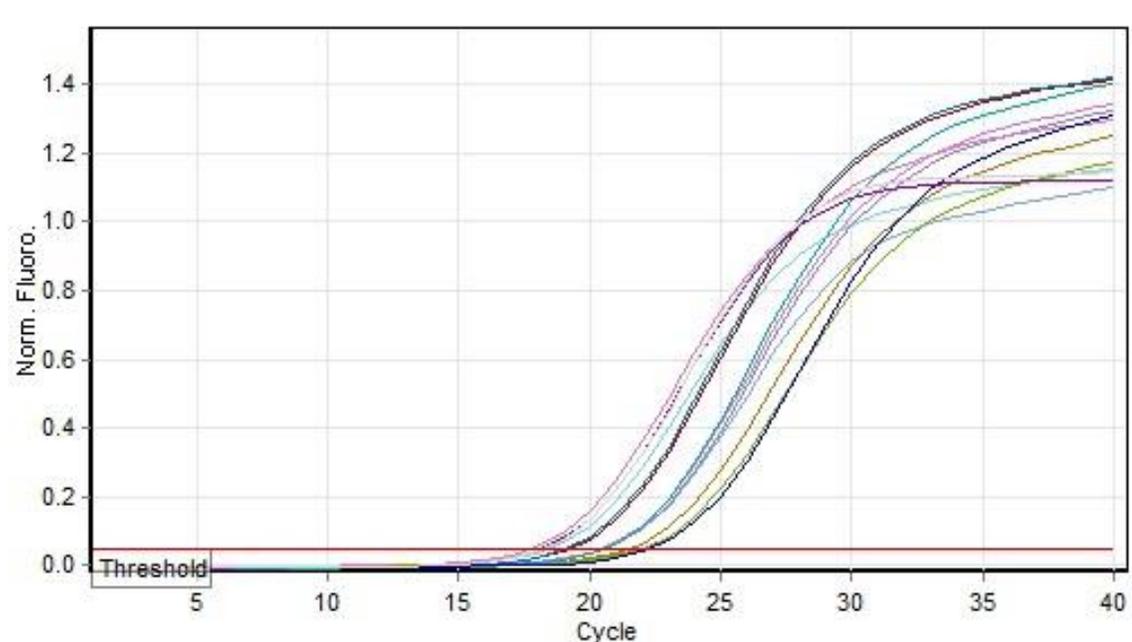


Figura 41. Amplificación de *entA* por PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green para cDNA de *E. faecium* MXVK29 a las 0, 8, 12, 16, 18, 20 y 24 h (Ensayo 2).

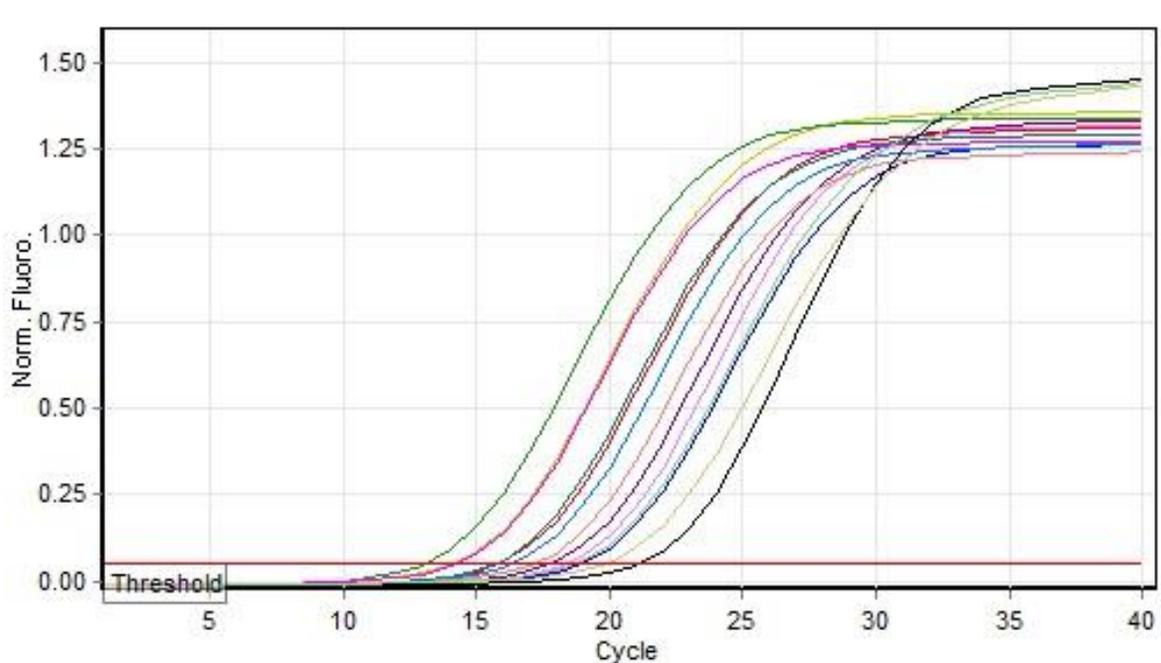


Figura 42. Amplificación de *entF* por PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green para cDNA de *E. faecium* MXVK29 a las 0, 8, 12, 16, 18, 20 y 24 h (Ensayo 2).

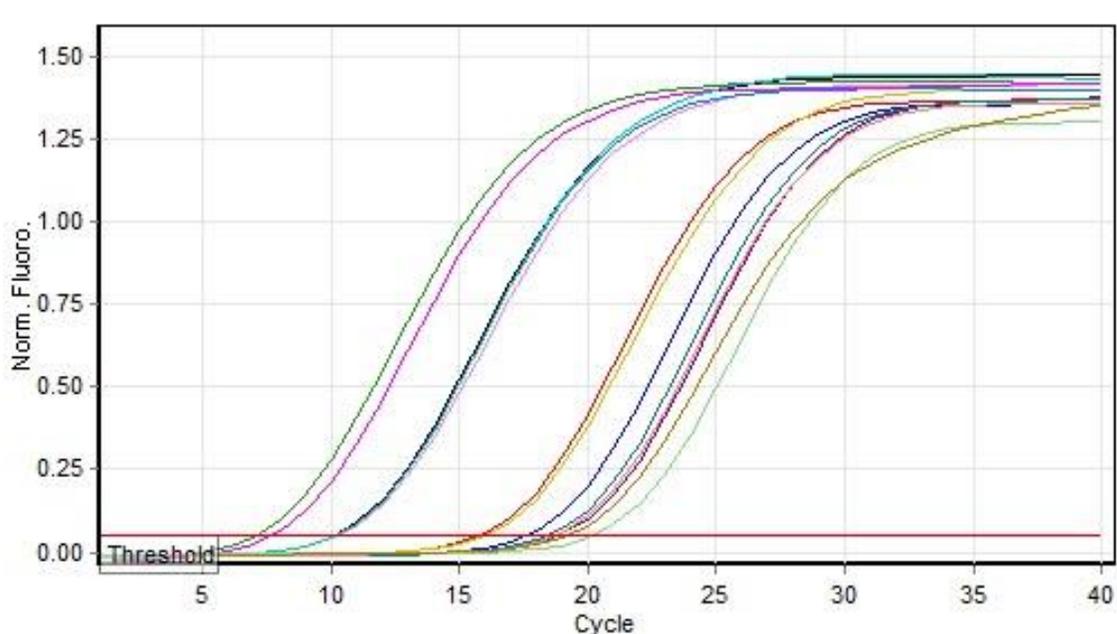


Figura 43. Amplificación del gen de referencia por PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green para cDNA de *E. faecium* MXVK29 a las 0, 8, 12, 16, 18, 20 y 24 h (Ensayo 2).

Tabla 28. Cálculo de las diferencias en no. de veces de expresión de los genes *entA*, *entF* de la cepa *Enterococcus faecium* MXVK29 por el método CT comparativo (Ensayo 2)

GEN	Tiempo	PROM CT	PROM Gen Ref	Δ CT (CTbco-Ctgen-ref)	$\Delta\Delta$ CT (CTbco-Ctgen-ref)	No. veces diferencias $(2)^{-\Delta\Delta CT}$
	0	20.64	16.83	3.81	0	1.00
<i>entA</i>	8	21.61	19.175	2.435	-1.375	2.59
	12	19.62	11.11	8.51	4.7	0.04
	16	22.88	19.54	3.34	-0.47	1.39
	18	20.86	8.195	12.665	8.855	0.00
	20	23.31	11.02	12.29	8.48	0.00
	24	20.29	22.205	-1.915	-5.725	52.89
<i>entF</i>	0	15.96	16.83	-0.87	0	1.00
	8	19.36	19.175	0.185	1.055	0.48
	12	18.35	11.11	7.24	8.11	0.00
	16	17.4	19.54	-2.14	-1.27	2.41
	18	14.62	8.195	6.425	7.295	0.01
	20	21.33	11.02	10.31	11.18	0.00
	24	12.595	22.205	-9.61	-8.74	427.57

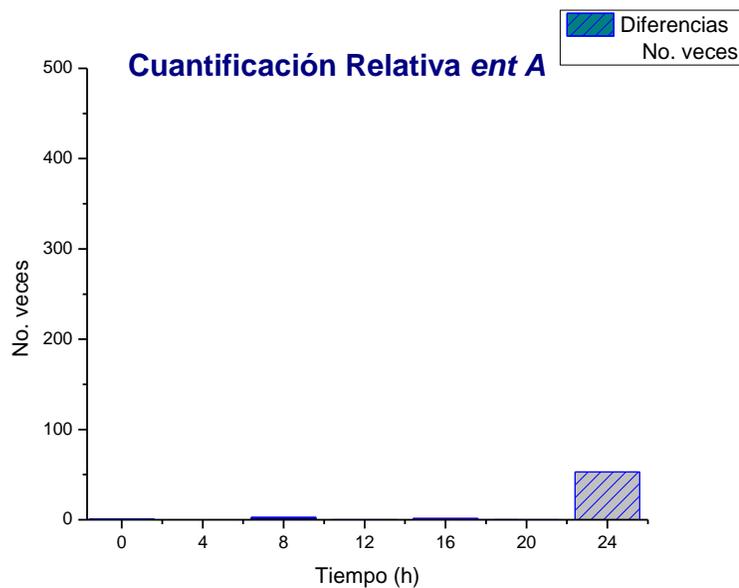


Figura 44. Cuantificación relativa del gen *entA* de *E. faecium* MXVK29 en no. veces de diferencia de expresión por el método CT compartivo, PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green (Ensayo 2)

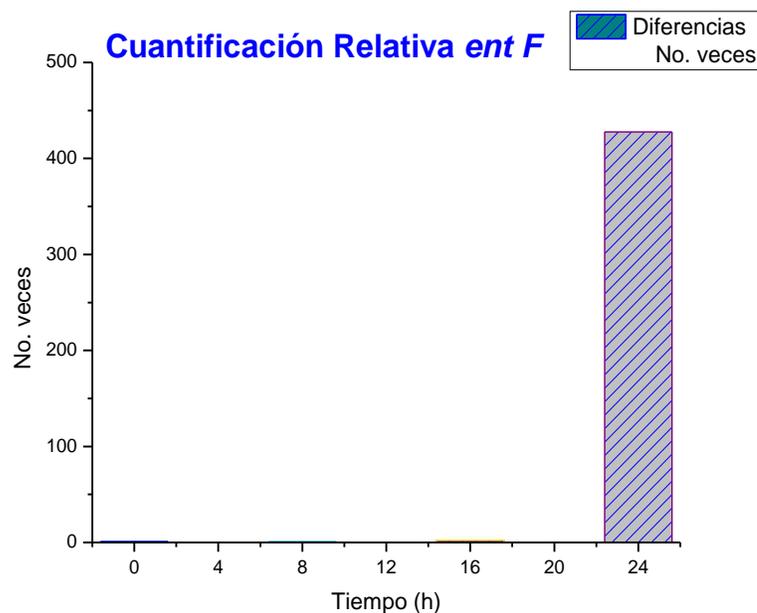


Figura 45. Cuantificación relativa del gen *entF* de *E. faecium* MXVK29 en no. veces de diferencia de expresión por el método CT comparativo, PCR en tiempo real, en un sistema de detección con SYBR Green (Ensayo 2)

Puede observarse que los resultados obtenidos en un segundo ensayo por PCR en tiempo real (Figuras 41-45) en un termociclador Rotor-Gene muestran una tendencia similar que el primer ensayo realizado en termociclador Step-One. Se realizó un segundo ensayo en otro equipo para evaluar si la cuantificación manual que se realizó en el primero era confiable, debido a que no se pudo normalizar el conjunto de datos para la cuantificación. En ambos casos, la expresión del gen inductor (*entF*) es entre 6 y 8 veces mayor con respecto al gen estructural (*entA*), lo que nos indica que posiblemente por cada 6-8 expresiones del gen inductor se expresa una vez el gen estructural, es decir, la producción de la enterocina A ocurrirá si el factor de inducción se está expresando en una magnitud mayor. Ambos ensayos de qPCR coinciden con lo observado para la

actividad antibacteriana por la técnica de difusión en agar (Figura 27), donde se observó que el máximo de actividad se presenta a las 24 h. Solo en este punto se ha logrado determinar esta tendencia, por lo que se recomendaría, en ensayos posteriores, tomar muestras más allá de las 24 h, para observar si la tendencia de expresión de ambos genes sigue aumentando y poder definir si la relación 6:1 o 8:1 gen inductor:gen estructural se mantiene.

8. CONCLUSIONES

La cepa *Enterococcus faecium* UAMI-3 presentó variación en la actividad antibacteriana en las diferentes condiciones de estrés evaluadas, sin embargo; al realizar la amplificación y secuenciación del gen que codifica para la enterocina A, se determinó que la actividad inhibitoria no está dada por la enterocina, de tal forma que el ensayo de expresión no se pudo realizar por PCR en tiempo real.

Hasta este momento se sabe que *Enterococcus faecium* MXVK29 se inhibe al ser sometida a diferentes factores de estrés, pero se puede seguir estudiando la expresión de la enterocina a través de fermentación en tiempos más amplios de cultivo o implementar otros factores de estrés que si puedan estimular la producción de la enterocina.

La cuantificación por PCR en tiempo real para *Enterococcus faecium* MXVK29 presentó un máximo en diferencias de expresión de ambos genes (*entA* y *entF*) a las 24 h de cultivo, lo que concuerda con el máximo determinado de actividad antibacteriana por la técnica de difusión en agar reportada en mm halo de inhibición/mg proteína, observándose una tendencia de expresión promedio de 7:1 (*entF*: *entA*).

9 PERSPECTIVAS

No se descarta seguir trabajando con la cepa UAMI-3, de la cual se pueden inferir cambios importantes de expresión de la proteína causante de la actividad (por lo reportado en este trabajo con la técnica de difusión en agar), que ha permitido observar el estímulo resultante en cada una de las condiciones de estrés aplicadas.

10 TRABAJO PRESENTADO

- CARTEL: “Variación en la actividad inhibitoria de *Enterococcus faecium* bajo diferentes condiciones de estrés” en el XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería en Guadalajara Jalisco, Jalisco (2015).



Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería



VARIACIÓN EN LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE *Enterococcus faecium* BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS

Adriana López-Arvizu, Israel García-Cano, Yenizey Álvarez-Cisneros y Edith Ponce-Alquicira, Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. Departamento de Biotecnología, México, D.F. 09340, pae@xanum.uam.mx

Palabras clave: BAL, bacteriocinas, *Enterococcus faecium*

INTRODUCCIÓN

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana. Entre los microorganismos productores de bacteriocinas, las bacterias ácido lácticas (BAL) son ampliamente estudiadas (1). La Enterocina A es un péptido producido por *Enterococcus faecium* que presenta inhibición contra *Listeria monocytogenes* (2), su regulación está mediada por sistemas de transducción de señales. Los factores que activan estos sistemas incluyen, la presencia de otra bacteria competidora o algún tipo de estrés, como la acidificación, la adición de NaCl, etanol y peróxido de hidrogeno entre otros (3).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto en la actividad antimicrobiana de diferentes factores de estrés en dos cepas de *Enterococcus faecium* aisladas de diferentes fuentes.

METODOLOGÍA

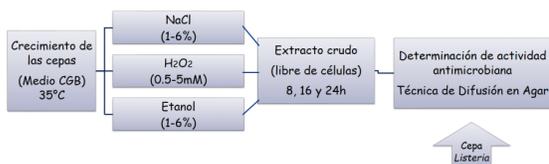


Fig. 1. Metodología general realizada en cepas de *Enterococcus faecium* UAMI-3 y MXVK29

RESULTADOS

El cultivo de las cepas de *E. faecium* en condiciones de estrés provocó cambios en la actividad antibacteriana. En la figura 2 y 3 se observa que *E. faecium* UAMI-3 mostró un máximo en la actividad inhibitoria en presencia de 2% de etanol a las 24h, 6% de NaCl a las 24 h y 5 mM de H₂O₂ a las 16 h. Como respuesta al estrés, el microorganismo mostró una mayor actividad antimicrobiana, la cual se puede deber a un mecanismo de defensa. Por otra parte la cepa de *E. faecium* MXVK29 presentó un comportamiento diferente ya que la adición de etanol, H₂O₂ y NaCl inhibió la actividad antimicrobiana, a diferencia del cultivo control (sin la adición de NaCl, etanol y H₂O₂: figura 3B) lo que sugiere que la cepa no fue capaz de producir el compuesto antimicrobiano bajo condiciones de estrés.

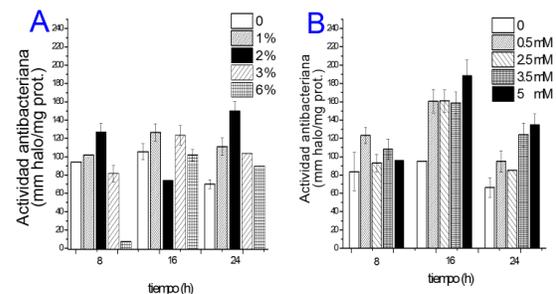


Fig. 2. Actividad antibacteriana de *Enterococcus faecium* UAMI-3 bajo condiciones de estrés. A) Etanol; B) H₂O₂.

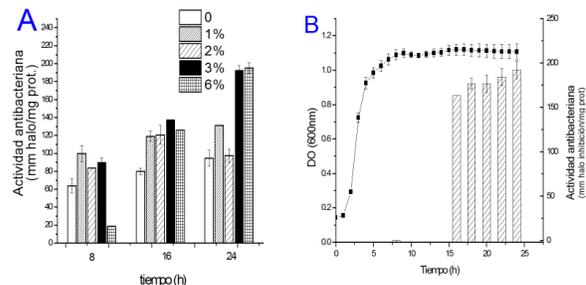


Fig. 3. A) Actividad antibacteriana bajo estrés con NaCl (*Enterococcus faecium* UAMI-3); B) Actividad antibacteriana durante el crecimiento de *Enterococcus faecium* MXVK29.

CONCLUSIONES

La actividad antibacteriana en cepas de *Enterococcus faecium* se vio modificada al someterse a diferentes factores de estrés.

En la cepa MXVK29 la actividad se inhibió, mientras que la cepa UAMI-3 presentó variación en las diferentes condiciones.

AGRADECIMIENTO: Al CONACYT

por la beca para estudios de posgrado otorgada durante la realización de este proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

- Chen, H. Hoover, D.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Food Sci Food Technol*, 2: 82-99.
- Cintas L. M., Gassaus, P., Fernández, M. F., Hernández P. E., (2000) "Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria." *Food Microbiol*. 15 (3): 2
- Álvarez C. Y. M., Sáenz, T., Fernández, J., Ponce, E., (2011). Enterocins: Bacteriocins with applications in the food industry. En A. Méndez-Villas, *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances* (2: 1330-1341). Badajoz, Spain: Formatex Research Center.

11 REFERENCIAS

Abriouel, H., Lucas, R., Ben, O.N., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A. (2005). Enterocin AS-48RJ: a variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by *Enterococcus faecium* RJ16 isolated from food. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 383-397.

Alquicira P.L. (2006). Tesis de Maestría. Determinación del mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133. Iztapalapa, México: Universidad Autónoma Metropolitana.

Alvarado, R.C.C. (2000). Tesis de Licenciatura. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias lácticas de un queso ahumado andino artesanal. Posterior uso como cultivo iniciador. Venezuela: Universidad de los Andes Mérida.

Álvarez, C.Y.M. (2008). Tesis de Maestría. Identificación de bacteriocinas producidas por *Enterococcus sp.* aislados de productos cárnicos. Iztapalapa, México: Universidad Autónoma Metropolitana.

Álvarez, C.Y.M., Sáenz, T., Fernández, J., Ponce, E. (2011). Enterocins bacteriocins with applications in the Food industry. En *Science against microbial pathogens communicating current. Research and technological advances*. Editor Antonio Méndez Vilas. Publishing formatex research center. España ISBN-13:978-84-93-9843-2-8, 2:1330-1341.

Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M., Nes, I.F. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1676-1682.

Aymerich, T., Artigas, M.G., Garriga, M., Monfort, J.M., Hugas, M. (2000a). Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium*

- CTC492. Optimization of in vitro production and anti-listerial effect in dry fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 88:686–694.
- Axelsson, L.T. (2004). Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. En: Salminen, S., Von Wright A., Ouwehand, A (Eds.); *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3rd rev. and exp. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 1-33.
- Barbosa, C.G.V., Pothakamury, U.R., Palou, E., Swanson, B.G. (1997). Nonthermal preservation of foods. *Food Engineering*, 3:276-284.
- Bedolla, S. (2004). *Introducción a la tecnología de los alimentos*, Edo. México: Limusa 2004, 78-92.
- Bertrand, C. (2003). Evolution of lactoglobulin and lactoalbumin content during yogur fermentation. *International Dairy Journal*, 13:39-48.
- Blanco, S., Delahaye, P., Fragenas, N. (2006). Evaluación física y nutricional del yogurt con frutas tropicales bajo en calorías. *Revista Facultad de Agronomía. (Maracay) Venezuela*, 32:131-132.
- Bouzar, F., Cerning, J., Desmazeaud, M. (1997). Exopolysaccharide production and texture promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yogurt production. *Journal Dairy Science*, 80:2310-2317.
- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25:169-193.
- Camargo, P.I., Gómez, B.S., Salazar, M.V. (2009). Impacto de las bacteriocinas, importancia como preservantes en la industria de alimentos. *Teoría y praxis investigativa*, 4(2):27-31.

Chen, H., Hoover, D.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Technology*, 2:82-99.

Cheftel, C. (1995). High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology International*, 1:75-90.

Cintas L. M., Casaus, P., Fernandez, M.F., Hernandez, P. E. (2000). Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiology*, 15(3):289–298.

Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Microbiology Reviews*, 3:777-788.

Cristóbal D.R.L. (2008). Tesis de maestría. Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Davidson, B.E., Llanos, R.M., Cancilla, M.R., Redman, N.C., Hiller, A.J. (1995). Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 5:763-784.

De Martinis, E.C.P., Crandall, A.D., Mazzotta, A.S., Montville, T.J. (1997). Influence of pH, Salt, and Temperature on nisin Resistance in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 60(4):420-423.

De la Fuente, S.N.M., Barboza, C.J.E. (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Acta Universitaria*, 20:43-52.

Diario Oficial de la Federación. (2012). ACUERDO por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias. 3ra. Sección. 1-113.

- Díez A.L., (2011). Tesis doctoral. Efectos de agentes enológicos y pediocina PA-1 sobre las bacterias lácticas del vino. Logroño, España: Universidad de la Rioja.
- Djamel, D., Gunnar, F., Yann, H., Lynn, M.M., Herve, P. (2006). The Continuing Story of Class Ila Bacteriocins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 70(2):564–582.
- Doyle, P.M., Beuchat, R.L. (2007). Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds. *Food Microbiology fundamentals and frontiers*, 3a ed. Ed. American Society for Microbiology, 33:747-769.
- Du Toit, M., Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.T., Holzapfel, W.H. (2000). Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 88:482-494.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A. (2000). Class Ila bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24:85-106.
- Foulquié, 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.
- Fernández, M. (2000). Active food packaging. *Food Sci Tech Internat*, 2:97-108.
- Gerts J. E. (2011). RNA Detection and Visualization. *Methods and protocols*. Department of Molecular Genetics Weizmann Institute of Science. Ed Humana press. Rehovot, Israel, 19-20
- González M.B.E., Gómez T.M., Jiménez S.Z. (2003). Bacteriocinas de probióticos. *Revista de salud pública y nutrición*, 4(2):72-79.
- Gould, G.W. (1996). Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *Journal of Food Protection*, Suppl:82-86.

Hammes, P.W., Tichaczek, S.P. (1994). The potencial of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food. *Lebensmittel-Untersuchung und-forschung*, 198:193-201.

Helander, Y., Von W.A., Mattila, T. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science and Technoogy*, 146-150

Hickey, R.M., Twomey, D.P., Ross, R.P., Hill, C. (2003). Potential of the enterocin regulatory system to control expression of heterologous genes in *Enterococcus*. *Journal Applied Microbiology*, 95(2):390-397.

Jack R.W., Tagg, J.R., Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Review*, 171-200.

Jay, J.M. (2000). *Microbiología moderna de los alimentos*. 4ª.ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España, 19-27, 106-108, 441-475.

Kang, J.H., Lee, M.S. (2005). Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. *Journal of Applied Microbiolgy*, 98:1169-1176.

Leveau, J.Y., Bouix, M. (2000). *Microbiología industrial: Los microorganismos de interés industrial*. Ed. Acribia, Zaragoza, España, 163-187, 206-207, 228-240.

Lebreton, F., Schaik, W., Sanguinetti, M., Posteraro, B., Torelli, R., Le Bras, F., Verneuil, N., Zhang, X., Giard, J.C., Dhalluin, A., Willems, J.L., Leclercq, R., Cattoir, V. (2012). AsrR Is an Oxidative Stress Sensing Regulator Modulating *Enterococcus faecium* Opportunistic Traits, Antimicrobial Resistance, and Pathogenicity. *PLoS Pathogens*, 8(8):e1002834.

López, J.E., Ochoa Z. A., Anaya, L.J. L., Martínez, T.M., Medina, M.E. (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas*, 39(3):49-57.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2004). *Brock. Biología de los microorganismos 10a ed.* Ed. Prentice Hall. Madrid, España, 122, 352, 400.

- Marcos B.E., Castillo M.F.A., Dimitrov, S.T., Gombossy D.M., Franco, B.D., De Souza O. R. P. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32:134-142.
- Martin, K.A. (2002). Capacidad Antagonista frente a la *Listeria monocytogenes* de dos sustancias tipo Bacteriocina utilizadas en combinación con NaCl y CO₂. Chile: Universidad Austral de Chile.
- Martínez, J.A., Gosset, L.G. (2007). Ingeniería metabólica de bacterias. *Biotecnología*. 14:373-384
- Martínez, J.M, Kok, J., Sanders, J.W., Hernández, P.E. (2000). Heterologous co-production of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. *Applied Environmental Microbiology*, 66:3543-3549.
- Martínez F.B. (1996). Tesis Doctoral. Bacteriocinas de *Lactococcus lactis* Aislados de quesos Asturianos: Nisina Zy Lactococina 972. Oviedo, España: Universidad de Oviedo.
- Mendoza, F., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez, B.M., Valdivia, E. (1999). Antilisterial activity of peptide AS-48 and study of changes induced in the cell envelope properties of an AS-48- adapted strain of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:618–625.
- Monroy-Dosta, M.D., Castro B.T., Fernández P.F.J., Mayorga, R.L. (2009). Revisión Bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS*, 73:63-72.
- Moreno, M.R.F., Leisner, J.J., Tee, L.K., Ley, C., Radu, S., Rusul, G., Vancanneyt, M., De Vuyst, L. (2002). Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Applied Microbiology*, 92:147-157.
- Nes, I.F., Holo, H., Fimland, G., Hauge, H.H. y Nissen-Meyer, J. (2002). Unmodified peptide-bacteriocins (class II) produced by lactic acid bacteria. In *Peptide Antibiotics, Discovery, Modes of Action and Application*. Edited by C.J. 30 Dutton, M.A. Haxell, H.A.I. McArthur and R.G. Wax. New York: Marcel Deckker, 61-87.

- Nettles, C.G. (1993). Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 56:338-356.
- Ningun C.H.L., Chen, L. (1994). Antimicrobial effects of pressurized carbon dioxide on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 59(3):657-659.
- Parra Huertas, R. A. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Revista de biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 8:93-105.
- Pfaffl, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29:2002-2007.
- Quesada, G.C. (2008). Daño y respuesta al estrés oxidativo en bacterias del género *Bacteroides*: resistencia a los antimicrobianos y mecanismos de virulencia. *Rev Biomed*, 19:162-168.
- Rattanachaikunsopon, P., Phumkhachorn, P. (2010). Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of Biological Research*, 1(4):218-228.
- Roche Applied Science. (2002). Selection of Housekeeping Genes. Technical Note No. LC 15
- Schillinger, U., Lucke, F.K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55:1901-1906.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W. (1976). Bacteriocins of grampositive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40(3):722-756.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*, 75:291-295.
- Van, B.M.J., Martin-Visscher, L. A., Vederas, J. C. (2002). Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends in Microbiology*, 19(8):411-418.

- Vázquez, M.S.M., Suárez, M.H., Zapata, B.S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(1):64-71.
- Villani, F., Salzano, G., Sorrentino, E., Pepe, O., Marino, P., Coppola, S. (1993). Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74:380-387.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1990). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal Bacteriology*, 173(2):697-702.
- Yahua, C., Chao, Z., Yunfeng, W., Jhon, S., Lanwei, A., Zhongging, D., Xiaojun, Q., Hongyu, C. (2012). Class Ila Bacteriocins: Diversity and New Developments. *International Journal of Molecular Science*, 13:16668-16707.
- Yin, L., Wu, C., Jiang, S. (2003). Bacteriocins from *Pediococcus pentosaceus* L and S from pork meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(4):1071–1076.
- Yin, L., Wu, C., Jiang, S. (2004). Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5):1146-1151.
- Zuñiga, E.A., Santos, L.E.M. (2007). Tesis de Licenciatura. Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Centro de Investigaciones Químicas: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.