



---

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

---

DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE RESISTENCIA A LA ACCIÓN  
INHIBITORIA DE LA BACTERIOCINA PRODUCIDA POR  
*Pediococcus parvulus* MXVK 133

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA  
P R E S E N T A  
ING. LIZBETH ALQUICIRA PAEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA  
ASESORES: DR. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO  
DRA. CARMEN WACHER RODARTE

MÉXICO, D. F.

MARZO DE 2006.

---

La Maestría en Biotecnología está incluida en el PNP Padrón Nacional de Posgrados del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo consejo, con el convenio **“471-0/Maestría en Biotecnología”**.

---

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa  
aprobó la comunicación de resultados que presentó:

**Lizbeth Alquicira Páez**

El día 13 de Marzo de 2006.

Comité Tutorial:

Director: Dra. Edith Ponce Alquicira  
Biotecnología UAM-I.



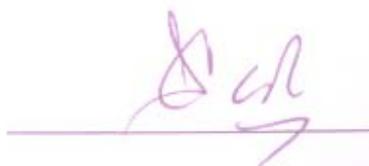
Asesor: Dr. Francisco José Fernández Perrino  
Biotecnología UAM-I.



Asesor: Dra. María del Carmen Wachter Rodarte  
Fac. de Química, UNAM.



Sinodal: Dr. Carlos Regalado González  
Universidad Autónoma de Querétaro.



Sinodal: Dra. Araceli Tomasini Campocosio  
Biotecnología UAM-I.





EL PRINCIPIO DE LA SABIDURÍA ES EL TEMOR DE DIOS,  
Y EL CAMINO DE LA VIDA ES HACIA ARRIBA AL ENTENDIDO.

PROVERBIOS. 1:7; 15:24.

---

A mis padres

Obdulia I. Páez Solares

y  
Joaquín Alquicira Romero

---

---

# Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a cada una de las personas que hicieron posible este trabajo:

A Dios por la vida, la fortaleza y su amor que día con día me da.

A mis padres, hermana y sobrinos por su comprensión y apoyo incondicional para proseguir siempre a la meta.

Dra. Edith Ponce Alquicira, por la dirección en el trabajo experimental, por su paciencia en cada revisión de esta tesis y por ser una amiga más que una directora de tesis, caracterizada por su calidez humana que antepuso a todo.

Dr. Francisco José Fernández Perrino (Paco) por las sugerencias y amistad brincada.

Dra. Carmen Wachter Rodarte por su asesoría y sugerencias a este trabajo.

Dra. Carmen Fajardo por su ayuda y enseñanza en el uso de HPLC.

Dr. Sepúlveda y al Instituto de Fisiología Celular (UNAM) por su ayuda en las observaciones de la ultraestructura de la cepas de *Listeria monocytogenes*.

A mis compañeros y amigos del Laboratorios de Bioquímica de Macromoléculas.

A Efraín Ramírez Nava, por la motivación que me dio para subir ese escalón llamado Maestría.

---

---

## INDICE GENERAL

<b>Contenido</b>	<b>página</b>
Índice general .....	<i>i</i>
Índice de Tablas .....	<i>iv</i>
Índice de Figuras .....	<i>vi</i>
Resumen .....	<i>viii</i>
Abstract .....	<i>ix</i>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisión Bibliográfica .....</b>	<b>3</b>
2.1 Definición de bacteriocinas .....	3
2.2 Clasificación .....	3
2.3 Características de las bacteriocinas .....	6
2.3.1 Estabilidad .....	6
2.3.2 Espectro de inhibición .....	9
2.3.3 Modo de acción .....	9
2.3.4 Biosíntesis .....	11
2.3.5 Producción .....	12
2.3.6 Purificación .....	13
2.4 Métodos de detección de actividad de bacteriocinas .....	14
2.5 Incremento del espectro de inhibición .....	15
2.6 Bacteriocinas del género <i>Pediococcus</i> .....	16
2.7 Aplicaciones e importancia de las bacteriocinas .....	18
2.8 Inconvenientes del uso de las bacteriocinas a altas concentraciones .....	19
2.8.1 Mecanismos propuestos de resistencia de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	21
2.8.1.1 Ausencia de la subunidad Ellab del sistema de fosfotransferasas.....	21
2.8.1.2 Cambio en el metabolismo de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	23
2.8.1.3 Cambio en la composición de la membrana celular.....	25

---

---

<b>3. Antecedentes .....</b>	<b>26</b>
<b>4. Justificación .....</b>	<b>27</b>
<b>5. Hipótesis .....</b>	<b>28</b>
<b>6. Objetivos .....</b>	<b>29</b>
6.1 Objetivo general .....	29
6.2 Objetivos específicos .....	29
<b>7. Metodología .....</b>	<b>30</b>
7.1 Microorganismo productor de la bacteriocina.....	30
7.2 Cepas sensibles a la pediocina y condiciones de crecimiento .....	30
7.3 Producción y purificación de la pediocina .....	31
7.4 Determinación de la actividad de la pediocina .....	31
7.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) con varias concentraciones de pediocina.....	32
7.6 Obtención de cepas resistentes a la pediocina .....	34
7.7 Curvas de crecimiento de las cepas resistentes en presencia de pediocina.....	34
7.8 Curvas de crecimiento de las cepas testigo y cepas resistentes en medio suplementado con y sin glucosa .....	35
7.9 Detección de productos de fermentación para observar cambios en el metabolismo de carbohidratos entre las cepas testigos y las cepas resistentes a la pediocina .....	36
7.10 Extracción de lípidos totales de las cepas testigos y cepas resistentes a la pediocina .....	36
7.11 Metilación de los lípidos totales de las cepas de <i>Listeria</i> .....	37
7.12 Determinación de ácidos grasos totales en la pared celular de las cepas testigo y resistentes a la pediocina .....	37
7.13 Preparación de cepas testigo y resistentes para ser observadas al microscopio electrónico de transmisión .....	39

---

---

<b>8. Resultados y discusión .....</b>	<b>40</b>
8.1 Actividad de la bacteriocina producida por <i>Pediococcus parvulus</i> MXVK 133....	40
8.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) con varias concentraciones de pediocina.....	41
8.2.1 Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Listeria</i> con diferentes concentraciones de pediocina .....	41
8.2.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria .....	45
8.3 Obtención de cepas resistentes a la pediocina .....	46
8.4 Determinación del mecanismo de resistencia a la pediocina .....	49
8.4.1 Cambio en el metabolismo de las cepas resistentes de <i>Listeria</i> .....	49
8.4.2 Cambio en la composición de los ácidos grasos totales .....	62
8.4.3 Ultraestructura de las cepas de <i>Listeria</i> testigos y resistentes .....	65
8.5 Resumen de resultados .....	70
<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>71</b>
<b>10. Bibliografía .....</b>	<b>72</b>
<b>11. Anexos .....</b>	<b>77</b>
Anexo A. Compuestos, medios de cultivo y equipos empleados .....	77
Anexo B. Curvas de calibración de HPLC .....	79
Anexo C. Cromatogramas de los estándares de los ácidos grasos .....	85
Anexo D. Perfiles de lípidos totales de las cepas de <i>Listeria</i> .....	88
Anexo E. Análisis estadísticos .....	92

---

---

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
2.1. Clasificación de las bacteriocinas y microorganismos productores .....	4
2.2. Propiedades de algunas bacteriocinas de la clase I y II .....	8
7.1. Cepas de <i>Listeria</i> empleadas en cada una de las pruebas .....	30
7.2. Condiciones de estabilización de la rampa de temperaturas del cromatógrafo de gases .....	38
7.3. Condiciones de estabilización del horno del cromatógrafo de gases .....	38
7.4. Estándares de ácidos grasos .....	38
8.1. Parámetros estimados de las curvas de crecimiento .....	44
8.2. Valores de MIC estimados para cada cepa de <i>Listeria</i> .....	46
8.3. Parámetros estimados de las curvas de crecimiento de <i>Listeria</i> denominadas "Resistentes" a la bacteriocina .....	49
8.4. Parámetros estimados de las curvas de crecimiento de <i>Listeria innocua</i> ATCC33090.....	51
8.5. Parámetros estimados de las curvas de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> LBM 911204/47 .....	51
8.6. Productos de la fermentación de <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 .....	53
8.7. Productos de la fermentación de <i>Listeria monocytogenes</i> LBM 911204/47 .....	53
8.8. Parámetros estimados de las curvas de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A .....	57
8.9. Parámetros estimados de las curvas de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> LM82 .....	57
8.10. Parámetros estimados de las curvas de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> LMB 92000/48 .....	58
8.11. Productos de la fermentación de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A .....	58
8.12. Productos de la fermentación de <i>Listeria monocytogenes</i> LM82 .....	58
8.13. Productos de la fermentación de <i>Listeria monocytogenes</i> LMB 92000/48.....	59
8.14. Tiempos de retención de los estándares de ácidos grasos.....	63
A.1. Composición del medio CGB modificado para el cultivo de <i>Pediococcus parvulus</i> ..	77
A.2. Fuente de reactivos y medios de cultivo empleados.....	77
A.3. Modelo de cada equipo empleado .....	78

---

---

<b>B.1.</b> Áreas obtenidas para cada concentración de ácido láctico.....	79
<b>B.2.</b> Áreas obtenidas para cada concentración de ácido pirúvico.....	80
<b>B.3.</b> Áreas obtenidas para cada concentración de glucosa.....	81
<b>B.4.</b> Áreas obtenidas para cada concentración de ácido acético.....	82
<b>B.5.</b> Áreas obtenidas para cada concentración de ácido fórmico.....	83
<b>B.6.</b> Áreas obtenidas para cada concentración de etanol.....	84
<b>E.1.</b> Prueba de ANOVA para evaluar la DO y la concentración de pediocina.....	92

---

---

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
2.1. Modo de acción de las bacteriocinas .....	11
2.2. Representación esquemática de la pediocina PA-1 .....	17
2.3. Sistema de transporte de fosfotransferasas .....	22
8.1. Actividad de la pediocina obtenida de <i>Pediococcus parvulus</i> MXVK 133.....	40
8.2. Curvas de crecimiento de <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 y <i>Listeria monocytogenes</i> ..	42
8.3. Concentración mínima inhibitoria estimada para las cepas de <i>Listeria</i> . ..	46
8.4. Curva de crecimiento de <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 y <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A, LM82, LMB 911204/47 y LMB 92000/48 en medio BHI con 1600 UA/mL de cultivo.....	48
8.5. Curvas de crecimiento de <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 y cambios en el pH del medio .....	50
8.6. Curvas de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> LBM 911204/47 y cambios en el pH del medio .....	50
8.7. Biomasa de <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 y <i>Listeria monocytogenes</i> LMB 911204/47 en medio BHI sin glucosa y con glucosa.....	52
8.8. Curvas de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A y cambios en el pH del medio .....	55
8.9. Curvas de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> LM82 y cambios en el pH del medio .....	56
8.10. Curvas de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> LMB 92000/48 y cambios en el pH del medio .....	56
8.11. Biomasa de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A, LM82 y LMB 92000/48 en medio BHI sin glucosa y con glucosa .....	59
8.12. Perfil de lípidos totales de <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 testigo.....	64
8.13. Perfil de lípidos totales de <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 resistente .....	64
8.14. Micrografía de la cepa testigo de <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 .....	65
8.15. Micrografía de la cepa resistente de <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 .....	65
8.16. Micrografía de la cepa testigo de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A .....	66
8.17. Micrografía de la cepa resistente de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A .....	66
8.18. Micrografía de la cepa testigo de <i>Listeria monocytogenes</i> LM 82 .....	67

---

<b>8.19.</b> Micrografía de la cepa resistente de <i>Listeria monocytogenes</i> LM 82 .....	67
<b>8.20.</b> Micrografía de la cepa testigo de <i>Listeria monocytogenes</i> LMB 911204/47.....	68
<b>8.21.</b> Micrografía de la cepa resistente de <i>Listeria monocytogenes</i> LMB 911204/47.....	68
<b>8.22.</b> Micrografía de la cepa testigo de <i>Listeria monocytogenes</i> LMB 92000/48.....	69
<b>8.23.</b> Micrografía de la cepa resistente de <i>Listeria monocytogenes</i> LMB 92000/48. ....	69
<b>B.1.</b> Curva de calibración de ácido láctico.....	79
<b>B.2.</b> Curva de calibración de ácido pirúvico.....	80
<b>B.3.</b> Curva de calibración de glucosa.....	81
<b>B.4.</b> Curva de calibración de ácido acético.....	82
<b>B.5.</b> Curva de calibración de ácido fórmico.....	83
<b>B.6.</b> Curva de calibración de etanol.....	84
<b>C.1.</b> Cromatograma del ácido mirístico .....	85
<b>C.2.</b> Cromatograma del ácido palmítico .....	85
<b>C.3.</b> Cromatograma del ácido palmitoléico .....	86
<b>C.4.</b> Cromatograma del ácido oléico .....	86
<b>C.5.</b> Cromatograma del ácido linoléico .....	87
<b>C.6.</b> Cromatograma del ácido linolénico .....	87
<b>D.1.</b> Perfil de lípidos totales de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A testigo .....	88
<b>D.2.</b> Perfil de lípidos totales de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A resistente .....	88
<b>D.3.</b> Perfil de lípidos totales de <i>Listeria monocytogenes</i> LM 82 testigo .....	89
<b>D.4.</b> Perfil de lípidos totales de <i>Listeria monocytogenes</i> LM 82 resistente .....	89
<b>D.5.</b> Perfil de lípidos totales de <i>Listeria monocytogenes</i> LMB 911204/47 testigo .....	90
<b>D.6.</b> Perfil de lípidos totales de <i>Listeria monocytogenes</i> LMB 911204/47 resistente .....	90
<b>D.7.</b> Perfil de lípidos totales de <i>Listeria monocytogenes</i> LMB 92000/48 testigo .....	91
<b>D.8.</b> Perfil de lípidos totales de <i>Listeria monocytogenes</i> LMB 92000/48 resistente .....	91

---

---

## RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar el mecanismo por el cual las cepas de *Listeria* generan resistencia a la pediocina cuando ésta se adiciona en altas concentraciones. Los resultados mostraron que el uso de la bacteriocina en concentraciones de 133, 533 y 1,060 UA/mL de cultivo, solo prolongó la fase lag de las cepas de *Listeria* durante 9 h, pues después de ese tiempo, el comportamiento de las cepas fue similar al de las cepas testigos (cepas que crecieron en medio libre de bacteriocina). La adición de 1,600 UA/mL de cultivo, generó cepas de tipo resistente pues su crecimiento fue similar al de las cepas testigo. Esta resistencia se atribuyó un posible cambio en el tipo de fermentación, es decir, de fermentación láctica a fermentación ácido mixta, pues dicho cambio le confirió la generación de una molécula más de ATP la cual utilizó para formar más biomasa en comparación con las cepas testigo; asociado a la disminución de la velocidad específica de crecimiento así como a la velocidad de consumo de glucosa. También se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias para cada cepa, siendo de 1190, 1426, 6140, 1666 y 1724 para *Listeria innocua* ATCC33090, *Listeria monocytogenes* Scott A, LM82, LMB 911204/47 y LMB 92000/48 respectivamente. No se detectaron diferencias significativas en la composición de los ácidos grasos totales de la pared celular de las cepas de *Listeria* por medio de cromatografía de gases. En observaciones al microscopio electrónico, las cepas resistentes presentaron septas en la pared celular. De esta manera, el trabajo aporta un posible mecanismo que explique la resistencia de las cepas de *Listeria* al ser cultivadas en presencia de altas concentraciones de bacteriocina, así como la mínima cantidad permisible para que dicha resistencia no se genere, pues así, dentro del campo de una posible aplicación de esta bacteriocina ya se tiene un antecedente sobre que concentraciones son posibles de utilizar en un sistema alimentario sin la generación de resistencia.

Palabras clave: pediocina, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* y resistencia.

---

---

## ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the mechanism by which the *Listeria* strains generate resistance to pediocin when it is added in high concentrations. Results showed that the use of bacteriocin at concentrations of 133, 533 y 1,060 AU/mL of culture, only prolonged the lag phase in *Listeria* strains during 9 h, but after this period, the behavior of the strains was similar to that of wild strains (strains that grew in a medium without bacteriocin). Addition of 1,600 AU/ mL of culture, generated resistant strains, when they were grown under conditions similar to those of the wild strains. This resistance was attributed to a possible shift in fermentation pathway, from lactic fermentation to mixed acid fermentation. Such shift generates an additional molecule of ATP, used to form more biomass as compared with the wild strains; this behavior is associated with a decrease of the specific growth rate as in the case of glucose consumption. The calculated minimum inhibitory concentrations for each strain were the following: 1190, 1426, 6140, 1666 and 1724 for *Listeria innocua* ATCC33090, *Listeria monocytogenes* Scott A, LM82, LMB 911204/47 and LMB 92000/48, respectively. No significant differences were detected in the composition of total fatty acids of *Listeria* strains by gas chromatography. Furthermore, observations with an electronic microscope showed that resistant strains presented more cell wall septa than wild strains that could be associated to the observed higher growth rate. Thus, this study proposes a possible mechanism to explain the resistance of *Listeria* strains when grown in the presence of high concentrations of bacteriocins. Furthermore, the minimum doses required to prevent bacteriocin resistance were established, which could have a promising application in food industry.

Key words: pediocin, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* and resistance.

## 1. INTRODUCCION

Desde la era de Louis Pasteur y Robert Koch se ha estudiado tanto el desarrollo de microorganismos como el control de estos. El descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1929 abrió las puertas al uso de antibióticos en la comunidad médica y veterinaria para combatir enfermedades causadas por microorganismos. Sin embargo, el uso de antibióticos fue prohibido en los alimentos. La utilización de aditivos antagonistas como conservadores con propiedades antimicrobianas ha sido la manera más aceptada para prolongar la seguridad y calidad de alimentos, bebidas y de productos procesados (Chen y Hoover, 2003).

Dentro de la larga lista de conservadores comerciales aprobados para su uso en alimentos, se encuentra la bacteriocina nisina. Las bacteriocinas son polipéptidos capaces de inhibir el desarrollo de otras bacterias taxonómicamente próximas a aquéllas que las producen; en particular las bacteriocinas producidas por Bacterias Ácido Lácticas (BAL) son de mayor interés en la conservación de alimentos por sus propiedades antimicrobianas que difieren de los antibióticos en su origen proteico sintetizadas ribosomalmente, presentan alta especificidad inhibitoria contra cepas de la misma especie, son rápidamente digeridas por las proteasas en el tracto digestivo humano, inactivándose sin llegar a formar compuestos secundarios (Cardoso, 2003; Chen y Hoover, 2003).

Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo de uso específico contra cepas de bacterias alterantes y patógenas; sin embargo, su efectividad en alimentos puede llegar a ser limitada principalmente debido a su costo y uso de las bacteriocinas como aditivos en alimentos (Chen y Hoover, 2003).

La bacteriocina nisina ha sido empleada desde 1983 en la Unión Europea como conservador en alimentos con el nombre E234, pero fue hasta 1988 que la FDA (Food and Drug Agency) aprobó su uso en quesos pasteurizados, extendiendo una

aprobación legal en Estados Unidos de América (EUA) para la aplicación de bacteriocinas como aditivos en alimentos (Chen y Hoover, 2003; Cotter y col., 2005).

La nisina pertenece a la clasificación GRAS (generalmente considerados como seguros para su incorporación en alimentos para consumo humano) ya que es efectiva contra bacterias patógenas Gram positivas de importancia incluyendo *Listeria monocytogenes* (un patógeno bacteriano común en el medio ambiente de difícil control en alimentos). Este microorganismo se usa en EUA como parámetro de calidad, así como *Clostridium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus cereus*, etc. (Cañas y col., 2000; Cardoso y col., 2003).

Este trabajo fue estructurado en 11 capítulos; en el capítulo 1 se describe brevemente la importancia de las bacteriocinas y su uso en alimentos. En la revisión bibliográfica (Capítulo 2) se desarrollaron aspectos teóricos sobre las bacteriocinas, como son: su definición, clasificación, producción, purificación, espectro de inhibición y aplicaciones, entre otros. En el capítulo 3 se establecen los antecedentes a este trabajo experimental. En el capítulo 4 se plantea la justificación y en el capítulo 5 la hipótesis correspondiente. Los objetivos que se cubrieron en el presente trabajo se encuentran descritos en el capítulo 6, los cuales se desarrollaron siguiendo la metodología descrita en el capítulo 7. Los resultados y discusión, así como las conclusiones se establecen en el capítulo 8 y 9 respectivamente. Finalmente los capítulos 10 y 11 presentan la bibliografía empleada en esta tesis, así como los anexos.

El objetivo de esta tesis fue contribuir y aportar nuevos conocimientos referentes al uso de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133 y así determinar la cantidad permisible en alimentos sin efectos contraproducentes como la resistencia de bacterias contaminantes de alimentos, como *Listeria monocytogenes*.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DEFINICIÓN DE BACTERIOCINAS.

El término bacteriocina fue usado inicialmente por Jacob en 1953 para designar proteínas con actividad antibacteriana (Chen y Hoover, 2003).

Este término se redefinió posteriormente como “proteínas bactericidas caracterizadas por su actividad letal en un intervalo muy limitado y adsorción específica sobre células sensibles”. Esta definición ha sido modificada, incorporando sus propiedades y origen, es decir, polipéptidos pequeños producidos por bacterias Gram positivas, generalmente bacterias ácido lácticas (BAL) e inactivados por enzimas proteolíticas como la tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, pepsina, pronasa, proteinasa K, etc. Aunque la sensibilidad a dichas proteasas es variable, esta prueba refleja el origen proteico de las bacteriocinas. Estos polipéptidos son termoestables, activos contra otras bacterias y la cepa productora tiene un mecanismo específico de inmunidad (Bogovič-Matijašić y *col.*, 1998; Chen y Hoover, 2003; Cotter y *col.*, 2005).

El nombre asignado a cada bacteriocina deriva del género o especie de la bacteria productora, agregando “cina”. Por ejemplo, pediocina de *Pediococcus acidilacti* (Chen y Hoover, 2003).

### 2.2 CLASIFICACIÓN.

Muchas de las bacteriocinas de las BAL son moléculas catiónicas, hidrofóbicas o anfifílicas, compuestas de 20 a 60 aminoácidos. Estas bacteriocinas son clasificadas comúnmente en 3 grupos (Tabla 2.1) (Bogovič-Matijašić y *col.*, 1998; Parente y Ricciardi, 1999; Chen y Hoover, 2003; Cotter y *col.*, 2005).

**Tabla 2.1.** Clasificación de las bacteriocinas y microorganismos productores (Chen y Hoover, 2003; González Martínez y col., 2003).

Clase	Bacteriocina	Microorganismo productor	Breve descripción
Clase I Tipo A Lantibióticos	Nisina A y Z	<i>Lactococcus lactis subs. lactis</i>	Contienen algunos aminoácidos poco comunes como la lantionina, $\alpha$ - metil lantionina y deshidroalanina.
	Lactocina S	<i>Lactobacillus sakei L45, I48</i>	
	Epidermina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	Gallidermina	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	
	Lacticina 481	<i>Lactococcus lactis</i>	
Clase I Tipo B Lantibióticos	Mersacidina	<i>Bacillus subtilis</i>	
	Cinamycina	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	
	Ancovenina	<i>Streptomyces ssp.</i>	
	Duramycina	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	
	Actagardina	<i>Actinoplanes ssp.</i>	
Clase II a	Pediocina PA-1/AcH	<i>Pediococcus acidilacti</i>	< 10 kDa, estables al calor, no contienen lantionina
		<i>Lactobacillus plantarum WHE92</i>	
	Pediocina JD	<i>Pediococcus acidilacti JD1-23</i>	
	Sakacina A	<i>Lactobacillus sakei 706</i>	
	Sakacina P	<i>Lactobacillus sakei LTH673</i>	
	Leucocin A-UAL 187	<i>Leuconostoc gelidum</i>	
	Mesentericina Y 105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
	Enterocina A	<i>Enterococcus faecium</i>	
	Divercina V41	<i>Carnobacterium divergens</i>	
	Lactococcina MMFII	<i>Lactococcus lactis</i>	
Curvacina A	<i>Lactobacillus curvatus LTH1174</i>		
Clase II b	Lactococcina A	<i>Lactococcus cremoris</i>	Requieren dos diferentes péptidos para su actividad
	Lactococcina B	<i>Lactococcus cremoris 9B4</i>	
	Lactococcina G	<i>Lactococcus lactis</i>	
	Lactococcina M	<i>Lactococcus lactis</i>	
	Lactacina F	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	
	Plantaricina A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
	Plantaricina S	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
	Plantaricina EF	<i>Lactobacillus plantarum C11</i>	
	Plantaricina JK	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
Clase II c	Acidocina B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Péptidos estables, termoestables y se transportan por péptidos líder.
	Carnobacteriocina A	<i>Carnobacterium piscicola</i>	
	Divergicina A	<i>Carnobacterium divergens LV13</i>	
	Enterocina P	<i>Enterococcus faecium</i>	
	Enterocina B	<i>Enterococcus faecium</i>	
Clase III	Helveticina J	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Péptidos > 30 kDa, lábiles al calor.
	Helveticina V- 1829	<i>Lactobacillus helveticus</i>	

La clase I de bacteriocinas (lantibióticos) incluye a péptidos pequeños (< 5 kDa), activos a nivel de membrana, que contienen aminoácidos inusuales o poco comunes como lantionina (Lan),  $\alpha$ -metil lantionina (MeLan), deshidroalanina y deshidrobutirina, formados por modificaciones post-traduccionales (Montville y Chen, 1998). La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de azufre de la cisteína y formación de dobles enlaces de los deshidroaminoácidos (Chen y Hoover, 2003; González Martínez y col., 2003). Un ejemplo bien conocido de esta clase es la nisina, bacteriocina producida industrialmente por *Lactococcus lactis subsp. lactis* desde 1953 (Nisaplin, Dorset, England); es la única bacteriocina con licencia por la FDA (1988) para ser usada como conservador de alimentos en forma parcialmente purificada (Parente y Ricciardi, 1999; Cotter y col., 2005).

La clase I de las bacteriocinas está subdividida en los tipos A y B, de acuerdo a su estructura química y a su actividad antimicrobiana (Chen y Hoover, 2003; González Martínez y col., 2003; Cotter y col., 2005).

- El tipo A de los lantibióticos son péptidos con una carga neta positiva y que ejercen su actividad a través de la formación de poros en la membrana celular de la bacteria, propiciando la disipación del potencial de membrana y pérdida de pequeños metabolitos de las células sensibles.
- El tipo B de los lantibióticos son pequeños péptidos regulares y tienen una carga neta negativa; su actividad antimicrobiana está relacionada con la inhibición de enzimas específicas.

La clase II de las bacteriocinas, también llamadas no lantibióticos, son péptidos con un peso molecular menor a 10 kDa, son estables al calor y contienen aminoácidos regulares que no sufren modificaciones post-traduccionales. En este grupo se pueden identificar tres subclases, como se muestra a continuación (Parente y Ricciardi, 1999; Héchard y Sahl, 2002; Chen y Hoover, 2003; González Martínez y col., 2003; Cotter y col., 2005).

- Clase IIa: son péptidos activos contra *Listeria spp.*, tienen una secuencia consenso en la región N-terminal, -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys- y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P.
- Clase IIb: son formadores de poros en la membrana celular, consisten de dos péptidos diferentes, siendo los dos necesarios para la actividad antimicrobiana.
- Clase IIc: contiene el resto de los péptidos de la clase, son bacteriocinas termoestables, no modificadas y se transportan mediante péptidos líder.

La clase III denominadas bacteriolocinas, incluye péptidos cuyo peso molecular es mayor a 30 kDa y lábiles al calor (por lo que tienen menos interés para tecnologías alimentarias). Su mecanismo de acción es distinto en comparación con el resto de las bacteriocinas, dándose a través de catálisis e hidrólisis de la pared celular de las células sensibles. (Chen y Hoover, 2003; González Martínez y col., 2003; Cotter y col., 2005).

## **2.3 CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIOCINAS.**

### **2.3.1 ESTABILIDAD.**

La clase I y II de las bacteriocinas son usualmente estables al calor y a pH ácidos, aunque ambas propiedades están estrechamente relacionadas: un incremento de pH reduce la estabilidad al calor (ejemplos mostrados en la Tabla 2.2). Se ha observado que la pediocina PA-1 es estable después de 21 días de almacenamiento a 15°C en un intervalo de pH de 4 a 6, pero pierde la mitad de esta actividad a pH 7 (Chen y Hoover, 2003).

Hernández López (2002) caracterizó la estabilidad de la pediocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133 en diferentes condiciones de almacenamiento (congelación, refrigeración y temperatura ambiente a pH 6). La bacteriocina mantuvo el 100% de su actividad durante 15 semanas a -20°C, perdió su actividad hasta en

un 50% durante 27 semanas de almacenamiento a 4°C y finalmente a temperatura ambiente perdió totalmente su actividad en la primera semana de almacenamiento.

Schneider *y col.* (2006) caracterizaron la pediocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK133, reportando que la resistencia al calor de dicha bacteriocina depende del pH. La bacteriocina fue sometida a un tratamiento térmico a 121°C durante 15 min, mostrando una pérdida del 84% de su actividad a pH 6 (aunque a pH mayor a 7 se inactivó completamente). Sin embargo, a pH 4 mostró sólo una pérdida moderada de su actividad del 11%.

Larsen *y col.* (1993) encontraron que la bavaricina A es muy estable en un intervalo de pH de 2.0 a 9.7, pero almacenándola a pH 12.5 durante 4 horas pierde completamente su actividad; mientras que la piscicolina 126 al ser tratada térmicamente durante 120 minutos en un intervalo de pH de 2 a 3 mantiene la actividad bactericida; sin embargo, un calentamiento durante 15 minutos a pH 4-5 reduce su actividad en un 50%.

Dos importantes características de algunas de estas moléculas están relacionadas con su carga neta: la primera es que muchas de estas bacteriocinas tienen mayor actividad antibacteriana a un pH menor a 5.0, y la segunda es que su adsorción en la superficie celular de las bacterias sensibles es pH dependiente, con una máxima adsorción a pH de 6.0 o mayor, y con muy pequeña adsorción a un pH cercano a 2.0 (Chen y Hoover, 2003).

La termorresistencia generalizada de las bacteriocinas permite que éstas permanezcan activas después de tratamientos térmicos equivalentes a la pasteurización de la leche (63°C, 30 min) siendo ésta la principal ventaja de algunas bacteriocinas producidas por BAL. Dicha estabilidad térmica puede ser debida a la formación de estructuras globulares pequeñas y a la presencia de regiones fuertemente hidrofóbicas y formación de enlaces cruzados estables.

**Tabla 2.2.** Propiedades de algunas bacteriocinas de la clase I y II (Chen y Hoover, 2003).

Bacteriocina	PM * (Da)	Propiedades
<b>Clase I</b>		
Lactacina 3147 A	2847	Estable a 100°C durante 10 min. a pH 5 o 90°C durante 10 min a pH 7.
Lactacina 3147 B	3322	Sensible a la tripsina, $\alpha$ -quimotripsina, proteinasa K y pronasa E, resistente a la pepsina.
Nisina	3488	Estable a 121°C y calentamiento prolongado a pH 2, llega a ser menos estable a pH 5-7. Sensible a $\alpha$ -quimotripsina, resistente a tripsina, elastasa, carboxipeptidasa A, pepsina y erepsina.
Plantacina C	3500	Estable en almacenamiento a bajas temperaturas, estable a 100°C durante 60 min o 121°C durante 10 min. Muy estable a pH ácido y neutro. Sensible a pronasa, tripsina, $\alpha$ -quimotripsina, resistente a pepsina, proteinasa K, $\alpha$ -amilasa y lipasa.
<b>Clase II</b>		
Pediocina MXVK133	5000 <sup>a</sup>	Estable a 121°C durante 15 min. Estable a pH 6 y al almacenamiento a -20°C. <sup>a</sup>
Bavaricina A	3500 – 4000	Estable a 100°C durante 60 min. Estable a pH 2.0 a 9.7. Sensible a pepsina, tripsina, pronasa E, proteinasa K y quimotripsina A <sub>4</sub> , resistente a catalasa.
Lactococcina MMFII	4143	Estable a 70°C durante 30 min. Estable a pH 5-8. sensible a proteinasa K, tripsina y papaína, resistente a glucoamilasa, lipasa, $\alpha$ -amilasa y lisozima.
Pediocina PA-1	4624	Estable a pH 4-6, es menos estable cuando se incrementa el pH. Estable a 80°C durante 60 min. o 100°C durante 10 min. Sensible a tripsina, papaína, ficina, $\alpha$ -quimotripsina, proteasas IV, XIV y XXIV; y proteinasa K. Resistente a fosfolipasa C, catalasa, lisozima, ADNsa, ARNasa y lipasa.
Piscicolina 126	4416	Estable a pH 2 después de 2 meses de almacenamiento a 4°C, estable a 100°C durante 120 min a pH 2-3. Puede ser menos estable con un incremento de pH. Sensible a $\alpha$ -quimotripsina, $\beta$ quimotripsina, proteasas tipo I, XIV, XXIII y tripsina. Resistente a catalasa, lipasa y lisozima.

\* Peso molecular

<sup>a</sup> Fuente: Schneider y col. (2006).

### 2.3.2. ESPECTRO DE INHIBICIÓN.

Las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas se clasifican en 3 grupos, de acuerdo a su espectro de inhibición. El primero incluye a las bacteriocinas con un espectro inhibitorio estrecho, cuyos productos inhiben el crecimiento de bacterias pertenecientes al mismo género (diplococcina, lactocina 27, lacticina B o helveticina J por ejemplo); el segundo está compuesto por bacteriocinas con un espectro inhibitorio intermedio, que producen compuestos que inhiben además a otros géneros de BAL y otras bacterias Gram positivas, incluyendo patógenos presentes en alimentos (lactacina F, lacticina 481, plantacina C y plantacinas S y T); el tercero contiene las bacteriocinas con amplio espectro inhibitorio, que actúan contra un gran número de bacterias Gram positivas (nisina A y Z, pediocina AcH/PA1, leucocina S y enterocina L50) (Chen y Hoover, 2003; Cotter y col., 2005).

Muchas de las bacteriocinas de la clase I tienen un amplio espectro de inhibición; dichos compuestos no sólo inhiben a bacterias relacionadas, como *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, sino que también inhiben (aunque en menor grado) a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum*. Algunas bacteriocinas de esta clase, como la nisina y la termofilina 13, previenen también la germinación de esporas de *B. cereus* y *C. botulinum* (Chen y Hoover, 2003).

### 2.3.3 MODO DE ACCIÓN.

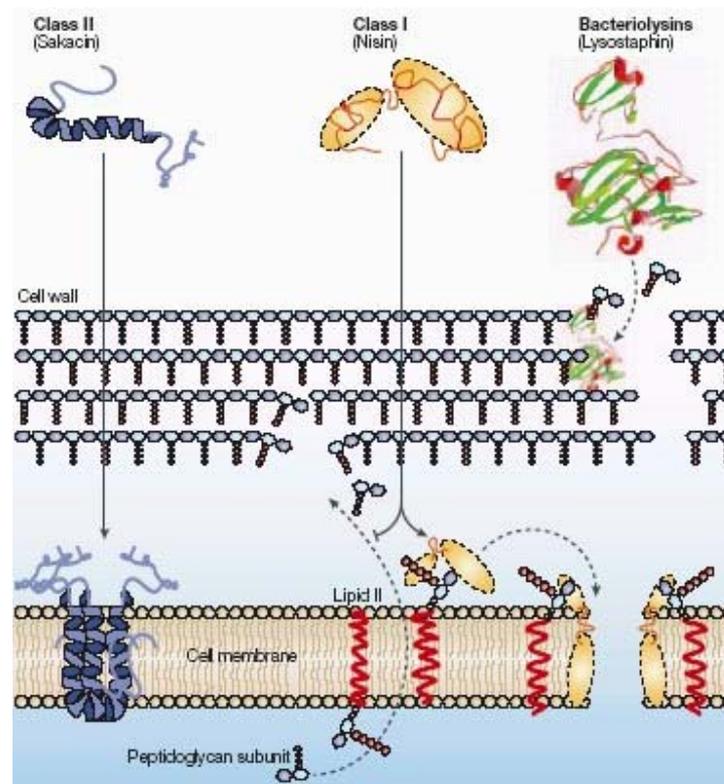
Una hipótesis para explicar el modo de acción de las bacteriocinas es un mecanismo en dos pasos, involucrando la adsorción de la bacteriocina a receptores específicos o no específicos (lípidos aniónicos, en este último caso, lípido II) en la superficie de la membrana celular. En general actúan destruyendo la integridad de esta membrana a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños como potasio, fosfato inorgánico y, en algunos casos, aminoácidos y moléculas pequeñas necesarios para la producción de energía y la síntesis de proteínas o

ácidos nucleicos, originando una pérdida del potencial electroquímico ( $\Delta\psi$ ) de las membranas, el consumo de las reservas energéticas y un descenso en la síntesis de ADN, ARN y proteínas, lo que finalmente origina la muerte celular (Chikindas *y col.*, 1993; Montville y Chen, 1998; Chen y Hoover, 2003; González Martínez *y col.*, 2003; Cotter *y col.*, 2005; Chatterjee *y col.*, 2005).

La clase I de bacteriocinas (lantibioticos) como la nisina, muestran un modo de acción dual. La nisina se une al lípido II, el principal transportador de subunidades de peptidoglucanos desde el citoplasma a la pared celular, afectando la síntesis de la pared celular, y como consecuencia la muerte celular, como se observa en la Figura 2.1 (Chen y Hoover, 2003; Cotter *y col.*, 2005; Chatterjee *y col.*, 2005).

Las bacteriocinas de la clase II (no-lantibioticos) deben su actividad bactericida principalmente a la desestabilización de las funciones de la membrana celular de las células sensibles, más que a la pérdida de la integridad de la membrana o la formación de poros (González Martínez *y col.*, 2003, Cotter *y col.*, 2005). Dada su naturaleza catiónica, las bacteriocinas interactúan con la carga negativa de la superficie celular, mientras que la región hidrofóbica del péptido induce la permeabilización de la membrana, además usan el lípido II como molécula de unión para iniciar el proceso de inserción de la membrana, figura 2.1 (Vadyvaloo *y col.*, 2004a; Cotter *y col.*, 2005; Chatterjee *y col.*, 2005).

Las bacteriocinas de la clase III (bacteriolincinas) actúan directamente en la pared celular de las células sensibles, promoviendo la lisis y muerte de dichas células, esto se representa en la figura 2.1 (Chatterjee *y col.*, 2005).



**Figura 2.1.** Modo de acción de las bacteriocinas.

Algunos estudios sugieren que las bacteriocinas penetran primeramente la parte N-terminal del péptido en la fase lipídica, mientras que la parte C-terminal es responsable de la unión de la bacteriocina con la membrana de la bacteria sensible. Así, el péptido no está en contacto con la fase hidrofóbica de la membrana (Montville y Chen, 1998).

#### **2.3.4 BIOSINTESIS.**

Debido a su naturaleza proteica, las bacteriocinas son sintetizadas mediante mecanismos ribosomales, involucrando 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 y *col.*, 2003).

Muchas bacteriocinas son sintetizadas biológicamente como un propéptido inactivo que porta un péptido guía N-terminal. La biosíntesis de las bacteriocinas parte, en general, de la formación del prepéptido, el cual es modificado hasta obtenerse un propéptido maduro. Este propéptido, al cruzar la membrana citoplasmática es llamado bacteriocina madura; dicha bacteriocina emite una señal a una enzima (histidin quinasa) cuya función es fosforilarse en presencia de la bacteriocina por medio del ATP; el grupo fosfato es subsecuentemente transferido a un regulador que activa la transcripción para producir proteínas que le confieren a la bacteria productora la propiedad de inmunidad frente a la bacteriocina producida (Merino y *col*, 2000; Chen y Hoover, 2003). Las proteínas de inmunidad de la clase II de bacteriocinas son usualmente pequeñas (51 – 150 aminoácidos) (Parente y Ricciardi, 1999).

### **2.3.5 PRODUCCIÓN.**

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, aereación, etc) son factores muy importantes que influyen en la producción de las bacteriocinas (Bogovič-Matijašić y *col.*, 1998; Parente y Ricciardi 1999; Aasen y *col.* 2000).

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 (Parente y Ricciardi, 1999).

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 (Parente y Ricciardi, 1999).

Parente y Ricciardi (1999) encontraron que la glucosa es mejor fuente de carbono que la sacarosa o la fructosa para la producción de nisina y pediocina AcH (4000 UI/mL), disminuyendo hasta 2 veces con estas fuentes de carbono la producción de la misma bacteriocina. La adición de fosfato de amonio y de potasio suprimieron la producción de nisina en un medio sintético. También observaron que algunos aniones como el fosfato y cationes como el magnesio y calcio afectan la producción de bacteriocinas aunque esto depende de la cepa.

Yin y col. (2004) reportaron las condiciones apropiadas para una producción eficiente de pediocina AcH, es el uso del medio TGE, durante 18 horas a 37°C, suplementado con una alta concentración de triptona (1.5%), glucosa (2%), extracto de levadura (1.5%) o con ácido pantoténico, niaciamida y biotina (0.5 µg/mL cada uno) y un pH final de 3.7.

### **2.3.6 PURIFICACION.**

La purificación de las bacteriocinas, especialmente de las producidas por BAL, es difícil. Entre los problemas encontrados durante la purificación destacan los relacionados con la tendencia que tiene dichas moléculas a asociarse con otras debido a su hidrofobicidad. Ya que las bacteriocinas pertenecen a un grupo extremadamente heterogéneo, los protocolos de purificación específicos necesitan generalmente ser diseñados para cada bacteriocina. Además, la estabilidad de los extractos de bacteriocinas decrece dramáticamente a medida que se incrementa su grado de purificación (Chen y Hoover, 2003).

Existen métodos rápidos para la purificación de las bacteriocinas, como la separación múltiple por cromatografía, incluyendo el intercambio catiónico, filtración por gel, precipitación por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , interacción hidrofóbica y cromatografía líquida en fase

reversa; pero el grado de purificación es bajo (Gao *y col.*, 1999; Guyonnet *y col.*, 2000; Yin *y col.*, 2004).

Yang *y col.* (1992) desarrollaron un procedimiento alternativo, basado en la propiedad de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas de ser frecuentemente adsorbidas sobre las células de las cepas productoras. Si se ajusta el pH del caldo de cultivo de una cepa productora, después de un tratamiento térmico para inactivar la función biológica de las células, a un valor al que ocurre la adsorción de la bacteriocina a la superficie celular (usualmente pH 6 a 6.5) se permite una fácil separación de las moléculas (adsorbidas en las células) del caldo de cultivo por simple centrifugación. Posteriormente, los péptidos son liberados selectivamente de las células a pHs bajos (1.5 – 2.0). Este método se presenta como una técnica que produce péptidos con alta potencia y en una forma más concentrada (Yin *y col.*, 2004).

## **2.4 METODOS DE DETECCIÓN DE ACTIVIDAD DE BACTERIOCINAS.**

Los métodos de detección de la actividad de las bacteriocinas se dividen en dos clases: métodos directos e indirectos. La mayoría están basados en la difusión de la bacteriocina a través de un medio de cultivo sólido o semisólido para inhibir el crecimiento de un microorganismo indicador sensible. En éste método, la cepa productora es puesta en una placa con agar y se incuba a 37°C durante 24 horas para desarrollar las colonias individuales; las colonias son entonces cubiertas con un microorganismo indicador sensible y de nuevo incubadas para desarrollar zonas de inhibición (Harris *y col.*, 1989; Chikindas *y col.*, 1993; Cabo *y col.*, 1999; Yin *y col.*, 2003; Chikindas *y col.*, 2004; Quintero *y col.*, 2005).

En el método directo, la bacteria a probar y el organismo sensible son incubados simultáneamente y la demostración del antagonismo depende de la liberación en el medio de un inhibidor rápidamente difundible durante la fase de crecimiento del organismo de prueba. En el método de difusión en agar los sobrenadantes del cultivo

de las cepas productoras de bacteriocinas son colocados en pozos cortados en un agar preinoculado con un microorganismo sensible. Este método es ampliamente usado como bioensayo para la determinación de la dosis de bacteriocinas. En algunos casos las condiciones óptimas de crecimiento de la cepa a probar no son necesariamente las mismas que las requeridas para una máxima producción de la bacteriocina (Pucci y col., 1988; Harris y col., 1989; Murray y Richard; 1997; Cabo y col., 1999; Yin y col., 2004).

## 2.5 INCREMENTO DEL ESPECTRO DE INHIBICIÓN.

Se ha observado que la combinación de las bacteriocinas con agentes químicos aumenta el espectro de inhibición contra bacterias sensibles. Entre los agentes químicos ampliamente usados a este respecto se encuentra el ácido etilen diaminotetraacético (EDTA), el citrato, el lactato, el sorbato de potasio, el diacetato de sodio, el ácido láctico y el ácido poliláctico, entre otros. Pero también se han logrado resultados similares realizando combinaciones de distintas bacteriocinas, con el uso de empaques con atmósferas modificadas (Padgett y col., 1998; Schillinger y col., 1998; Barbuddhe y col., 1999; Gänzle y col., 1999; Tu y Mustapha, 2002; Chen y Hoover, 2003; Chikindas y col., 2004)

Mustapha y col. (2002) determinaron que la nisina en combinación con ácido láctico y ácido poliláctico incrementaba la acción bactericida, inhibiendo a *Escherichia coli* 0157:H7. Asimismo, el uso de nisina con EDTA y citrato o lactato, además del uso de empaques con atmósferas modificadas (80% CO<sub>2</sub> + 20% aire) y bajas temperaturas, inhibía a bacterias como *Salmonella typhimurium*, *Brochothrix thermosphacta* y *Escherichia coli* 0157:H7 (Tu y Mustapha, 2002).

La combinación de pediocina AcH con nisina, lactacina 481 o lactacina F aumentó el espectro de inhibición contra *Listeria monocytogenes*. En cambio, el uso de pediocina AcH con un tratamiento de altas presiones (345 MPa) inhibía además de *Listeria monocytogenes* a *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* 0157:H7,

*Lactobacillus sake*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Serratia liquefaciens* y *Pseudomonas fluorescens* (Schillinger y col., 1998; Chen y Hoover, 2003).

## 2.6 BACTERIOCINAS DEL GÉNERO PEDIOCOCCUS.

El género *Pediococcus* pertenece al grupo de bacterias lácticas asociadas con la fermentación de carnes y vegetales, donde juega un papel importante en la producción de ácido y desarrollo de sabor. Además, tiene la ventaja de producir bacteriocinas efectivas contra muchas bacterias lácticas y numerosos patógenos Gram negativos (Pucci y col., 1988; Chikindas y col., 1993; Price y Schweigert, 1994; Faruk y Bibek, 1996).

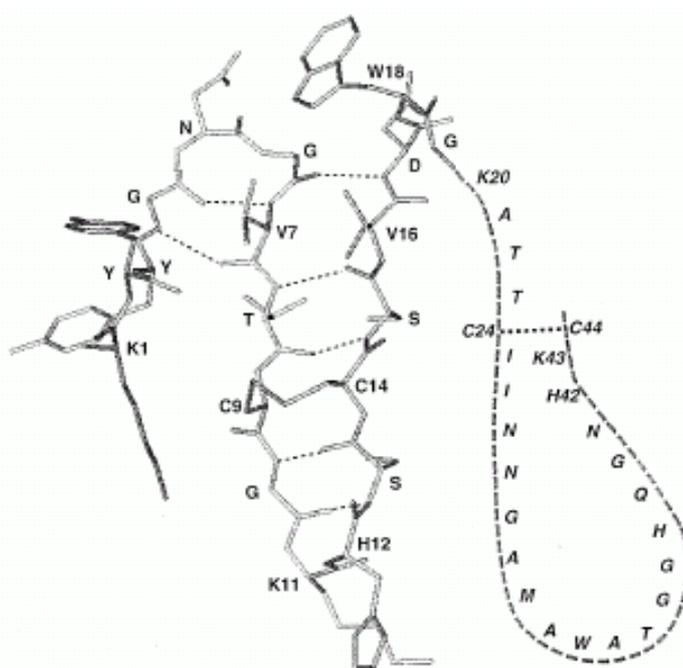
Son células esféricas, aparecen como tétradas y pares, pero nunca solas, o en cadenas. Son Gram positivas, no móviles, no esporuladas, anaerobias facultativas, con fermentación homoláctica, catalasa negativa y presentan un intervalo óptimo de crecimiento de 25 a 40°C. El crecimiento depende de la presencia de un carbohidrato fermentable, por ejemplo la glucosa sin formación de gas, y requiere factores de crecimiento y aminoácidos (Faruk y Bibek, 1996).

Las pediocinas producidas por este género se encuentran dentro del subgrupo IIa de la clasificación de las bacteriocinas, mostrando una fuerte actividad antilisteria y una gran similitud en su secuencia de aminoácidos con otras bacteriocinas de este grupo, la cual es más pronunciada en la parte N-terminal de los péptidos (Yin y col., 2003 y 2004).

En general, las pediocinas son péptidos de 44 aminoácidos, con una masa molecular de aproximadamente 4.62 kDa y cuyos genes estructurales se localizan en plásmidos. Su carga neta varía con el pH del medio, especialmente en el intervalo ácido, debido a la presencia de histidina en la molécula. Presentan cuatro residuos de cisteína, los cuales contienen el grupo tiol (-SH) en un ambiente reductor; pero en ambiente oxidante se forman 2 enlaces disulfuro (-S-S-) entre Cys<sup>9</sup>-Cys<sup>14</sup> y Cys<sup>24</sup>-Cys<sup>44</sup> (Figura 2.2). Este estado oxidado es esencial para la propiedad bactericida de

las pediocinas (Chikindas *et al.*, 1993; Montville y Chen, 1998; Yin *et al.*, 2003 y 2004).

La molécula es hidrofóbica debido a la presencia de una cantidad relativamente alta de aminoácidos no polares. Debido a su naturaleza hidrofóbica, las moléculas tienden a formar agregados, especialmente en estado concentrado y a pH próximo a 6 (Yin *et al.*, 2003 y 2004).



**Figura 2.2.** Representación esquemática de la pediocina PA-1 (Motville y Chen, 1998).

Se ha reportado que las condiciones de crecimiento influyen en la producción de bacteriocinas, es esencial la composición y el pH final del medio de cultivo. Se ha encontrado que un pH inicial de 6.5 a 6.8 estimula el crecimiento celular y que con un pH final de 3.6- 3.7 se tiene la mayor producción de bacteriocina. Este hecho se asocia al procesamiento postraduccional de las pro-pediocinas a pediocinas activas y ocurre eficientemente por debajo de un pH de 5 (Yin *et al.*, 2003 y 2004).

## 2.7 APLICACIONES E IMPORTANCIA DE LAS BACTERIOCINAS.

Actualmente hay una demanda creciente por el uso de aditivos naturales en los alimentos y por reducir el uso de conservadores químicos. Las bacteriocinas producidas por BAL pueden ser consideradas como conservadores naturales o bioconservadores (Chen y Hoover, 2003).

Como conservadores se entiende el uso de microorganismos antagonistas, o sus metabolitos, para inhibir o destruir a otros microorganismos indeseables en los alimentos, aumentando la seguridad de los mismos (Chen y Hoover, 2003).

Hay tres métodos que son comúnmente usados en la aplicación de bacteriocinas como conservadores (Chen y Hoover, 2003; Hernández Cruza, 2003).

1. inoculación de BAL en los alimentos para producir bacteriocinas en el producto. La capacidad de las BAL de crecer y producir bacteriocinas en el producto es crucial en este uso.
2. adición de la bacteriocina purificada o semipurificada como preservador en los alimentos.
3. uso de un producto previamente fermentado con la producción de la bacteriocina como un ingrediente en un alimento procesado.

La bacteriocinas son ampliamente usadas en la conservación de productos cárnicos, donde se inhiben principalmente bacterias Gram positivas como *Listeria monocytogenes* (un punto de referencia en el control de calidad, así como de la higiene que se tiene en los rastros y salas de despiece). Esta bacteria provoca listeriosis y es capaz de crecer en un intervalo de temperatura de 1 a 45°C y a altas concentraciones de sales (Crandall y Montville, 1998; Barbuddhe y col., 1999; Cañas y col., 2002; Chen y Hoover, 2003).

Se ha demostrado que el uso de las bacteriocinas que provienen de *Pediococcus acidilactici* (productor de pediocina AcH) controla el crecimiento de *Listeria*

*monocytogenes* en empaques al vacío de salchichas tipo Viena. El nitrito es comúnmente usado para estabilizar el color rojo de la carne e inhibe el desarrollo de microorganismos esporulados como *C botulinum*, sin embargo el nitrito puede reaccionar con compuestos aminados de la carne y producir nitrosaminas carcinogénicas. Esto repercute en la posibilidad del uso de las bacteriocinas como una alternativa al nitrito. Además, las bacteriocinas presentan estabilidad a temperaturas de cocción y son digeridas (por su naturaleza proteica) por las proteasas del tracto gastrointestinal (Chen y Hoover, 2003).

Las bacteriocinas son de amplio uso en productos lácteos, como leche pasteurizada, quesos para untar, helados, huevo, en alimentos de origen marino como el salmón y en cerveza (Chen y Hoover, 2003; Cardoso y col., 2003; Hernández y col., 2003; Cotter y col., 2005).

Por otra parte, el uso de bacterias lácticas como aditivos en los piensos para animales (y como consecuencia la producción de bacteriocinas), reduciría el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos, potenciando en los animales un desarrollo de una flora intestinal competitiva frente al desarrollo de muchos patógenos (Hernández Cruza, 2003).

## **2.8 INCONVENIENTES DEL USO DE LAS BACTERIOCINAS A ALTAS CONCENTRACIONES.**

Chikindas y col. (2004) observaron que la nisina adicionada en altas concentraciones favorecía la resistencia de *Listeria monocytogenes* a la acción de la bacteriocina, lo que les llevó a realizar un estudio en donde añadieron la bacteriocina de manera controlada en un caldo de cultivo (partiendo de una concentración inicial de 200 hasta 1000 UI/mL) de forma que simulara el efecto de liberación gradual de la nisina, en comparación con la adición directa de 1000 UI/mL del compuesto. Encontraron que la inhibición de *Listeria monocytogenes* no es lineal con respecto al aumento de la concentración de la bacteriocina; en cambio, dicha bacteriocina presentó mayor inhibición respecto al tiempo a bajas concentraciones. Por este motivo, los autores

suponen que *Listeria monocytogenes* desarrolla un mecanismo de defensa a altas concentraciones de la bacteriocina, aunque también se ha propuesto que la cepa produce una enzima (nisinasa) capaz de inactivar las bacteriocinas (Mazzotta y Montville, 1997).

Chikindas y col. (2004) observaron resultados similares a los reportados por Mazzotta y Montville (1997); el uso de la nisina en altas concentraciones generaba mutantes resistentes a la nisina, además de que estas cepas crecían sin problemas tanto en un medio con y sin nisina. En el caso de *Bacillus*, la resistencia a la nisina se ha asociado con la presencia de una enzima capaz de romper el anillo de lantionina presente en el extremo C- terminal, lo que repercute en la eficiencia de la bacteriocina.

La teoría más aceptada para explicar la resistencia a las bacteriocinas ha sido correlacionada con cambios o alteraciones tanto en la composición de ácidos grasos como en la composición de los fosfolípidos de la membrana plasmática de las bacterias sensibles (Mazzotta y Montville, 1997; Verheul y col., 1997; Crandall y Montville, 1998; Schillinger y col., 1998; Gänzle y col., 1999).

Mazzotta y Montville (1997) determinaron que el cambio estructural de la membrana está directamente ligado con el cultivo a bajas temperaturas, ya que a esta temperatura la membrana se torna rígida, evitando la formación de poros y consecuentemente la lisis celular. Esto se debe al aumento en el número de carbonos en la cadena lineal de los ácidos grasos, de C13 y C14 se pasa a C15. Se sabe que cepas de *Listeria monocytogenes* resistentes a las bacteriocinas de la clase IIa contienen de 1 a 3% de ácidos grasos de 16 y 18 carbonos, mientras que cepas silvestres contienen hasta un 12% de éstos ácidos grasos (Mastronicolis y col., 2005).

Carlson y col. (2001) evaluaron la capacidad de *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium* para desarrollar resistencia a la bacteriocina microcina. Dicha resistencia se ha asociado con los mecanismos de resistencia a los antibióticos. La múltiple resistencia a antibióticos (*mra*) se genera por un operón que es un

componente potencial de resistencia, y este operón regula la resistencia a una variedad de sustancias que afectan a *Salmonella*. El operón *mra* regula y facilita la expulsión de antibióticos y solventes orgánicos. Pero a su vez este operón es regulado por una proteína represora (*mraR*) que previene la transcripción de *mra*. Sin embargo, el mecanismo de acción no está claro, pues con el uso de otras microcinas la respuesta de resistencia es distinta (inhiben la ADN girasa, y por lo tanto la transcripción). Además de estos posibles mecanismos de resistencia, últimamente se ha propuesto también la alteración de enzimas específicas (Carlson y col., 2001).

En trabajos recientes Chikindas y colaboradores (2004) observaron que el uso en altas concentraciones de bacteriocinas de la clase IIa, como pediocina y leucocina, genera también resistencia en cepas de *Listeria monocytogenes*. Lo anterior es un punto considerable de decisión para que este tipo de compuestos sean aplicables en alimentos (Gravesen y col., 2002a).

Los mecanismos de resistencia en este caso no han sido del todo clarificados y hay contradicciones, pero se sugieren los siguientes:

### **2.8.1 MECANISMOS PROPUESTOS DE RESISTENCIA DE *Listeria monocytogenes*.**

- a. Ausencia de la subunidad Ellab del sistema de fosfotransferasas (PTS).
- b. Cambio en el metabolismo de *Listeria monocytogenes*.
- c. Cambio en la composición de la membrana celular.

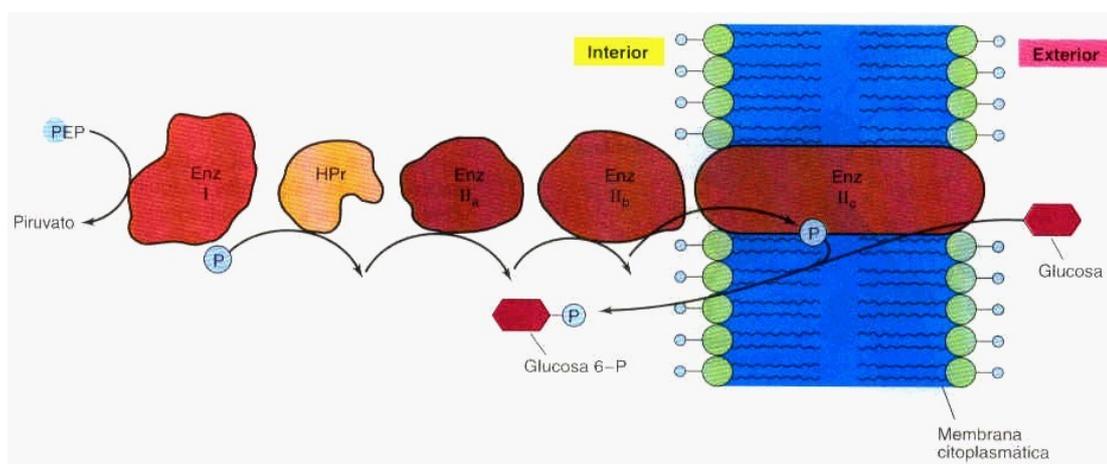
#### **2.8.1.1 AUSENCIA DE LA SUBUNIDAD Ellab DEL SISTEMA PTS.**

Investigaciones en torno al desarrollo de resistencia hacia la clase IIa de las bacteriocinas muestran fuertes evidencias de un mecanismo común para varias cepas de *Listeria* y *Enterococcus faecalis* (Gravesen y col., 2002b); este mecanismo involucra la ausencia de una subunidad específica Ellab de un sistema de

fosfotransferasa (PTS) dependiente de fosfoenolpiruvato (Gravesen y *col.*, 2002b; Vadyvaloo y *col.*, 2004); un sistema de transporte de carbohidratos.

Los compuestos más conocidos que utilizan este tipo de transporte son la glucosa, manosa, fructosa, N-acetil glucosamina y  $\beta$ -glucósidos, que son fosforilados durante el transporte a través de la membrana celular (Madigan y *col.*, 1998).

*Listeria monocytogenes* requiere de carbohidratos como primera fuente de energía para su crecimiento, siendo la glucosa su fuente de preferencia. Hay evidencia de que *L. monocytogenes* presenta dos sistemas de transporte de glucosa, uno de alta afinidad (sistema de fosfotransferasa) y uno de baja afinidad, llamado fuerza motriz de protones o quimiosmosis. Muchas bacterias ácido lácticas transportan y fosforilan la glucosa principalmente por la vía PTS, y algunos autores indican que el transporte puede ser similar para *Listeria monocytogenes* (Farber y Peterkin, 1991; Vadyvaloo y *col.*, 2004). El sistema de fosfotransferasa (PTS) está compuesto por 24 proteínas, siendo necesarias al menos 4 de ellas para el transporte de un determinado azúcar. Las proteínas que componen este sistema se fosforilan y desfosforilan alternativamente, hasta que una proteína transmembranal de transporte, denominada EIIc, recibe el grupo fosfato y fosforila y transporta el azúcar hacia el interior de la célula, como se muestra en la figura 2.3.



**Figura 2.3.** Sistema de transporte de fosfotransferasas (Madigan y *col.*, 1998).

El enlace fosfato de alta energía es cedido por un intermediario metabólico de la glucólisis, el fosfoenolpiruvato. Tanto la proteína denominada Hpr, la enzima que la fosforila (Enzima I) y la Enzima IIa son proteínas citoplasmáticas, mientras que las Enzimas IIb y IIc son proteínas de membrana. Hpr y la Enzima I son componentes no específicos del sistema de fosfotransferasas y participan en todas las reacciones de este tipo, mientras que las Enzimas del tipo II son específicas para cada tipo de azúcar (Postma y col., 1993; Madigan y col., 1998).

Hay que tener en cuenta que aunque se consume un enlace fosfato de alta energía (el equivalente a un ATP), en el proceso de transporte de glucosa mediante translocación de grupo la glucosa se fosforila. Como consecuencia de este tipo de transporte se produce así uno de los intermediarios metabólicos iniciales (glucosa – 6 fosfato), por lo que el transporte de glucosa puede considerarse un proceso neutro desde el punto de vista energético (Madigan y col., 1998).

#### **2.8.1.2. CAMBIO EN EL METABOLISMO DE *Listeria monocytogenes*.**

Vadyvaloo y colaboradores (2004) realizaron un estudio con cepas de *Listeria monocytogenes* que presentaron resistencia al uso de bacteriocinas de la clase IIa; las cepas fueron denominadas mutantes espontáneos y mutantes definidos genéticamente. Observaron que en presencia de glucosa las cepas resistentes tenían menor velocidad específica de crecimiento, mayor cantidad de biomasa, y un cambio en el metabolismo fermentativo de la glucosa, pasando de fermentación láctica a fermentación ácido mixta (una fermentación ácido mixta tiene un mayor rendimiento de ATP por glucosa, comparado con la fermentación láctica).

Uno de los mecanismos propuestos para explicar la resistencia a las bacteriocinas de la clase IIa de las cepas de *Listeria monocytogenes* es la ausencia de la subunidad Ellab o una sobreexpresión de esta subunidad del sistema de fosfotransferasa (Gravesen y col., 2002b); por ello se realizaron estudios para ver si la reducción en la velocidad de crecimiento específico de las cepas resistentes cuando crecían en

presencia de glucosa podría estar relacionada con una baja velocidad en el consumo de glucosa. Ellab no es la única enzima capaz de transportar la glucosa, sin embargo esto no excluye que el complejo Ellab tenga un control sobre la velocidad de crecimiento, por lo que su ausencia podría afectar la velocidad de consumo de glucosa y la velocidad de crecimiento específico. Para corroborar esto, Vadyvaloo y col. (2004b) realizaron un análisis sobre el consumo de glucosa en varios puntos de la fase lag de las cepas resistentes de *Listeria monocytogenes*, encontrando una reducción en la velocidad de consumo de glucosa en las cepas resistentes a las bacteriocinas en comparación con su respectiva cepa silvestre.

Esta disminución de la velocidad de crecimiento específico y la reducción del consumo de glucosa de las cepas resistentes han sido interpretados y asociados con un ahorro energético, sugiriendo que el sistema PTS pueda ser el principal transportador de glucosa para las cepas de *Listeria monocytogenes*. También se observó un incremento en la velocidad de crecimiento específico de las cepas resistentes en medio libre de glucosa comparado con su respectiva cepa testigo. Pudiera existir otro regulador en la ruta metabólica que dé a estas células una ventaja en ausencia de glucosa. Un ejemplo de este regulador podría ser el  $\beta$ -glucósido específico en las cepas resistentes de *Listeria monocytogenes* (Gravesen y col., 2002b). Sin embargo, la disminución de la velocidad específica de crecimiento de las cepas resistentes en presencia de glucosa, comparada con la velocidad en medio libre de glucosa, podría indicar que la regulación es reprimida en presencia de glucosa o que la glucosa tenga un efecto inhibitorio sobre la velocidad de crecimiento en las cepas resistentes. Los autores también observaron que las cepas resistentes tuvieron mayor rendimiento de biomasa, a pesar de tener menor velocidad de crecimiento en presencia de glucosa, debido a un cambio en el metabolismo fermentativo de la glucosa (de láctica a ácido mixta: en la fermentación láctica se forman 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa y en una fermentación ácido mixta se forman 3 moléculas de ATP por molécula de glucosa fermentada). Este cambio en el metabolismo podría reflejarse en un incremento de la biomasa final (Vadyvaloo y col., 2004b).

Garrigues y colaboradores (1997) realizaron estudios sobre el cambio de fermentación láctica a fermentación ácido mixta en cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118, cepa que lleva a cabo la fermentación láctica y que transforma más del 90% de los azúcares del medio en ácido láctico. Sin embargo, bajo ciertas condiciones este metabolismo láctico se pierde, aumentando la concentración de otros metabolitos como formiato, CO<sub>2</sub>, acetato y etanol, los cuales son productos de la llamada fermentación ácido mixta. El metabolismo láctico fue observado durante el crecimiento rápido, en el que cantidades significativas de glucosa quedaron en el medio; la fermentación ácido mixta fue observada con menores velocidades de crecimiento, con limitaciones en la fuente de carbono. Tal metabolismo mixto también fue encontrado bajo condiciones de exceso de carbono, con ciertos azúcares.

### **2.8.1.3. CAMBIO EN LA COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA CELULAR.**

Algunos autores apoyan la hipótesis de que la resistencia de *Listeria monocytogenes* a la acción de las bacteriocinas, se debe principalmente a un cambio en la composición de la membrana celular, comparando el contenido de los ácidos grasos de cepas testigo y cepas resistentes durante su crecimiento en presencia y ausencia de nisina, encontrando relativamente más fosfoglicerol y menos difosfatidilglicerol en cepas resistentes (Verheul y col., 1997; Crandall y Montville, 1998).

Garde y col. (2004) observaron un efecto parecido de resistencia a la nisina pero en la cepa *Streptococcus thermophilus* INIA 463 durante su crecimiento en la leche. La resistencia en esta cepa se reflejó en la rigidez de la membrana celular debido a la presencia de más ácidos grasos monoinsaturados y menos poliinsaturados, inhibiendo de esta manera la permeabilización de la membrana y la lisis celular.

### 3. ANTECEDENTES

En proyectos anteriores del laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas se caracterizó parcialmente la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133 (Hernández López, 2002), presentando actividad inhibitoria contra varias cepas de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Listeria*, además de poseer propiedades similares a la pediocina PA-1/AcH. Los valores óptimos de crecimiento y producción de bacteriocina fueron obtenidos utilizando el medio GBS a pH 6.8, a una temperatura de 40°C y con concentraciones de 0.5 a 0.6% de Tween 80, bajo condiciones microaerófilas.

Esta caracterización también se realizó por parte de Schneider y col. (2006), confirmando la termorresistencia del péptido producido por *Pediococcus parvulus* MXVK 133. Su actividad inhibitoria permanecía después de un tratamiento térmico a 121°C durante 15 minutos, pero esta termorresistencia varió de acuerdo al pH. El peso molecular aparente de esta bacteriocina fue de 5 kDa, con un punto isoeléctrico estimado de 8.65. La secuencia de los primeros 17 aminoácidos de la cadena N-terminal mostraron completa coincidencia con lo reportado para la pediocina A1 (AcH) y con un péptido antilisteria producido por *Bacillus coagulans*.

Del mismo modo en el laboratorio, se han realizado materiales de empaque en forma de películas adicionadas con pediocina, empleando como materiales estructurales el aislado de proteína del suero de la leche y la zeína de maíz, obteniéndose mejores resultados con estas últimas proteínas (Quintero y col., 2005). También se ha observado que el aumento de la concentración de la pediocina repercute directamente en el nivel de inhibición de las bacterias sensibles, tal como lo describieron Mazzotla y Montville (1997).

Debido a las propiedades favorables que presenta la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133 descritas anteriormente, este trabajo se justifica de la siguientes manera.

#### 4. JUSTIFICACION

Recientemente ha surgido un gran interés en emplear a las bacteriocinas como aditivos en los alimentos para prolongar la vida útil de los mismos. Debido al origen proteico de las bacteriocinas, éstas son susceptibles al ataque de enzimas proteolíticas (incluyendo aquellas de origen pancreático y gástrico), inactivándose durante su paso por el tracto intestinal, no siendo absorbidas como compuestos activos y sin causar riesgos relacionados con su uso (Cotter y *col.*, 2005).

Varios autores han observado que la acción de las bacteriocinas en conjunto con otros compuestos químicos aumentan el potencial de inhibición contra bacterias contaminantes en los alimentos (como de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella*, entre otros). Sin embargo la acción inhibitoria de las bacteriocinas no es directamente proporcional a la concentración empleada, habiéndose reportado una disminución en la capacidad inhibitoria sobre algunas bacterias sensibles cuando se emplean altas concentraciones de bacteriocina.

En el laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas se ha caracterizado la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133 como un agente antimicrobiano contra *Listeria*. Como parte de esta caracterización es necesario hacer estudios para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de esta bacteriocina y el posible desarrollo de resistencia, así como investigar si estas bacterias resistentes son mutantes o sólo presentan una tolerancia temporal a la acción de esta bacteriocina. Asimismo, debe profundizarse en el mecanismo por el cuál estas bacterias patógenas pueden desarrollar resistencia al uso de las bacteriocinas.

## 5. HIPÓTESIS

- ✓ Si las cepas de *Listeria* desarrollan resistencia por exposición a altas concentraciones de pediocina, mayores a la MIC, estas cepas podrían ser resistentes temporales o permanentes.
  
- ✓ La resistencia podría deberse a cambios en la composición de ácido grasos totales de la membrana celular o a un cambio en el metabolismo de carbohidratos.

---

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 OBJETIVO GENERAL

- ✓ Estudiar el mecanismo de resistencia de *Listeria monocytogenes* a la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133.

### 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Producir y obtener un extracto semipurificado de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133.
- ✓ Determinar la concentración mínima inhibitoria de pediocina sobre cepas de *Listeria innocua* ATCC33090 y *Listeria monocytogenes* (Scott A, LM82, LMB 911204/47 y LMB 92000/48).
- ✓ Determinar si las cepas desarrollan resistencia temporal o permanente por exposición a altas concentraciones de pediocina.
- ✓ Determinar si la resistencia se debe a cambios en la composición de ácido grasos totales o a un cambio en el metabolismo de carbohidratos.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Microorganismo productor de la bacteriocina.

*Pediococcus parvulus* MXVK 133 fue el microorganismo seleccionado para la producción de la bacteriocina. Este microorganismo produce una bacteriocina de la clase IIa (pediocin-like) y se sembró en medio CGB modificado, incubándose a 37°C. La composición de este medio se especifica en el anexo A (Tabla A.1).

### 7.2 Cepas sensibles a la pediocina y condiciones de crecimiento.

Se emplearon las cepas de *Listeria* indicadas en la Tabla 7.1 como microorganismos sensibles para evaluar el posible desarrollo de resistencia a altas concentraciones de bacteriocina.

Las cepas de *Listeria* se sembraron en medio BHI (infusión cerebro corazón) ajustado a pH 6.5 y se incubaron a 37°C. Estas cepas fueron manipuladas en condiciones asépticas y en campana de flujo laminar (previa limpieza con fenol al 5%). Para asegurar la destrucción de las cepas de *Listeria*, se esterilizó el material empleado a 121°C durante 15 min.

**Tabla 7.1.** Cepas de *Listeria* empleadas en cada una de las pruebas.

Microorganismo	Fuente
<i>Listeria innocua</i> ATCC33090	1
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	3
<i>Listeria monocytogenes</i> LM 82	2
<i>Listeria monocytogenes</i> LMB 92000/48	3
<i>Listeria monocytogenes</i> LMB 911204/47	3

(1) Laboratorio de Bioquímica de macromoléculas, UAM-I, México. (2) Dr. J. M. Urruburu, Universidad de Valencia, España. (3) Dr. F.M. Iniesta, Universidad de Murcia, España.

### 7.3 Producción y purificación de la pediocina.

Se siguió la metodología propuesta por Yang y *col.* (1992) para la producción de la pediocina (los equipos y reactivos empleados se encuentran detallados en el anexo A). Este es un método de adsorción – desorción dependiente del pH. La cepa de *Pediococcus parvulus* MXVK 133 que se encontraba a -80°C, se reactivó resembrándola en medio CGB e incubándola durante 18 h. Posteriormente se resembró (10% v/v de inóculo) en medio CGB y se incubó durante 10 a 12 h, tiempo que corresponde a la máxima producción de la bacteriocina, se ajustó el pH del medio de cultivo a 5.5 adicionando NaOH 10 M y se sometió a un tratamiento térmico a 70°C durante 30 min para la inactivación de proteasas (Katla y *col.*, 2003) y se mantuvo en agitación lenta a 4°C durante 2 a 3 h para facilitar la adsorción de la bacteriocina. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 6,000 rpm durante 20 min a 4°C. Las células recuperadas se lavaron con buffer de fosfatos 50 mM pH 6.5 (Katla y *col.*, 2003) y se resuspendieron en una solución de NaCl 100 mM pH 2.0 (ajustada con ácido fosfórico al 5%), manteniéndose en agitación lenta a 4°C durante 15 h para desorber la bacteriocina. Posteriormente se sometió a centrifugación a 6,000 rpm durante 15 min a 4°C para eliminar las células. El extracto libre de células se filtró a través de membranas estériles Millipore (Durapore® Membrane Filters, 0.22 µm GV, Irlanda) y se sometió a diálisis empleando membranas de celulosa con un tamaño de poro de 1000 Da (Diálisis Tubing, Benzoylated, Sigma – Aldrich Co. St Louis MO., EUA) con cambios periódicos de agua destilada hasta eliminar las sales presentes. Finalmente se liofilizó la bacteriocina manteniéndose a -80°C hasta su uso.

### 7.4 Determinación de la actividad de la pediocina.

La actividad de la pediocina se determinó mediante la técnica de difusión en pozos de agar (Guyonnet y *col.*, 2000). Se depositaron 30 µL de diluciones seriadas de pediocina diluida en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.0 en pozos hechos con una pipeta pasteur estéril en medio BHI 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  $\mu\text{L}$  de un cultivo de 18 h de la cepa sensible (*Listeria innocua* ATCC33090) con una absorbancia a 640 nm de 0.3. La actividad de la bacteriocina se evaluó determinando el halo de inhibición formado, una vez incubada la placa a 37°C durante 24 h para el desarrollo de la cepa sensible.

La actividad de la bacteriocina se reportó en Unidades Arbitrarias por gramo de bacteriocina liofilizada (UA/g), estando definida 1 UA como el inverso de la máxima dilución a la cual se obtiene un halo de inhibición de 2 mm (Chikindas y col., 2004).

### **7.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) con varias concentraciones de pediocina.**

Esta prueba se realizó con la finalidad de observar el efecto inhibitorio de la bacteriocina sobre el crecimiento de las cepas sensibles, al aumentar la concentración de la bacteriocina (Katla y col., 2003).

Para ello, se preparó el inóculo de cada cepa de *Listeria*, diluyendo un cultivo de 18 h hasta obtener una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0.002 ( $\sim 10^5$  UFC/mL). En 900  $\mu\text{L}$  de inóculo se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de pediocina en varias concentraciones (133 – 1600 UA/mL de cultivo) y se incubaron a 37°C con agitación constante de 150 rpm durante 12 - 15 h. Los cambios en la absorbancia se analizaron cada 3 h. El control sólo contenía medio de cultivo sin pediocina.

Estos experimentos se realizaron por duplicado, para obtener las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC), que se definen como la mínima concentración del compuesto antimicrobiano que se necesita para inhibir el crecimiento de un microorganismo después de 24 h de incubación (Madigan y col., 1998). La concentración mínima bactericida es la concentración mínima del compuesto antimicrobiano que elimina a más del 99.9% de los microorganismos viables después de 24 h. De esta forma, también se pueden definir índices parciales, como la  $\text{MIC}_{90}$  y  $\text{MIC}_{50}$ :

MIC<sub>90</sub> = concentración mínima inhibitoria que inhibe al 90% de microorganismos

MIC<sub>50</sub> = concentración mínima inhibitoria que inhibe al 50% de microorganismos

Los datos de las absorbancias fueron promediados y graficados respecto al tiempo de la prueba, además de realizarse un análisis estadístico (Análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple Tukey-Kramer) utilizando el programa NCSS (EUA).

Para obtener los valores de MIC, se siguió el modelo matemático propuesto por Olivera y *col.* (2001):

$$\mu = \mu_T - k \cdot C$$

donde:

$\mu$  = velocidad de crecimiento específico (min<sup>-1</sup>)

$\mu_T$  = velocidad de crecimiento específico en cultivo libre de bacteriocina (min<sup>-1</sup>)

$k$  = velocidad de inhibición específica (mL ·  $\mu\text{g}^{-1}$ , min<sup>-1</sup>)

$C$  = concentración de bacteriocina ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

Se graficaron las velocidades de crecimiento específico ( $\mu$ ) de cada una de las cepas de *Listeria* obtenidas con el programa MicroFit © v.1.0. (creado por el Dr. Meter D.G. Wilson, Institute of Food Research) respecto a las diferentes concentraciones de bacteriocina ( $C$ ) probadas (133, 533, 1060 y 1600 UA/mL de cultivo). La línea de tendencia de estos datos se extrapoló hasta  $\mu = 0$ , es decir, la concentración de bacteriocina en la que no se presentaría crecimiento, obteniéndose así los valores de MIC. Para el cálculo de la MIC<sub>50</sub> se despejó de la ecuación la concentración de la bacteriocina con la que se presentaría un 50% de inhibición en el crecimiento de *Listeria*, donde la velocidad de crecimiento específico quedara reducida a la mitad.

## 7.6 Obtención de cepas resistentes a la pediocina.

Cada una de las cepas sensibles de *Listeria* fueron inoculadas en medio BHI ajustado a pH 6.5 y se incubaron a 37°C hasta obtener un cultivo de 12 h. Posteriormente se diluyó cada cultivo en este mismo medio hasta obtener una DO<sub>600nm</sub> de 0.002 (~10<sup>5</sup> UFC/ mL). En 900 µL de inóculo previamente ajustado se adicionaron 100 µL de bacteriocina con una concentración de 1,600 UA/mL de cultivo (concentración en la cual se presentó un efecto de resistencia a la inhibición en el crecimiento de las cepas), se incubaron a 37°C con agitación de 150 rpm hasta la fase exponencial de la cepa (9 – 12 h) (Katla y col., 2003).

Usando el programa MicroFit © v.1.0. se obtuvieron valores estimados de la velocidad de crecimiento específico, tiempo de duración de la fase lag y el tiempo de duplicación, para cada una de las cepas de *Listeria*.

Para esta prueba se usó como parámetro de resistencia a la pediocina los valores obtenidos de velocidad específica de crecimiento y duración de la fase lag de las cepas de *Listeria* testigo y las cepas que crecieron en presencia de pediocina, el que no se presentara una diferencia significativa entre estos valores así como entre los valores de absorbancia de las cepas testigo, sin pediocina, y de las cepas que crecieron en presencia de la pediocina.

## 7.7 Curvas de crecimiento de las cepas resistentes en presencia de pediocina.

Esta prueba se realizó con la finalidad de observar si las cepas obtenidas en la sección 7.6 eran capaces de crecer nuevamente al ser resembradas en medio con pediocina (con la misma concentración con la cual fueron generadas); de ser así, estas cepas serían de carácter resistente, de lo contrario serían cepas que presentaron sólo una resistencia temporal (Chikindas y col., 2004).

Una vez que se obtuvieron las cepas resistentes de cada cepa de *Listeria* de acuerdo a la sección anterior, las cepas generadas se inocularon en medio fresco BHI con una  $DO_{600}$  de 0.002 conteniendo 1600 UA/mL de cultivo y se incubaron durante 21 h a 37°C, midiéndose los cambios en la absorbancia cada 3 h (Chikindas y col., 2004).

### **7.8 Curvas de crecimiento de las cepas testigo y cepas resistentes en medio suplementado con y sin glucosa.**

Esta prueba se realizó con la finalidad de observar y determinar los parámetros de crecimiento (velocidad de crecimiento específico y tiempos de fase lag y de duplicación) tanto de las cepas testigo como de las cepas resistentes (obtenidas de acuerdo a la metodología descrita en la sección 7.6) en un medio suplementado con glucosa, así como los cambios de pH que se registraron durante el cultivo.

Las cepas testigo y resistentes de *Listeria* fueron inoculadas en medio BHI suplementado con glucosa 10 mM y en BHI libre de glucosa, con una  $DO_{600nm}$  inicial de 0.002 ( $\sim 10^5$  UFC/ mL), a 37°C sin agitación. El crecimiento, a través del cambio en la absorbancia a 600 nm, fue evaluado cada 3 h, así como el cambio de pH del medio (Vadyvaloo y col., 2004b). Las velocidades de crecimiento específico, tiempo de la fase lag y tiempo de duplicación para cada cepa fueron obtenidos empleando el programa MicroFit © v 1.0.

Debe entenderse el crecimiento como un incremento en el número de células microbianas en una población, lo cual también puede ser medido como un incremento en la masa microbiana; la velocidad máxima de crecimiento específico es el cambio en el número de células o masa celular por unidad de tiempo y el tiempo de duplicación es el tiempo requerido para que a partir de una célula se formen dos.

### **7.9 Detección de productos de fermentación para observar cambios en el metabolismo de carbohidratos entre las cepas testigo y las cepas resistentes a la pediocina.**

Las cepas de *Listeria* testigo y resistentes (obtenidas según la sección 7.6) fueron resembradas en medio BHI suplementado con glucosa 10 mM hasta alcanzar la fase media exponencial (9 -12 h), e incubadas a 37 °C sin agitación (Vadyvaloo y col., 2004b). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm durante 2 min y el sobrenadante fue microfiltrado (Acrodisc®, 0.45 µm, 3 mm HPLC) antes de ser analizado en un cromatógrafo HPLC a 70°C y 1074 Psi, con una columna Alltech 10A-1000 Organic Acids de 300 mm x 7.8 mm SN acoplada a un detector Waters 410 Differential Refractometer Millipore MX3NM5768M, un controlador Waters™ 600 model code 6DC y una bomba 600PF6162. Se usó una fase móvil de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.005 N (0.145 mL de ácido sulfúrico concentrado por litro de agua desionizada), el cual fue filtrado antes de ser usado (Nylon Membrane Filter 0.45 µm, 47 mm, Pall Corporation, Michigan, EUA).

Los resultados se interpolaron en una curva de calibración (Anexo B).

### **7.10 Extracción de lípidos totales de las cepas testigos y cepas resistentes a la pediocina.**

Las cepas de *Listeria* resistentes obtenidas de acuerdo a la sección 7.6 y las cepas testigo fueron resembradas cada una en 1 litro de medio BHI a pH 6.5 e incubadas a 37°C hasta alcanzar la fase exponencial. Los cultivos fueron sonicados durante 2 h para asegurar que las células de *Listeria* fueran lisadas. Posteriormente los medios de cultivo fueron centrifugados a 7,000 rpm durante 15 min a 4°C, seguido de un lavado con buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.0. (Cabrera y col., 2000; Mastronicolis y col., 2005). Una vez recolectadas las células de cada cepa se adicionaron 3.75 mL de cloroformo – metanol 2:1 (v/v) y se agitó en vortex durante 5 min. Esta suspensión se mantuvo en refrigeración durante 18 h. Para separar la biomasa de la suspensión,

se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, y al sobrenadante se le adicionaron 4.75 mL de cloroformo – metanol – agua 2:1:0.8 (v/v/v). Para obtener un sistema bifásico se adicionaron 2.5 mL de agua y 2.5 mL de cloroformo. La fase del cloroformo, en la que se encontraban disueltos los lípidos totales, fue recolectada con pipeta Pasteur. Para concentrar estos lípidos se evaporó el exceso de cloroformo con un rotaevaporador y los lípidos fueron suspendidos nuevamente en cloroformo – hexano 1:1 (v/v) y finalmente almacenados a -20°C hasta su análisis.

### **7.11 Metilación de los lípidos totales de las cepas de *Listeria*.**

Se adicionaron 0.5 mL de los lípidos totales de las cepas de *Listeria* obtenidos según la sección 7.9 a un matraz de bola de 25 mL con perlas de ebullición. El matraz se conectó a un sistema de reflujo y, a través del refrigerante, se adicionaron 6 mL de NaOH 0.5 N disuelto en metanol, sometiéndose a ebullición durante 10 min. Posteriormente se adicionaron, nuevamente a través del refrigerante, 7 mL de trifluoruro de boro disuelto en metanol al 14% y se dejó ebullición durante 5 min, adicionándose después 1.5 mL de hexano y dejándose ebullición 1 minuto. Se retiró el matraz del sistema de reflujo y se dejó enfriar en un baño de hielo; a continuación se agregó una solución de NaCl 5 M y se llevó la fase orgánica hasta el cuello del matraz para ser recolectada con una pipeta Pasteur, se almacenó en refrigeración hasta su análisis en un cromatógrafo de gases (Gas Chromatograph Varian VA Chrompack CP – 3800) (Hernández Hernández, 2004).

### **7.12 Determinación de ácidos grasos totales de las cepas testigo y resistentes a la pediocina.**

Una vez metilados los extractos de los lípidos totales de las cepas de *Listeria* tanto testigo como resistentes, de acuerdo a la metodología establecida en la sección 7.11, se determinaron los ácidos grasos inyectando 0.20 µL de los lípidos totales (jeringa de 10 µL, Hamilton Co. Syringe, Nevada, EUA) en un cromatógrafo de gases (Gas

Chromatograph Varian VA Chrompack CP – 3800) empleando una columna Chrompack capillary column Varian CP8713 CP WAX 52 CB 30M x 0.25 D.O. 25 No serie VAR 010; con las condiciones especificadas en las Tablas 7.2 y 7.3 (Mastronicolis y col., 2005).

**Tabla 7.2.** Condiciones de estabilización de la rampa de temperaturas del cromatógrafo de gases.

Etapa	Temp (°C)	Veloc (°C/min)	Dur (min)	Total (min)
Inicial	90	--	1.0	1.0
1	170	70.0	1.5	3.64
2	210	5.0	8.0	19.64
3	210	0.1	2.0	21.64

**Tabla 7.3.** Condiciones de estabilización del horno del cromatógrafo de gases.

Componente	Consigna
Horno 1079°C	250
Flujo de la columna (mL/min)	1.8
Presión de la columna (psi)	4.7
Horno columna (°C)	90
Horno FID (°C)	250

Además se inyectaron en el cromatógrafo de gases los estándares establecidos en la Tabla 7.4, en las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

**Tabla 7.4.** Estándares de ácidos grasos.

Ácido graso	No. De carbonos
Ac. Mirístico <sup>a</sup>	Tetradecanoic acid 14:0
Ac. Palmítico <sup>a</sup>	Cis – 9 – hexadecanoic acid 16:0
Ac. Palmitoléico <sup>a</sup>	Cis – 9 – hexadecanoic acid 16:1
Ac. Oleico <sup>a</sup>	Cis – 9 – octadecanoic acid 18:1
Ac. Linoléico <sup>a</sup>	Cis - 9 – octadecadienoic acid 18:2
Ac. Linolénico <sup>a</sup>	9, 12 , 15 – octadecatrienoic acid 18:3

<sup>a</sup> Sigma – Aldrich Co. Capillary CG grado 99 – 100%, St. Louis MO., EUA

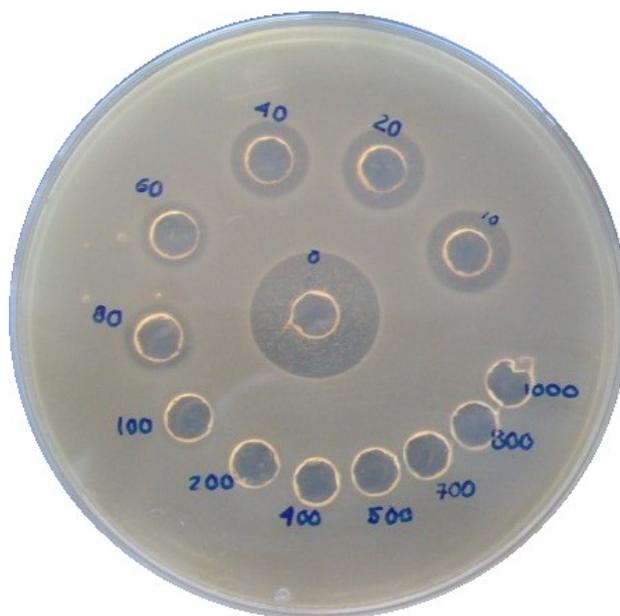
### **7.13 Preparación de cepas testigo y resistentes para ser observadas al microscopio electrónico de transmisión.**

Las cepas de *Listeria* testigo y resistentes (obtenidas según la sección 7.6) fueron resembradas en medio BHI e incubadas a 37°C hasta obtener una absorbancia a 600 nm de 0.7, equivalente a la fase de crecimiento exponencial; los medios de cultivo fueron centrifugados a 3,000 rpm durante 3 min y se hicieron lavados consecutivos para eliminar el exceso de medio de cultivo con buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.0; recolectándose la biomasa en tubos Eppendorf estériles (Mastronicolis y col., 2005). Se agregó glutaraldehído al 0.5% y se mantuvo en refrigeración durante 24 h. Posteriormente se lavó la biomasa con el buffer mencionado anteriormente hasta que desapareciera el olor a glutaraldehído (frutal). Se agregó tetraóxido de osmio a cada tubo Eppendorf y se mantuvo en refrigeración durante 2 h. Después de este tratamiento se deshidrataron las células con cambios cada 15 min (2 veces cada uno) de acetona en diferentes concentraciones, partiendo desde 30% hasta acetona absoluta (100%). Una vez deshidratadas las células, se les adicionó resina y se dejaron 48 h a 60°C para que se polimerizaran. Estas células fueron cortadas (Micrótomo Leica ultracut. UCT, EUA) para poder ser observadas en el microscopio electrónico de transmisión (JEM- 1200 EX II, EUA); previo a la observación se tiñieron con 2% de acetato de uranio y citrato de plomo (Clinton, 1971).

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Actividad de la bacteriocina obtenida de *Pediococcus parvulus* MXVK 133.

De acuerdo a la metodología propuesta por Yang y *col.* (1992), descrita en la sección 7.3, se obtuvo la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133. Posteriormente se evaluó la actividad de dicha bacteriocina por la técnica de difusión en pozos de agar (Guyonnet y *col.*, 2000) dando una actividad de  $1.33 \times 10^6$  UA/g de bacteriocina. El halo de inhibición de crecimiento de *Listeria innocua* ATCC33090 se presentó hasta la dilución 1 en 200 de 5 mg de bacteriocina disuelta en 1 mL de buffer de fosfatos 0.1 M pH 7, los halos de inhibición se muestran en la figura 8.1.



**Figura 8.1** Actividad de la bacteriocina obtenida de *Pediococcus parvulus* MXVK 133.

## **8.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) con varias concentraciones de pediocina.**

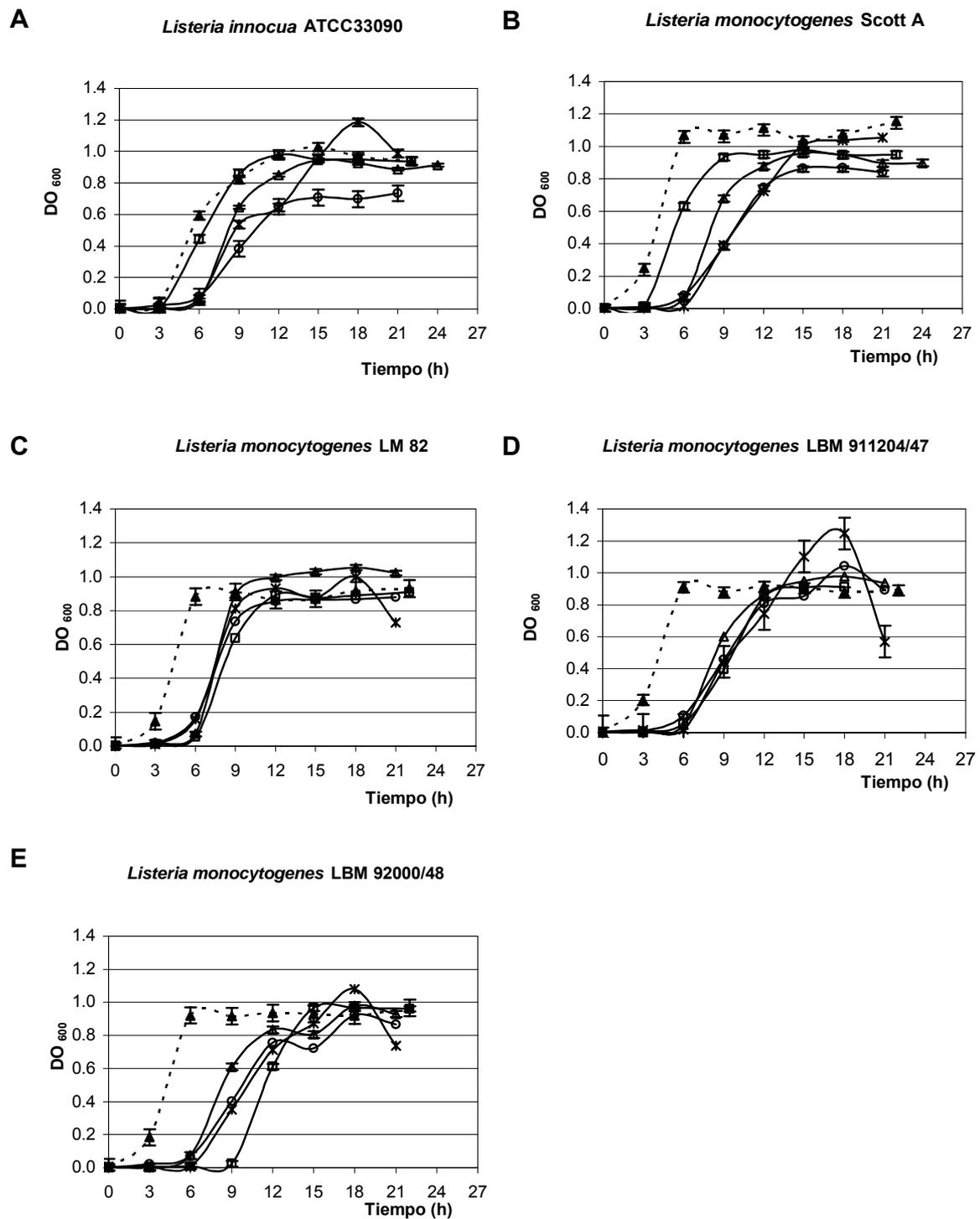
Una vez que se obtuvo la bacteriocina y su actividad, se procedió a determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) de acuerdo a la metodología establecida en la sección 7.5, realizando en primer lugar curvas de crecimiento con las cepas testigo de *Listeria*.

### **8.2.1 Curvas de crecimiento de las cepas de *Listeria* con diferentes concentraciones de pediocina.**

En la figura 8.2 se reportan las curvas de crecimiento de las diferentes cepas de *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes* con concentraciones de 133, 533, 1060 y 1600 UA/mL de cultivo.

Para todas las cepas y para todas las concentraciones de bacteriocina se observó inhibición por incremento en el crecimiento durante la fase lag, la cual fue variable, en comparación con la cepas testigo (cultivos libres de bacteriocina), en donde dicha fase no fue tan notoria.

Se pudo observar en las curvas de crecimiento que las absorbancias posteriores a las 12 h (al menos para 133 y 533 UA/mL de cultivo), presentaron un valor más alto para la cepa testigo (cepas de cada *Listeria* que crecieron en medio libre de bacteriocina), lo cual podría indicar un problema de difusión de la bacteriocina en el medio de cultivo (gráficas no mostradas). Por ello se decidió incorporar un sistema de agitación (150 rpm), manteniendo las mismas condiciones de temperatura y pH (37°C y 6.5, respectivamente) como se muestra en la figura 8.2. Incorporándose dicho sistema, se eliminó el efecto de mala difusión de la bacteriocina en el medio de cultivo (Vadyvaloo y col., 2004).



**Figura 8.2.** Curvas de crecimiento de *Listeria innocua* ATCC33090 (A) y *Listeria monocytogenes* (B, C, D y E), en presencia de varias concentraciones de bacteriocina (- $\Delta$ -133, -\*- 533, -o- 1,060, - $\square$ - 1,600 UA/mL de cultivo y -- $\blacktriangle$ --testigo sin bacteriocina).

Los resultados mostraron que los cultivos de *Listeria innocua* ATCC33090 (Fig. 8.2 A) en presencia de 133, 533 y 1,060 UA/mL de cultivo presentaron inhibición bacteriostática en su crecimiento durante 6 - 7 h, en promedio, desde el inicio del cultivo (datos mostrados en la tabla 8.1). Transcurrido este tiempo, sin embargo, su crecimiento tuvo la misma tendencia que el de la cepa testigo, excepto para el cultivo con 1,060 UA/mL de cultivo, en el que los valores de DO fueron menores que los de la cepa testigo (que presentó una velocidad máxima de crecimiento específico ( $\mu_{max}$ ) de  $0.70 \text{ h}^{-1}$  y una fase lag de 4.66 h). En presencia de 133 UA/ mL de cultivo se obtuvo un  $\mu$  de  $0.65 \text{ h}^{-1}$  y una fase lag de 7.42 h, la bacteriocina inhibió el crecimiento durante 2.76 h más que el tiempo de fase lag que presentó la cepa testigo. Tras este tiempo la cepa siguió el mismo comportamiento que la cepa testigo. Con 533 UA/mg se retardó la fase lag 2.22 h respecto a la cepa testigo. Finalmente, con 1,060 UA/ mL de cultivo se presentó una fase lag de 7.94 h, retardándose la fase lag 3.28 h más.

En presencia de 1,600 UA/ mL de cultivo se presentó una fase lag de 5.01 h, aunque posteriormente su comportamiento fue similar al de la cepa testigo. No se presentó diferencia significativa ( $p < 0.001$ ,  $\alpha 0.05$ ) entre las DO reportadas para ambos casos.

Estos datos coinciden con los reportados por Chikindas y col. (2004), que observaron la aparición de resistencia en *Listeria monocytogenes* al cultivarse en presencia de 1,000 UA/ml de nisina. En nuestro caso, sin embargo, se usó la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133, a diferencia de la nisina producida por *Lactococcus lactis*. Del mismo modo, Gravesen y col (2002b) encontraron que el uso de leucocina A en más de 4 mg/mL promovía la generación espontánea de mutantes resistentes a esta bacteriocina.

**Tabla 8.1.** Parámetros estimados\* de las curvas de crecimiento.

Cepa	Parámetro	Control	Concentraciones de pediocina (UA/mL de cultivo)			
			133	533	1,060	1,600
<i>L. innocua</i> ATCC33090	$\mu_{\max}$	0.70	0.65	0.38	0.59	0.79
	t-lag	4.66	7.42	6.88	7.94	5.01
	t-d	0.99	1.06	1.83	1.17	0.88
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	$\mu_{\max}$	0.69	0.68	0.45	0.69	0.79
	t-lag	3.02	7.50	8.51	7.91	4.96
	t-d	0.10	1.01	1.54	1.00	0.39
<i>L. monocytogenes</i> LM 82	$\mu_{\max}$	0.58	0.67	0.50	0.49	0.43
	t-lag	5.10	7.10	7.40	8.40	8.55
	t-d	0.15	0.80	0.85	0.70	0.16
<i>L. monocytogenes</i> LBM 92000/48	$\mu_{\max}$	0.70	0.66	0.38	0.25	0.48
	t-lag	5.10	7.50	7.06	7.00	10.50
	t-d	0.99	1.05	1.81	2.75	1.45
<i>L. monocytogenes</i> LBM 911204/47	$\mu_{\max}$	0.60	0.70	0.45	0.26	0.44
	t-lag	4.80	7.42	7.60	6.44	7.49
	t-d	0.87	0.99	1.55	2.65	1.56

$\mu_{\max}$  = Velocidad máxima de crecimiento específico ( $h^{-1}$ ), t-lag = tiempo de la fase lag (h), t-d = tiempo de duplicación(h)  
\* Datos obtenidos del programa MicroFit© v.1.0

En la cepa *Listeria monocytogenes* Scott A (Fig 8.2 B), se presentó un comportamiento similar al de *Listeria innocua* ATCC33090: los cultivos con las diferentes concentraciones de bacteriocina se inhibieron durante la fase lag durante 7 a 8 h, excepto para la concentración más alta de bacteriocina (1,600 UA/mL de cultivo), obteniéndose en este caso una fase lag de 4.96 h. Al ser comparado este dato con la fase lag de la cepa testigo (3.02 h) no existe diferencia significativa como con las otras 3 concentraciones restantes. Además, su comportamiento después de la fase lag fue similar al de la cepa testigo.

El comportamiento que presentaron las cepas de *Listeria monocytogenes* LBM 911204/47 y LBM 92000/48 (fig 8.2 D y E) fue que en primera instancia la inhibición del crecimiento se reflejó en una mayor duración de la fase lag, durante 7.50 h de cultivo en promedio para cada cepa, pero con 1,600 UA/mL de cultivo en la cepa LBM 92000/48 hubo una inhibición del crecimiento de 10.50 h de cultivo, siguiendo el mismo comportamiento que la cepa testigo después de ese tiempo.

Para *Listeria monocytogenes* LM 82 (fig 8.2 C), su comportamiento fue distinto al de las cepas mencionadas anteriormente, puesto que para todas las concentraciones de bacteriocina probadas se inhibió el crecimiento durante 7 a 8 h, aunque posteriormente todos los cultivos siguieron el mismo patrón de crecimiento, sin diferencia significativa ( $p < 0.001$ ,  $\alpha 0.05$ ) entre ellos (Fig 8.2 C). Los datos de la velocidad máxima de crecimiento, tiempo lag y tiempo de duplicación se especifican en la tabla 8.1. Cabe señalar que en estudios anteriores de resistencia a la estreptomicina (Marín y col., 1999) se probaron concentraciones desde 0.2 a 1 g/L tanto en medios de cultivo líquidos como sólidos de las cepas de *Listeria monocytogenes* LM 82, Scott A, LBM 92000/48 y LBM 911204/47, resultando que sólo la cepa LM 82 presentó resistencia a la estreptomicina, ésta inhibe la iniciación de la síntesis de proteínas por interacción con el ribosoma. Normalmente, cuando se presenta resistencia a la estreptomicina también se da a las bacteriocinas, como ocurre en los casos de las bacteriocinas obtenidas de cepas de *Lactobacillus bruchneri* y *Lactobacillus paracasei*. Con estos antecedentes y según el comportamiento de la cepa *Listeria monocytogenes* LM82 se sugirió que se trata de una cepa resistente a la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133, ya que solo se afecta su crecimiento durante 6 h del cultivo y posteriormente a este tiempo el cultivo sigue el mismo comportamiento de crecimiento que el testigo en ausencia de bacteriocina.

### 8.2.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria.

Los valores de la concentración mínima inhibitoria (MIC) obtenidas para cada cepa de *Listeria* se detallan en la tabla 8.2 y en la figura 8.3.

De acuerdo a los resultados mostrados anteriormente, se observó que para eliminar al 100% de microorganismos es necesario adicionar al medio 1,500 UA/mL de cultivo en promedio para las cepas de *Listeria innocua* ATCC33090 y *Listeria monocytogenes* Scott A, LMB 911204/47 y LMB 92000/48. Para la cepa LM 82, sin embargo, la concentración mínima inhibitoria fue de 6,140 UA/mL de cultivo, lo que

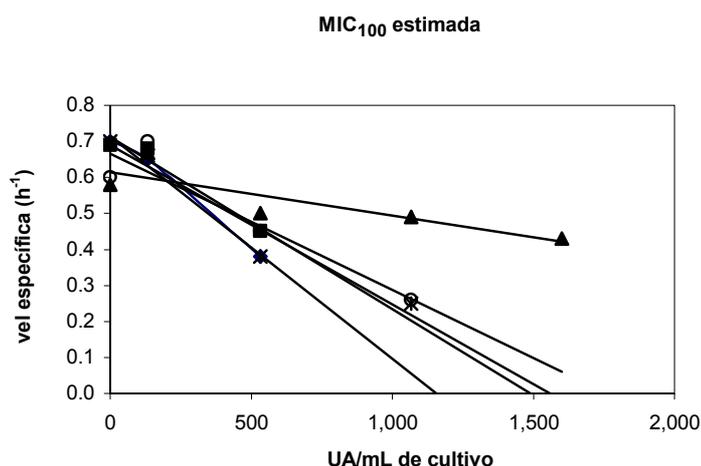
está de acuerdo con lo anteriormente comentado para esta cepa. Para eliminar al menos el 50% de la población de *Listeria* son necesarias en promedio 776 UA/mL de cultivo para todas las cepas salvo *Listeria monocytogenes* LM 82, para la que se necesitan 3,240 UA/mL de cultivo.

**Tabla 8.2.** Valores de MIC estimados para cada cepa de *Listeria*.

parámetro	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i> Scott A	<i>L. monocytogenes</i> LM82	<i>L. monocytogenes</i> LMB 47	<i>L. monocytogenes</i> LMB 48
k	0.0006	0.0005	0.0001	0.0004	0.0004
$\mu_T$	0.7138	0.7131	0.614	0.6663	0.6894
R <sup>2</sup>	0.9907	0.9583	0.7416	0.8938	0.9478
MIC	1,190	1,426	6,140	1,666	1,724
MIC <sub>50</sub>	606	736	3,240	916	849

k = velocidad de inhibición específica (ml.  $\mu\text{g}^{-1}$ ,  $\text{min}^{-1}$ );  $\mu_T$  = velocidad de crecimiento específico libre de bacteriocina ( $\text{min}^{-1}$ )

R<sup>2</sup> = coeficiente de linealidad; MIC = concentración mínima inhibitoria (UA/ mL de cultivo) y MIC<sub>50</sub> = concentración mínima inhibitoria al 50% (UA/mL de cultivo).



**Figura 8.3.** Concentración mínima inhibitoria estimada para las cepas de *Listeria*. ♦ *Listeria innocua* ATCC33090 ■ *Listeria monocytogenes* Scott A ▲ *Listeria monocytogenes* LM 82 ○ *L. monocytogenes* LMB 911204/47 \* *Listeria monocytogenes* LMB 92000/48.

Según los resultados, se observó que la adición de altas concentraciones de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133 puede inducir la aparición de cepas resistentes, ya que al comparar el crecimiento de las cepas de *Listeria* en presencia de la bacteriocina contra las cepas testigo que crecieron en ausencia de esta bacteriocina se observó una reducción en la velocidad máxima de

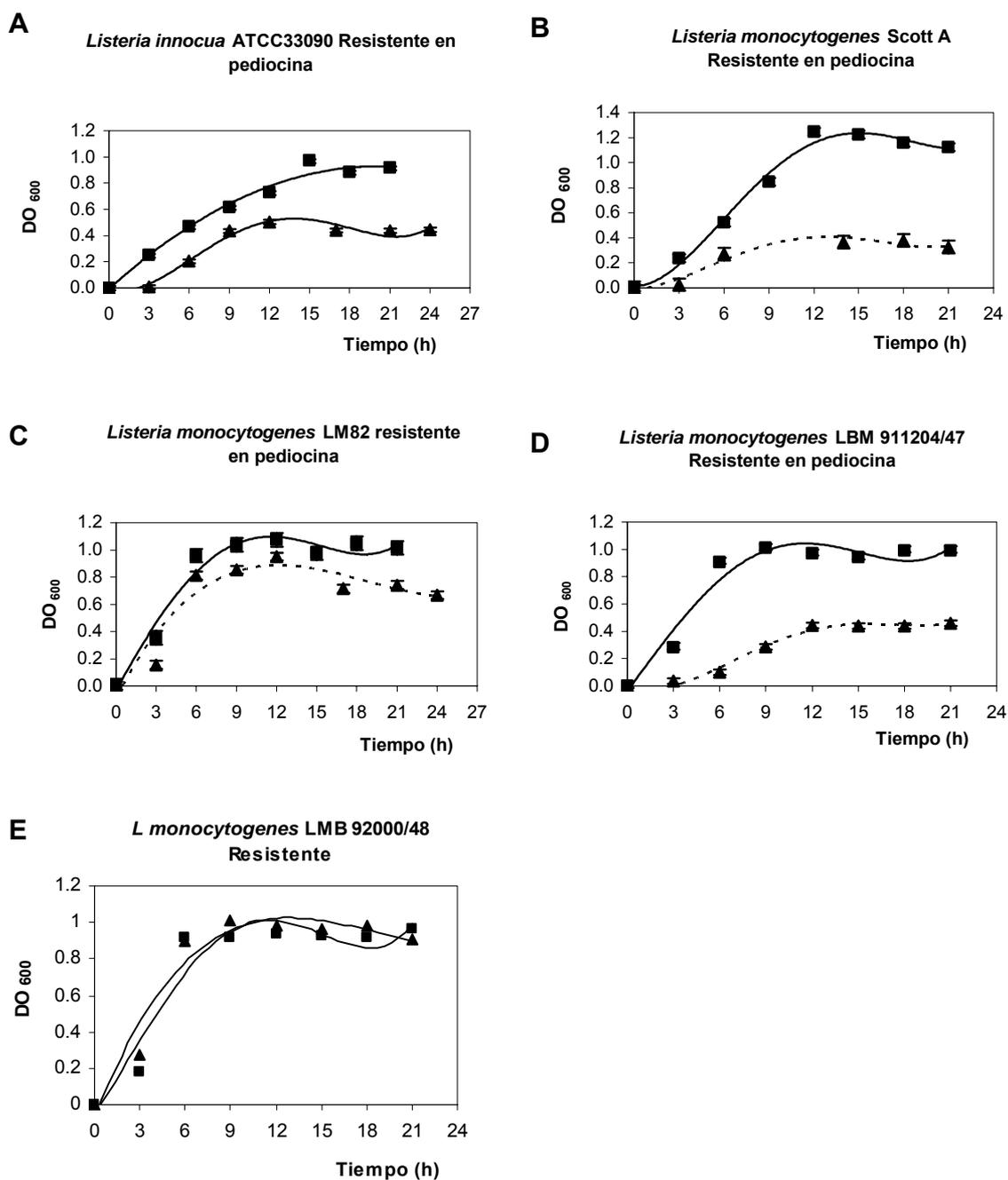
crecimiento específico y un aumento en el tiempo de latencia. El crecimiento finalmente es muy similar al de las cepas testigo, debido probablemente a la aparición de cepas resistentes a las bacteriocinas, obtenidas con 1,600 UA/mL de cultivo.

### **8.3 Obtención de cepas resistentes a la pediocina.**

Para comprobar que realmente se habían obtenido cepas resistentes a la bacteriocina empleada y no cepas con una resistencia temporal, se propuso primero generar las cepas resistentes de acuerdo a las metodologías descritas en las secciones 7.6 y 7.7, y posteriormente estas mismas cepas fueron inoculadas en medio BHI con la bacteriocina presente en este medio (Chikindas *y col.*, 2004), en la misma concentración usada anteriormente (1,600 UA/mL de cultivo). De esta forma, se obtuvieron las curvas de crecimiento mostradas en la figura 8.4.

Los resultados mostraron que todas las cepas inoculadas en medio con bacteriocina, presentaron una fase lag menor que la que presentaron sus respectivas cepas testigo. Debido posiblemente a que estaban adaptadas al medio en donde se encontraba la bacteriocina no hubo necesidad de que se adaptaran nuevamente al mismo medio, razón por la cual no se presentó la fase lag; los datos son mostrados en la tabla 8.3. La resistencia a la bacteriocina empleada en este trabajo experimental se confirmó, pues aún en presencia de la bacteriocina en el medio (con la misma concentración con la cual fueron generadas las mutantes) ya no se observó ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento. No se observó tampoco retardo en la fase lag al utilizar varias concentraciones de bacteriocina por lo que se puede deducir que no se trata de cepas con resistencia temporal. De haber sido así, las cepas obtenidas y que fueron denominadas “resistentes” deberían haber presentado un cierto efecto inhibitorio en la fase lag, o bien inhibición completa del crecimiento, al ser inoculadas de nuevo. Las cepas generadas con una alta concentración de bacteriocina son de carácter resistente, tal como lo observaron Chikindas y

colaboradores en el 2004, así como Gravesen y *col.* (2002b), quienes emplearon nisina.



**Figura 8.4** Curvas de crecimiento de *Listeria innocua* ATCC33090 (A) y *Listeria monocytogenes* Scott A, LM82, LMB 911204/47 y LMB 92000/48 (B, C, D y E) en medio BHI con 1,600 UA/mL de cultivo. ■ Resistente --▲—Testigo (libre de pediocina).

**Tabla 8.3.** Parámetros estimados de las curvas de crecimiento de *Listeria* denominadas “Resistentes” a la bacteriocina.

Parámetros estimados *	<i>Listeria innocua</i> ATCC33090	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	<i>Listeria monocytogenes</i> LM 82	<i>Listeria monocytogenes</i> LMB 911204/47	<i>Listeria monocytogenes</i> LMB 92000/48
No	0.002	0.002	0.07	0.002	0.002
Nmax	0.95	1.20	1.04	0.95	0.92
$\mu_{max}$	1.00	0.47	1.07	1.00	0.97
t – lag	2.93	3.59	2.95	2.93	2.84
t-d	0.31	1.47	0.65	0.31	0.40

T= testigo en BHI sin glucosa, R = resistente en BHI sin glucosa, TG= testigo en BHI con glucosa y RG = resistente en BHI con glucosa No = Densidad óptica inicial, Nmax = Máxima densidad óptica,  $\mu_{max}$  = velocidad máxima de crecimiento específico ( $h^{-1}$ ), t-lag = tiempo de la fase lag (h), t-d = tiempo de duplicación (h)

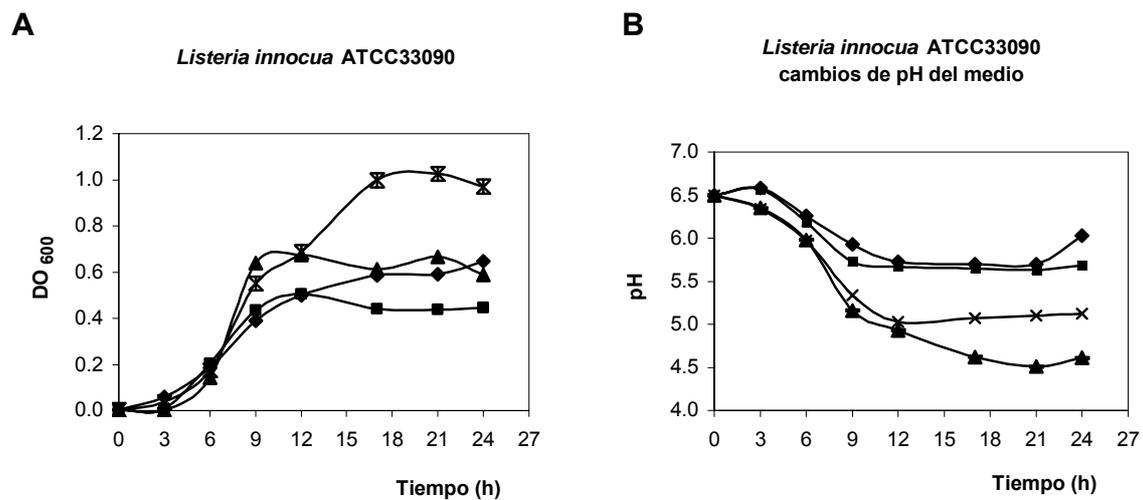
\*Datos obtenidos con el programa MicroFit © v.1.0.

#### 8.4 Determinación del mecanismo de resistencia a la pediocina.

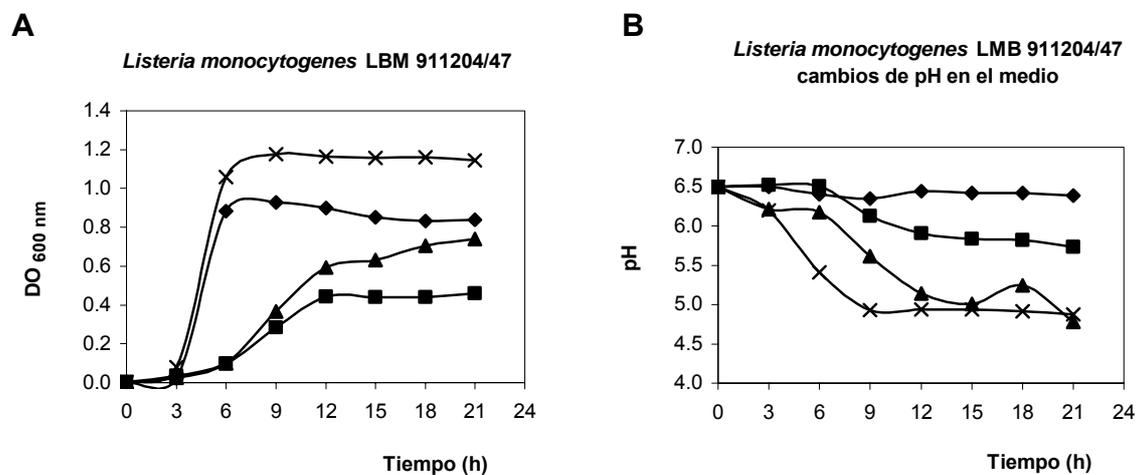
Como se comentó en la Revisión Bibliográfica, Vadyvaloo y colaboradores (2004) propusieron un mecanismo de resistencia que consiste en un cambio en el metabolismo fermentativo, confiriéndole a la cepa además de resistencia ventajas en la formación de biomasa.

##### 8.4.1 Cambio en el metabolismo de las cepas resistentes de *Listeria*.

Para verificar si éste era también nuestro caso, una vez obtenidas las cepas resistentes de cada cepa de *Listeria* empleada en este trabajo experimental fueron cultivadas junto con sus respectivas cepas testigo en medio BHI con y sin suplemento de 10 mM de glucosa, dando una fuente de carbono extra al medio de cultivo, en condiciones microaerófilas. De esta manera se pretendió determinar el cambio del metabolismo, detectando los productos de la fermentación. Los resultados se muestran en las figuras 8.5 y 8.6.



**Figura 8.5.** Curvas de crecimiento de *Listeria innocua* ATCC33090 (A) y cambios en el pH del medio (B) ■ testigo en BHI ◆ resistente en BHI ▲ testigo en BHI con glucosa x Resistente en BHI con glucosa.



**Figura 8.6.** Curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* LBM 911204/47 (A) y cambios en el pH del medio (B) ■ testigo en BHI ◆ resistente en BHI ▲ testigo en BHI con glucosa x Resistente en BHI con glucosa.

Tanto *Listeria innocua* ATCC33090 como *Listeria monocytogenes* LBM 911204/47 presentaron un crecimiento bacteriano típico, en cuanto a fase lag, fase exponencial y fase de latencia; sin embargo, se observó que la velocidad máxima de crecimiento específico para las cepas resistentes de ambas cepas de *Listeria* se ve afectada cuando éstas son cultivadas en medio adicionado con glucosa (tablas 8.4 y 8.5).

**Tabla 8.4.** Parámetros estimados de las curvas de crecimiento de *Listeria innocua* ATCC33090.

Parámetros estimados*	T	R	TG	RG
No	0.002	0.07	0.002	0.002
Nmax	0.45	0.58	0.64	0.99
$\mu_{\max}$	1.30	0.47	0.69	0.41
T – lag	5.75	6.04	5.96	6.40
T - d	0.53	1.47	1.00	1.68

T= testigo en BHI sin glucosa, R = resistente en BHI sin glucosa, TG= testigo en BHI con glucosa y RG = resistente en BHI con glucosa

No = Densidad óptica inicial, Nmax = Máxima densidad óptica,  $\mu_{\max}$  = velocidad máxima de crecimiento específico ( $h^{-1}$ ),

t-lag = tiempo de la fase lag (h), t-d = tiempo de duplicación (h)

\*Datos obtenidos con el programa MicroFit © v.1.0.

**Tabla 8.5.** Parámetros estimados de las curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* LBM 911204/47.

Parámetros estimados *	T	R	TG	RG
No	0.002	0.002	0.002	0.002
Nmax	0.45	0.87	0.67	1.16
$\mu_{\max}$	0.57	1.97	0.65	1.62
t – lag	7.12	4.45	7.51	3.55
t-d	1.21	0.35	1.06	0.43

T= testigo en BHI sin glucosa, R = resistente en BHI sin glucosa, TG= testigo en BHI con glucosa y RG = resistente en BHI con glucosa

No = Densidad óptica inicial, Nmax = Máxima densidad óptica,  $\mu_{\max}$  = velocidad máxima de crecimiento específico ( $h^{-1}$ ),

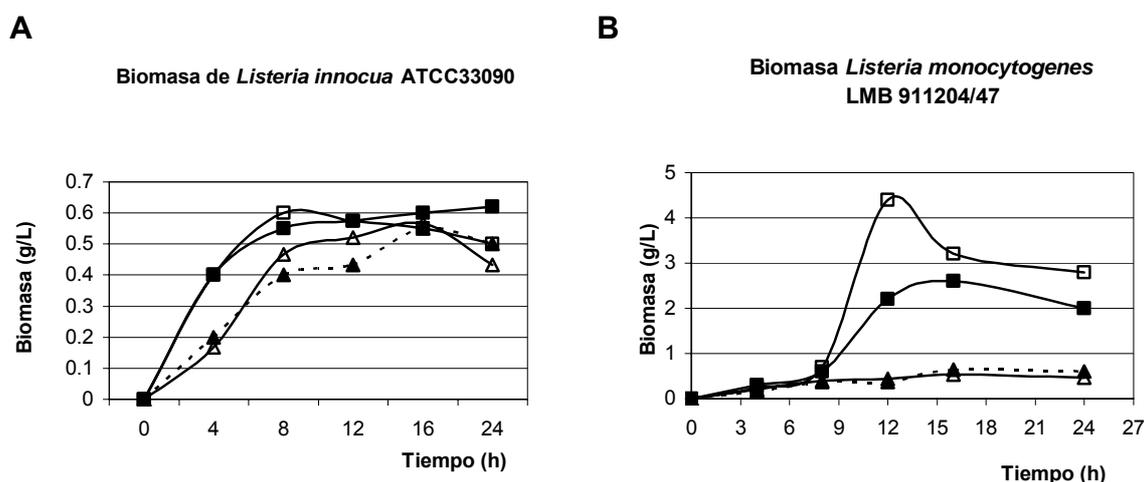
t-lag = tiempo de la fase lag (h), t-d = tiempo de duplicación (h)

\*Datos obtenidos con el programa MicroFit © v.1.0.

En la cepa resistente de *Listeria innocua* ATCC33090 su velocidad máxima de crecimiento específico disminuyó de 0.47 a 0.41 ( $h^{-1}$ ) cuando la cepa fue cultivada en

presencia de glucosa, y para *Listeria monocytogenes* LBM 911204/47 el cambio fue de 1.97 a 1.62 ( $\text{h}^{-1}$ ), en las mismas condiciones de cultivo.

También se observó que las cepas resistentes de las dos cepas de *Listeria* produjeron mayor biomasa en comparación con la cepa testigo en el medio adicionado con glucosa, como se observa en la figura 8.7, viéndose favorecido dicho crecimiento en este medio por la adición de una fuente extra de carbono. Del mismo modo, se observó mayor acidez en el medio adicionado con glucosa que en el medio sin glucosa (disminución de 6.5 a 4.72, figuras 8.5 B y 8.6 B), sugiriendo con esto que en el medio se encontraban otros ácidos adicionales al ácido láctico (Vadyvaloo y col., 2004).



**Figura 8.7.** Biomasa de *Listeria innocua* ATCC33090 (A) y *Listeria monocytogenes* LMB 911204/47 (B) en medio BHI sin glucosa y con glucosa. --▲-- Testigo en BHI, -△- Testigo en BHI con glucosa, -■- Resistente en BHI, -□- Resistente en BHI con glucosa.

La determinación de este último punto se realizó a través de la identificación y cuantificación de los productos de la fermentación, realizándose mediante el uso de HPLC.

En primer lugar se realizó una curva de calibración con los siguientes compuestos: ácido láctico, ácido pirúvico, glucosa, ácido acético, ácido fórmico y etanol, con una

concentración original de 20 mM de cada uno, excepto para la glucosa (que fue de 10 mM, ya que ésta fue la concentración con la cual fue suplementado el medio de cultivo y estimándose que por cada molécula de glucosa se forman 2 de cada uno de los compuestos mencionados anteriormente) (Madigan *y col.*,1998). Cada uno de estos compuestos fue disuelto en el medio de cultivo (BHI) previamente preparado y se realizaron diferentes diluciones para construir una curva de calibración y conocer los tiempos de retención (ver anexo B).

Se siguió la metodología establecida en la sección 7.9, en la cual todas las cepas de *Listeria* testigo y resistentes, fueron resembradas en medio BHI con suplemento de glucosa hasta alcanzar la fase media exponencial. Posteriormente, el medio fue analizado por HPLC (este experimento se realizó por duplicado).

En las cepas resistentes de *Listeria innocua* ATCC33090 y *Listeria monocytogenes* LBM 911204/47, se observó que disminuyó el consumo de glucosa, siendo más evidente en la cepa de *Listeria monocytogenes* LBM 911204/47. Estos datos son presentados en las tablas 8.6 y 8.7.

**Tabla 8.6.** Productos de la fermentación de *Listeria innocua* ATCC33090.

Cepa	Productos de la fermentación (mM)					
	Láctico	Pirúvico	Glucosa (residual)	Acético	Fórmico	Etanol
Testigo con glucosa	--	--	5.629	6.008	10.282	--
Resistente con glucosa	--	--	6.505	5.891	11.356	--

**Tabla 8.7.** Productos de la fermentación de *Listeria monocytogenes* LBM 911204/47.

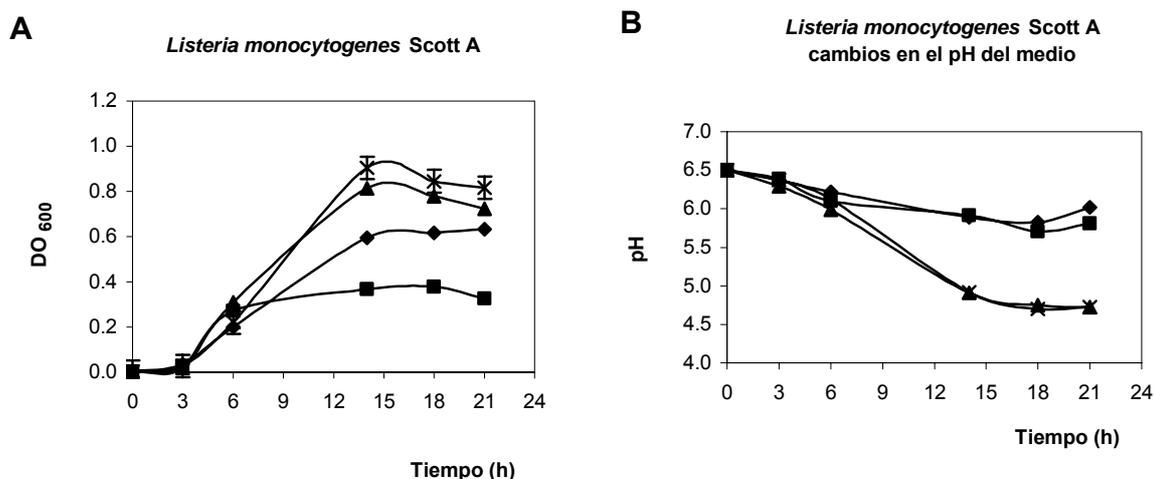
Cepa	Productos de la fermentación (mM)					
	Láctico	Pirúvico	Glucosa (residual)	Acético	Fórmico	Etanol
Testigo con glucosa	4.057	-	5.590	4.321	9.453	-
Resistente con glucosa	-	-	12.580	6.096	9.415	-

A diferencia de la cepa resistente, la cepa testigo de *Listeria monocytogenes* LBM 911204/47 produjo ácido láctico, aunque en una concentración menor a la de ácido fórmico. En las dos cepas resistentes de *Listeria* se observó que el tipo de fermentación que se llevó a cabo fue una fermentación ácido mixta, en la cual se formaron principalmente ácido fórmico y ácido acético, lo cual coincide con lo reportado por Vadyvaloo y *col.* (2004) quienes compararon la velocidad máxima de crecimiento específico de las cepas testigo con las resistentes, detectando menor velocidad de crecimiento específico en presencia de glucosa y mayor velocidad al crecer en medio libre de glucosa. Así, las cepas produjeron mayor biomasa en presencia de glucosa, mientras que en medio libre de glucosa la cantidad de biomasa fue similar para ambas cepas (testigos y resistentes). La glucosa consumida por la bacteria fue completamente convertida a productos de fermentación, indicando que fue empleada como fuente de energía y que la formación de biomasa fue limitada por la disponibilidad de carbohidratos. El lactato, acetato, etanol y formiato fueron productos típicos de la fermentación cuando las bacterias fueron cultivadas en presencia de glucosa. Asimismo, hubo un marcado cambio en el patrón de fermentación observado entre las cepas testigo y las resistentes a la bacteriocina: las cepas testigo presentaron una fermentación láctica donde del 83 al 94 % del carbono fue transformado en lactato (Farber y Peterkin, 1991), mientras que en las cepas resistentes hubo un cambio a una fermentación de tipo ácido mixta (hay que destacar que una fermentación ácido mixta tiene un mayor rendimiento de ATP por glucosa, comparada con la fermentación láctica).

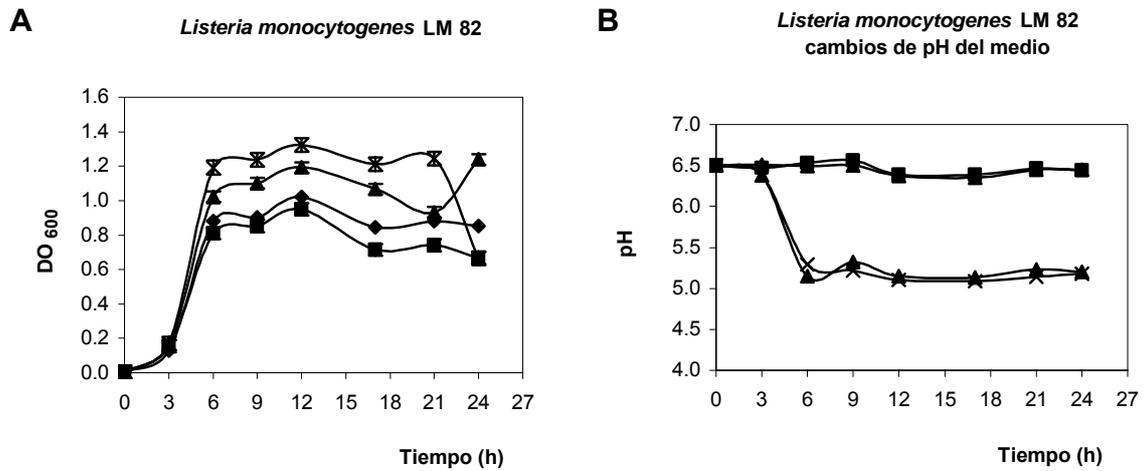
Datos similares se observaron en el crecimiento de las cepas de *Listeria innocua* ATCC33090 y *Listeria monocytogenes* LBM 911204/47, siendo éste favorecido en presencia de glucosa, (se obtuvieron mayores valores de biomasa, valores que son aún más altos para las cepas resistentes). Del mismo modo, para las dos cepas resistentes de *Listeria*, las velocidades máximas de crecimiento específico son menores en comparación con las de sus respectivos testigos, indicando que dicha resistencia afecta a la velocidad de consumo de glucosa y probablemente al sistema de fosfotransferasas. Esto se comprobó a través de HPLC, donde se cuantificó la

glucosa: la cepa resistente de *Listeria innocua* ATCC33090 consumió menos de la mitad de la concentración inicial de glucosa, en cambio la cepa resistente de *Listeria monocytogenes* LMB 911204/47 sólo consumió un 20 % de la glucosa inicial. Las dos cepas testigo de *Listeria*, presentaron una fermentación con producción de lactato, pero también de otros metabolitos como formiato y acetato, mientras que las cepas resistentes no formaron lactato, pero si concentraciones mayores de formiato y acetato (las cepas resistentes llevaron a cabo una fermentación ácido mixta).

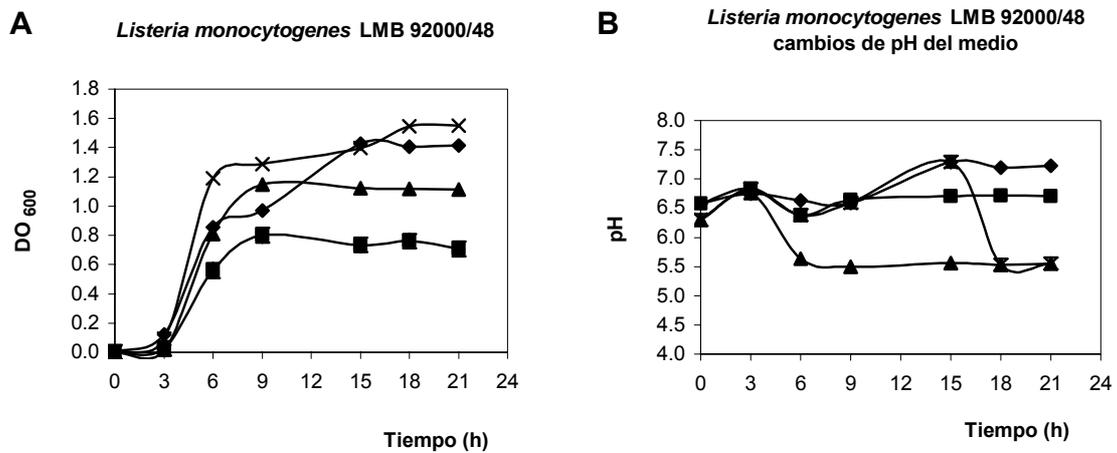
Para las cepas de *Listeria monocytogenes* Scott A, *Listeria monocytogenes* LM82 y LMB 92000/48 se realizó el mismo procedimiento, obteniéndose datos similares a los de las cepas anteriores. Esto se observa en las figuras 8.8, 8.9 y 8.10, donde las cepas resistentes en medio con glucosa presentaron siempre un mayor crecimiento que su respectivo testigo.



**Figura 8.8.** Curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* Scott A (A) y cambios en el pH del medio (B) ■ testigo en BHI ◆ resistente en BHI ▲ testigo en BHI con glucosa x Resistente en BHI con glucosa.



**Figura 8.9.** Curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* LM82 (A) y cambios en el pH del medio (B) ■ testigo en BHI ♦ resistente en BHI ▲ testigo en BHI con glucosa x Resistente en BHI con glucosa.



**Figura 8.10.** Curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* LMB 92000/48 (A) y cambios en el pH del medio (B) ■ testigo en BHI ♦ resistente en BHI ▲ testigo en BHI con glucosa x Resistente en BHI con glucosa.

Cuando las cepas testigo y resistentes fueron cultivadas en medio con glucosa su crecimiento fue muy similar (en las tres cepas de *Listeria*), pero con un ligero aumento en la producción de biomasa en las cepas resistentes después de las 12 h

de cultivo. Del mismo modo, el pH del medio disminuyó en casi 1 unidad, excepto para *Listeria monocytogenes* Scott A donde el descenso fue de 6.5 a 4.7.

Las velocidades máximas de crecimiento específico para las cepas resistentes de *Listeria monocytogenes* Scott A, LM82 y 92000/48 aumentaron cuando estas cepas fueron cultivadas en presencia de glucosa; para la primera cepa de *Listeria* el cambio fue de 0.52 a 0.96 ( $\text{h}^{-1}$ ), para la segunda de 0.98 a 1.63 ( $\text{h}^{-1}$ ) y de 1.09 a 1.63 ( $\text{h}^{-1}$ ) para la última; los datos son mostrados en las tablas 8.8, 8.9 y 8.10.

**Tabla 8.8.** Parámetros estimados de las curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* Scott A.

Parámetros estimados *	T	R	TG	RG
No	0.05	0.002	0.02	0.02
Nmax	0.35	0.61	0.77	0.84
$\mu_{\text{max}}$	0.96	0.52	1.11	0.96
t – lag	4.94	6.07	5.59	6.12
t-d	0.72	1.34	0.62	0.73

T= testigo en BHI sin glucosa, R = resistente en BHI sin glucosa, TG= testigo en BHI con glucosa y RG = resistente en BHI con glucosa

No = Densidad óptica inicial, Nmax = Máxima densidad óptica,  $\mu_{\text{max}}$  = máxima velocidad de crecimiento específico ( $\text{h}^{-1}$ ), t-lag = tiempo de la fase lag (h), t-d = tiempo de duplicación (h)

\*Datos obtenidos con el programa MicroFit © v.1.0.

**Tabla 8.9.** Parámetros estimados de las curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* LM82.

Parámetros estimados *	T	R	TG	RG
No	0.002	0.002	0.002	0.002
Nmax	0.79	0.86	1.11	1.26
$\mu_{\text{max}}$	0.87	0.98	1.39	1.63
T – lag	3.02	3.00	3.36	3.45
t-d	0.79	0.71	0.50	0.33

T= testigo en BHI sin glucosa, R = resistente en BHI sin glucosa, TG= testigo en BHI con glucosa y RG = resistente en BHI con glucosa

No = Densidad óptica inicial, Nmax = Máxima densidad óptica,  $\mu_{\text{max}}$  = velocidad máxima de crecimiento específico ( $\text{h}^{-1}$ ), t-lag = tiempo de la fase lag (h), t-d = tiempo de duplicación (h)

\*Datos obtenidos con el programa MicroFit © v.1.0.

**Tabla 8.10.** Parámetros estimados de las curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* LMB 92000/48.

Parámetros estimados *	T	R	TG	RG
No	0.002	0.002	0.002	0.002
Nmax	0.75	1.31	1.13	1.44
$\mu_{\max}$	1.49	1.09	1.81	1.63
t – lag	4.67	3.93	4.70	3.85
t-d	0.47	0.63	0.38	0.43

T= testigo en BHI sin glucosa, R = resistente en BHI sin glucosa, TG= testigo en BHI con glucosa y RG = resistente en BHI con glucosa

No = Densidad óptica inicial, Nmax = Máxima densidad óptica,  $\mu_{\max}$ = velocidad máxima de crecimiento específico ( $h^{-1}$ ), t-lag = tiempo de la fase lag (h), t-d = tiempo de duplicación (h)

\*Datos obtenidos con el programa MicroFit © v.1.0.

Las cepas de *Listeria monocytogenes* Scott A, LM 82 y LMB 92000/48, produjeron mayor cantidad de biomasa, en comparación con sus respectivas cepas testigo (figura 8.11). El consumo de glucosa fue distinto, para *Listeria monocytogenes* Scott A aumentó y para *Listeria monocytogenes* LM 82 y LMB 92000/48 no hubo un cambio significativo en el consumo de glucosa, como se observa en los datos de las tablas 8.11, 8.12 y 8.13 respectivamente, el consumo de glucosa es expresado como glucosa residual.

**Tabla 8.11.** Productos de la fermentación de *Listeria monocytogenes* Scott A

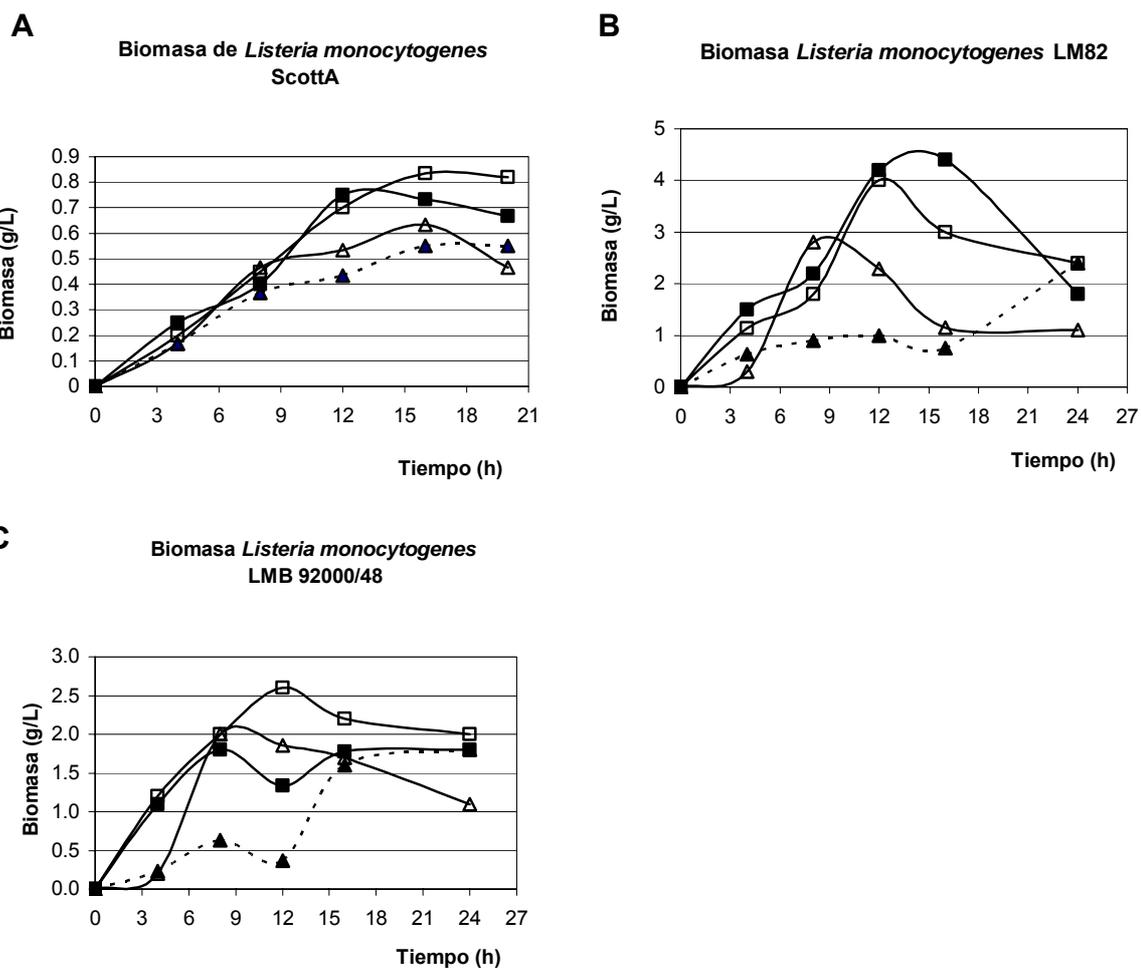
Cepa	Productos de la fermentación (mM)					
	Láctico	Pirúvico	Glucosa	Acético	Fórmico	Etanol
Testigo con glucosa	3.020	--	8.409	3.177	7.075	--
Resistente con glucosa	--	--	6.563	3.603	9.468	--

**Tabla 8.12.** Productos de la fermentación de *Listeria monocytogenes* LM82

Cepa	Productos de la fermentación (mM)					
	Láctico	Pirúvico	Glucosa	Acético	Fórmico	Etanol
Testigo con glucosa	--	--	13.766	4.348	8.848	--
Resistente con glucosa	--	--	13.288	6.573	9.708	14.036

**Tabla 8.13.** Productos de la fermentación de *Listeria monocytogenes* LMB 9200/48

Cepa	Productos de la fermentación (mM)					
	Láctico	Pirúvico	Glucosa	Acético	Fórmico	Etanol
Testigo con glucosa	--	--	8.105	4.128	7.958	--
Resistente con glucosa	--	--	8.541	7.421	9.854	11.012



**Figura 8.11.** Biomasa de *Listeria monocytogenes* Scott A (A) LM82 (B) y LMB 92000/48 (C) en medio BHI sin glucosa y con glucosa. --▲-- Testigo en BHI, -△- Testigo en BHI con glucosa, -■- Resistente en BHI, -□- Resistente en BHI con glucosa.

En la cepa de *Listeria monocytogenes* Scott A, la cepa testigo formó ácido láctico pero también ácido fórmico y ácido acético, en concentraciones mayores al láctico. Presentó pues una fermentación heteroláctica, mientras que en *Listeria monocytogenes* LM82 y LMB 92000/48 se dió una fermentación de tipo ácido mixta.

Las cepas resistentes de *Listeria monocytogenes* Scott A, LM82 y 92000/48, presentaron mayor velocidad específica de crecimiento así como en su formación de biomasa, al ser comparadas con sus respectivos testigos. En estos casos, la resistencia de *Listeria* a las bacteriocinas no afecta al sistema de transporte de glucosa, como en los casos anteriores, o bien ocurre que estas cepas utilizaron un sistema de transporte diferente al de fosfotransferasas. Aunque también podría ser que la resistencia haya contribuido a una sobreexpresión de la subunidad Ellab del sistema de fosfotransferasa, por lo que en lugar de disminuir la velocidad de consumo de glucosa como en el caso de las cepas de anteriores (*L. innocua* y *L. monocytogenes* LBM 911204/47) en éstas aumentó dicho consumo.

Uno de los mecanismos propuestos para explicar la resistencia de las cepas de *Listeria monocytogenes* es la ausencia de la subunidad Ellab, o bien una sobreexpresión de esta subunidad del sistema de fosfotransferasas (Gravesen y col., 2002b). Por ello se realizaron estudios para ver si la reducción en la velocidad específica de crecimiento de las cepas resistentes, cuando crecían en presencia de glucosa, podría estar relacionada con una baja velocidad de consumo de glucosa. Es sabido que el complejo Ellab no es la única enzima capaz de transportar la glucosa, aunque éste es el mecanismo de transporte con mayor afinidad para este compuesto en bacterias como *Listeria monocytogenes* (Farber y Peterkin, 1991). Sin embargo, ésto no excluye el que Ellab pudiera tener un cierto control sobre la velocidad de crecimiento y que su mutación pudiera afectar a la velocidad de consumo de glucosa y a la velocidad específica de crecimiento. Para corroborar esto, Vadyvaloo y col. (2004) realizaron un análisis sobre el consumo de glucosa en varios puntos de la fase lag de las cepas resistentes, encontrando que hubo efectivamente una reducción en la velocidad de consumo de glucosa en las cepas resistentes a las

bacteriocinas de la clase IIa, en comparación con sus correspondientes cepas testigo.

Esta disminución de la velocidad específica de crecimiento de las cepas resistentes ha sido interpretada y asociada con un ahorro energético, sugiriéndose que el sistema PTS (Sistema de Fosfotransferasas) pueda ser el principal transportador de glucosa para las cepas de *Listeria monocytogenes*. También se observó un incremento en la velocidad específica de crecimiento de las cepas resistentes en medio libre de glucosa, en comparación con su respectiva cepa testigo. En ausencia del transportador de glucosa podría existir otro regulador de la ruta metabólica que da a estas células una ventaja en ausencia de glucosa, un ejemplo de este regulador, podrían ser el  $\beta$ -glucósido, específico de las cepas resistentes de *Listeria monocytogenes*. O bien, que la glucosa cause un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las cepas resistentes. Sin embargo, después de que estos autores realizaron el experimento correspondiente observaron que, a pesar de la aparente desventaja de tener menor velocidad de crecimiento en presencia de glucosa, las cepas resistentes tuvieron un mayor rendimiento de biomasa (debido probablemente, a que en la fermentación láctica se forman 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa y en una fermentación ácido mixta se forman 3 moléculas de ATP por molécula de glucosa fermentada). Así, un cambio en el metabolismo respecto al tipo de fermentación, de láctica a ácido mixta, podría resultar en un incremento en la concentración de biomasa final. Por lo tanto, la baja velocidad de crecimiento, la velocidad de consumo de la glucosa y la limitación de glucosa están directamente implicados en el cambio entre la fermentación láctica y la ácido mixta (Vadyvaloo y col., 2004b).

Estos antecedentes concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo experimental, observándose que en altas concentraciones de bacteriocina se generan cepas resistentes (Chikindas y col., 2004). Las cepas generadas no presentan sólo una resistencia temporal puesto que, como se explicó anteriormente, al ser inoculadas nuevamente en medio con bacteriocina son capaces de crecer sin

ningún problema de inhibición. Vadyvaloo y col., (2004b) observaron que estas mismas cepas resistentes, al ser inoculadas en medio adicionado con glucosa, cambian su metabolismo en cuanto al transporte de la glucosa, reprimiéndose el sistema de fosfotransferasas en una de sus subunidades (Ramnath y col., 2000), lo que da paso a la activación de otro sistema de transporte de la glucosa (aunque no sea el más afín). Este hecho finalmente representa una alternativa de consumo de glucosa, ocurriendo éste a través de la fuerza motriz de protones o quimiosmosis, en la cual interviene un sistema acarreador de la glucosa sin fosforirla como sucedía con el sistema PTS (Madigan y col., 1998). Este cambio, sumado al cambio en el metabolismo de la glucosa (en donde se genera más ATP, representado en un aumento de biomasa), coincide con los resultados presentados en este escrito.

#### **8.4.2 Cambio en la composición de los ácidos grasos totales.**

Para finalizar, se ha propuesto otra posible hipótesis acerca del mecanismo de resistencia de *Listeria monocytogenes*, el cual consta de un cambio en la composición de la membrana celular (Mazzotla y Montville, 1997; Verheul y col., 1997; Gänzle y col., 1999; Gravesen y col., 2002b; Vadyvaloo y col., 2004a; Mastronicolis y col., 2005).

Una de las teorías es que al someter a las cepas de *Listeria monocytogenes* a estrés, como sería con una alta concentración de bacteriocina de la clase IIa, hay una modificación de la membrana celular, reflejado en aumento del número de carbonos de los ácidos grasos, lo que a su vez hace a la membrana más rígida y poco permeable (Mazzotla y Montville, 1997). Para elucidar esta posibilidad se realizaron las pruebas establecidas en la sección 7.10, 7.11 y 7.12, en las que se determinaron los ácidos grasos totales de las cepas de *Listeria innocua* ATTCC33090 y *Listeria monocytogenes* Scott A, LM 82, LMB 911204/47 y LMB 92000/48, tanto testigos como resistentes.

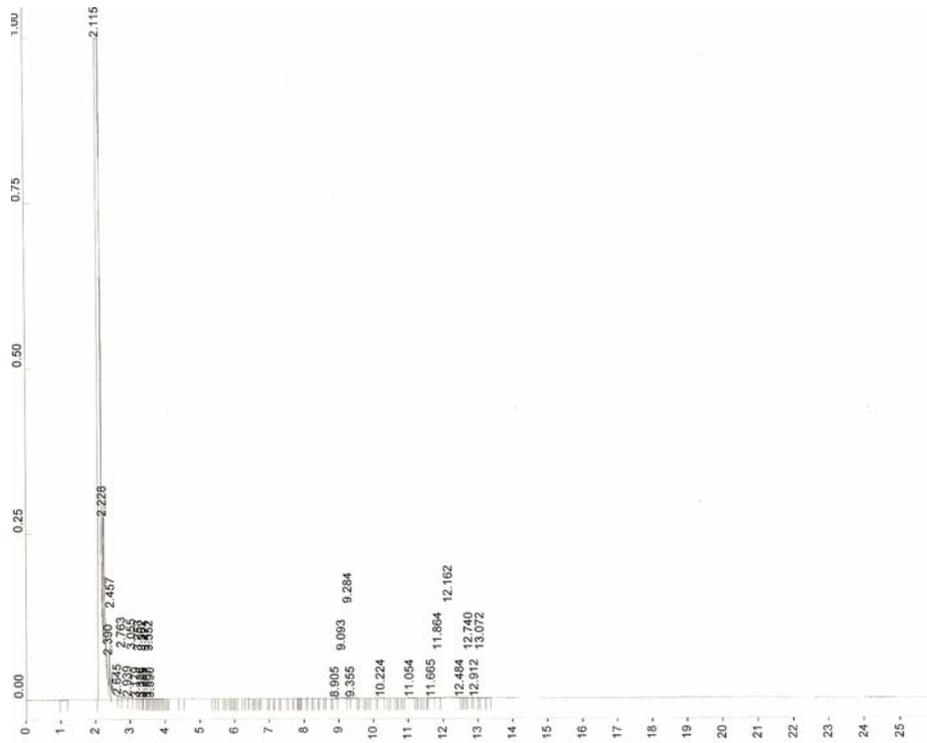
Los resultados de los tiempos de retención para los estándares de ácidos grasos se reportan en la tabla 8.14 y los cromatogramas se detallan en el Anexo C.

**Tabla 8.14.** Tiempos de retención de los estándares de ácidos grasos.

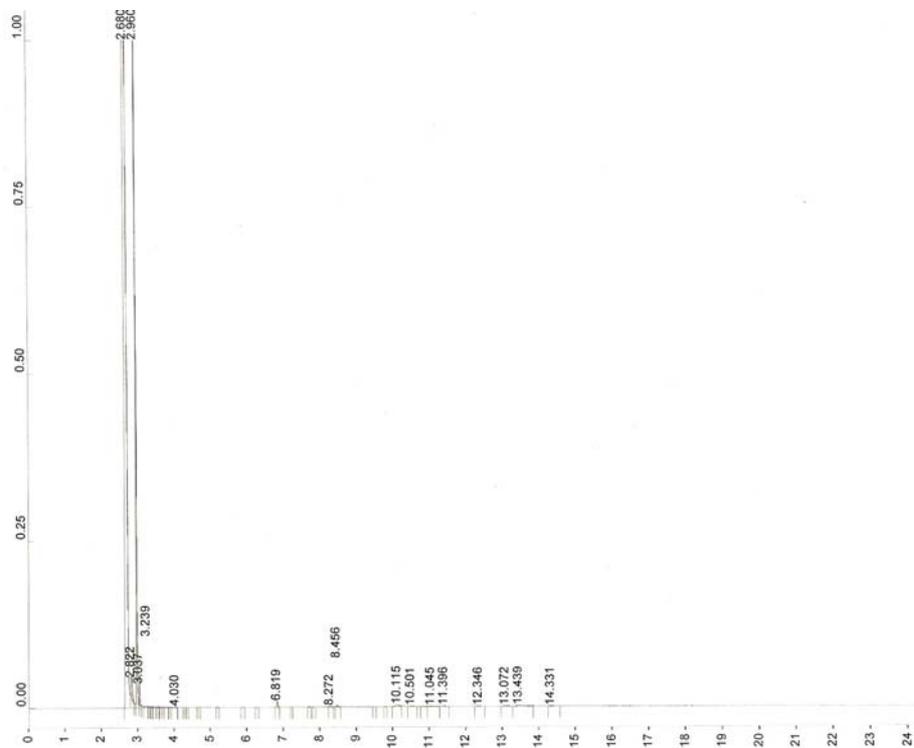
Estándar	# Carbonos	Tiempo de retención (min)	% área
Ácido mirístico	14:00	7.63 - 7.65	1.3906
Ácido palmítico	16:00	10.06 - 10.10	1.5059
Ácido palmitoleico	16:10	10.46 - 10.475	11.3194
Ácido oleico	18:10	13.36 - 13.39	4.4698
Ácido inoleico	18:20	14.28 - 14.34	13.2505
Ácido linolenico	18:30	15.747- 15.750	1.6222

En la tabla 8.14 se observa que a medida que se incrementa el número de carbonos en la cadena del ácido graso, también aumenta el tiempo de retención. Estos tiempos de retención se usaron como parámetro de comparación al inyectar en el cromatógrafo de gases los extractos de los lípidos totales de las cepas de *Listeria* testigos y resistentes. Por éste método, sin embargo, no se detectaron cambios significativos entre la composición de los ácidos grasos totales de testigos y resistentes. En la figura 8.12 se muestra un cromatograma de una cepa testigo y en figura 8.13 un cromatograma de una cepa resistente (el resto de los cromatogramas para las cepas de *Listeria* se encuentran en el Anexo D).

Estos resultados indican que la resistencia podría estar asociada a otro mecanismo, independiente de la composición de lípidos totales. Sin embargo, algunos autores asocian este cambio a una posible adaptación, como ocurre en cepas de *Listeria* sometidas a estrés por temperatura (Mastronicolis y col., 1998 y 2005).



8.12. Perfil de lípidos totales de *Listeria innocua* ATCC33090 testigo.



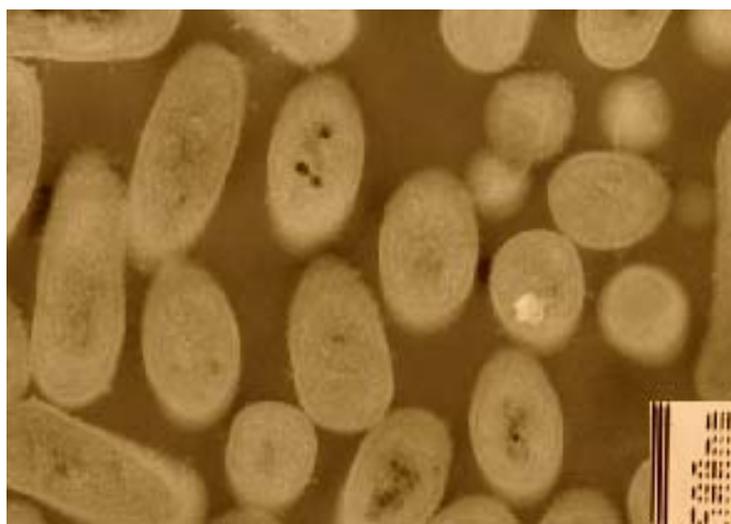
8.13. Perfil de lípidos totales de *Listeria innocua* ATCC33090 resistente

### 8.4.3 Ultraestructura de las cepas de *Listeria* testigos y resistentes.

Como alternativa para encontrar un posible mecanismo que explique la resistencia de *Listeria* a las bacteriocinas, se realizaron observaciones en un microscopio electrónico de transmisión, según la metodología detallada en el apartado 7.13. En la cepas testigo de *Listeria innocua* ATCC33090 no se apreciaron cambios significativos en la estructura de la membrana celular ni tampoco en la cepa resistente, figuras 8.14 y 8.15.

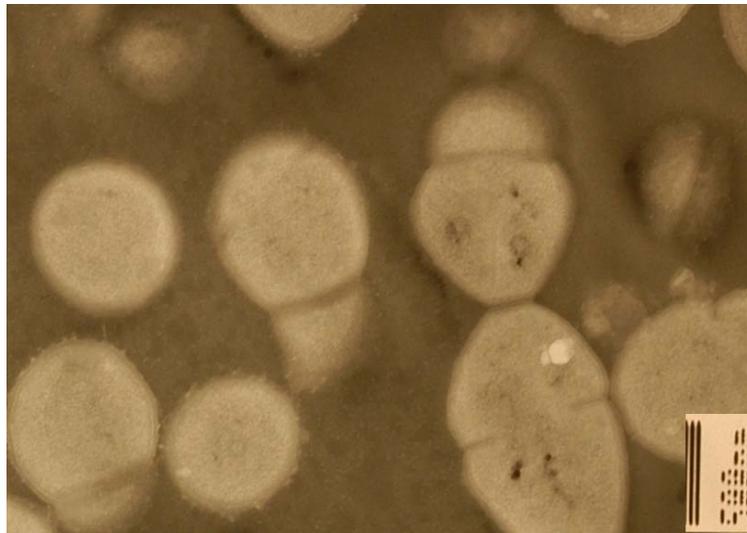


8.14. Micrografía de la cepa testigo de *Listeria innocua* ATCC33090.

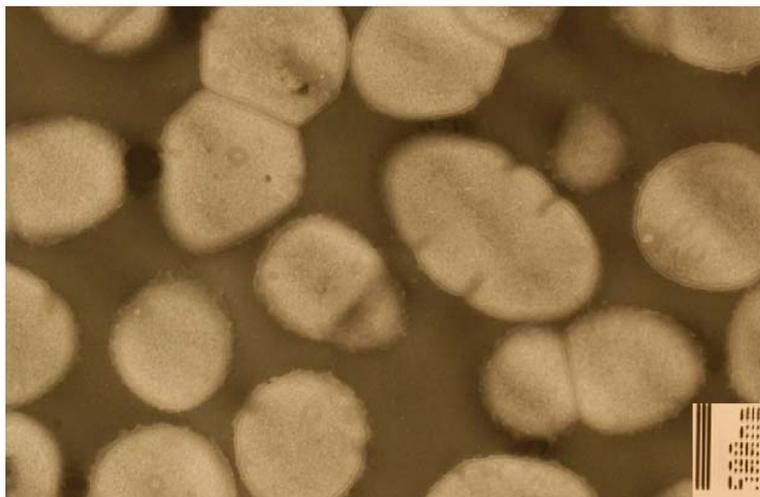


8.15. Micrografía de la cepa resistente de *Listeria innocua* ATCC33090.

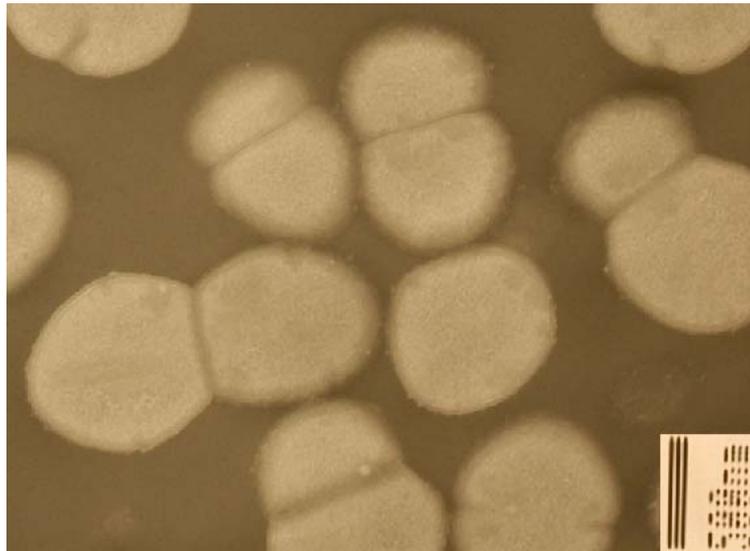
Las observaciones para la cepa de *Listeria monocytogenes* Scott A y LM 82 fueron distintas (figuras 8.16, 8.17, 8.18 y 8.19). Las cepas testigo se observaron en fase media exponencial pero en las cepas resistentes, además de estar en fase exponencial también se observaron vesículas en la pared celular. En trabajos recientes (Moroni y col., 2005) se ha observado que las cepas resistentes presentaban vesículas en la pared celular, independientemente de la fase de crecimiento en la que se encuentren las cepas. Esta característica se presentó en estas dos cepas resistentes en este trabajo experimental.



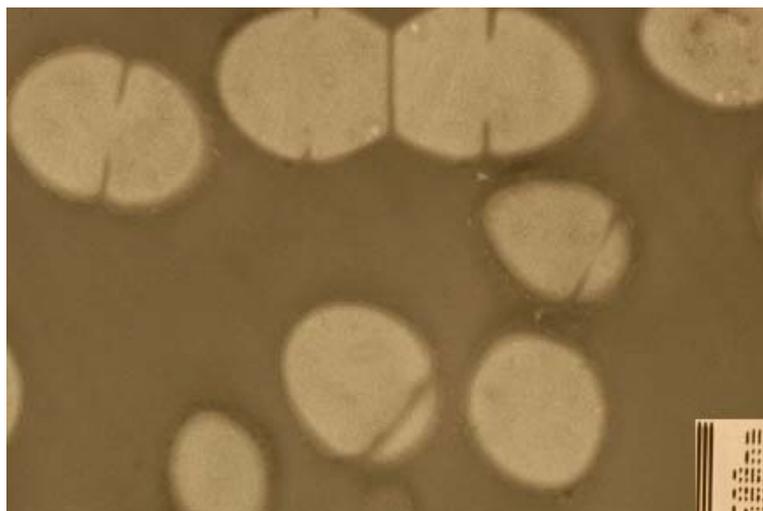
**8.16.** Micrografía de la cepa testigo de *Listeria monocytogenes* Scott A.



**8.17.** Micrografía de la cepa resistente de *Listeria monocytogenes* Scott A.

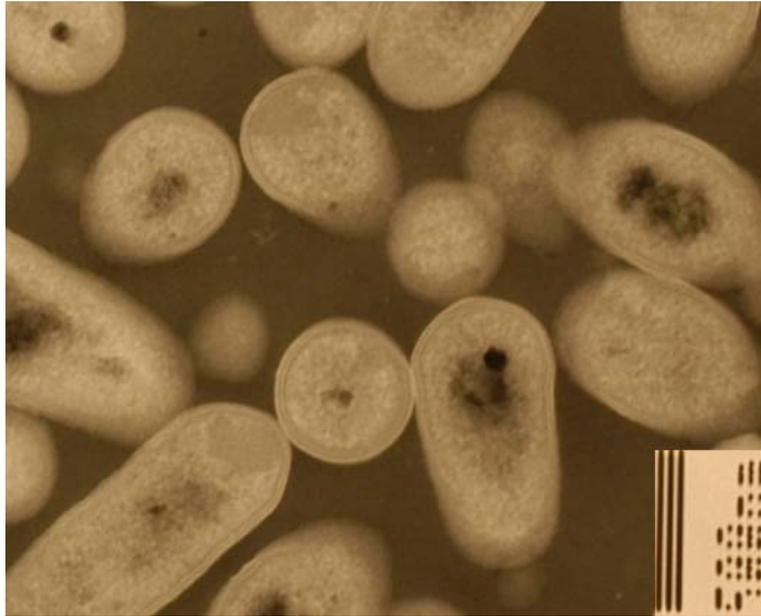


**8.18.** Micrografía de la cepa testigo de *Listeria monocytogenes* LM 82.

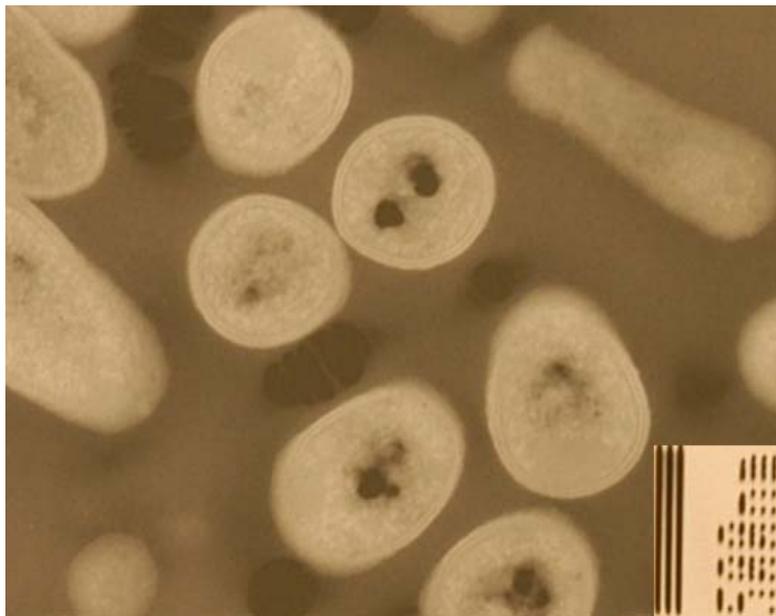


**8.19.** Micrografía de la cepa resistente de *Listeria monocytogenes* LM 82.

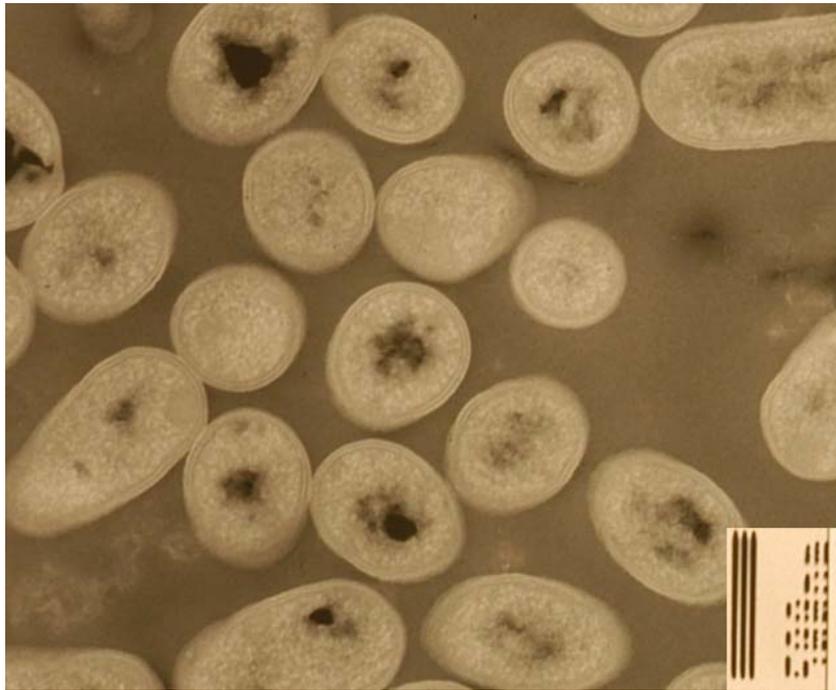
Las cepas de *Listeria monocytogenes* LBM 911204/47 y LMB 92000/48 no presentaron las vesículas descritas en la página anterior, como se puede observar en las figuras 8.20 y 8.21.



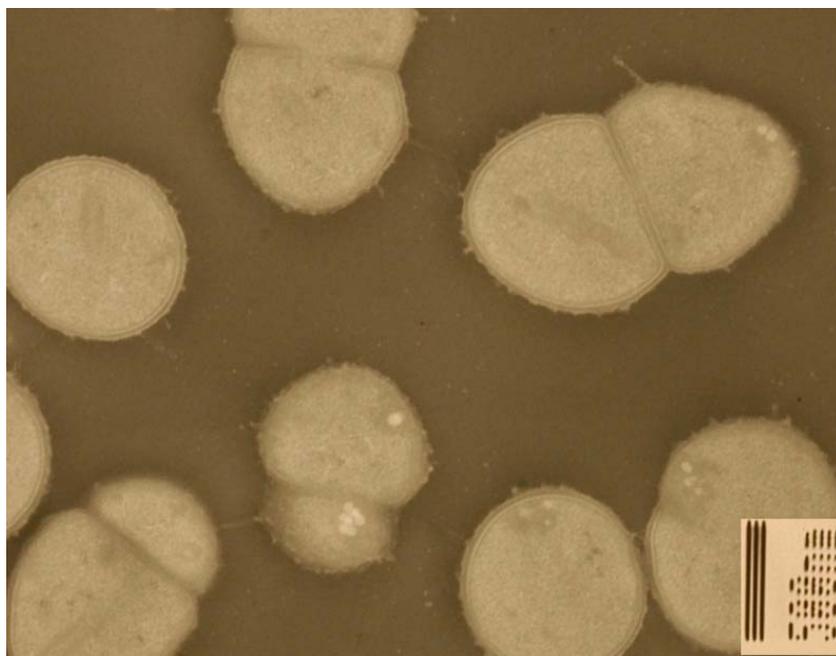
**8.20.** Micrografía de la cepa testigo de *Listeria monocytogenes* LMB 911204/47.



**8.21.** Micrografía de la cepa resistente de *Listeria monocytogenes* LMB 911204/47.



8.22. Micrografía de la cepa testigo de *Listeria monocytogenes* LMB 92000/48.



8.23. Micrografía de la cepa resistente de *Listeria monocytogenes* LMB 92000/48.

## 8.5 Resumen de resultados.

Por los datos obtenidos en este trabajo experimental se sugiere que con el uso de las concentraciones que se probaron se obtuvieron cepas resistentes a la pediocina. En el caso particular de *Listeria innocua* ATCC33090 empleando 1,600 UA/mL de cultivo la inhibición en su crecimiento es nula.

Para el resto de las cepas ensayadas sólo se presenta una inhibición parcial en la fase lag. La pediocina alarga la duración de esta fase, aunque posteriormente las cepas siguen el mismo patrón de crecimiento que el control sin pediocina.

Se observó que el uso de las bacteriocinas en altas concentraciones puede inducir la generación de resistencia espontánea en las diferentes cepas de *Listeria*. Por ello se sugiere probar, al menos, una concentración más alta a la empleada en este trabajo experimental y observar el comportamiento de las cepas en las cuales únicamente se presentó inhibición en la fase lag.

En las cepas de *Listeria*, tanto testigos como resistentes, el crecimiento se ve favorecido en presencia de glucosa, ya que es una fuente extra de carbono en el medio de cultivo. Sin embargo, las cepas resistentes son la que obtuvieron un mayor crecimiento en comparación con las cepas testigo. Del mismo modo, el pH del medio que contenía glucosa fue el que se acidificó más.

Las cepas de *Listeria innocua* ATCC33090 y *Listeria monocytogenes* Scott A siguen el patrón de referencia, en el cual las cepas resistentes presentan una disminución de la velocidad de crecimiento porque la resistencia podría afectar al sistema de fosfotransferasas. Por eso mismo también presenta un cambio en el metabolismo, aunque según la literatura esto podría haber ocurrido debido al exceso de glucosa en el medio.

## 9. CONCLUSIONES

Empleando 1,600 UA/mL de cultivo se obtuvieron cepas resistentes de *Listeria innocua* ATCC33090 y *Listeria monocytogenes* Scott A, LM 82, LMB 911204 y LMB 92000/48.

Las concentraciones mínimas inhibitorias estimadas para cada cepa son: 1,190, 1,426, 6,140, 1,666 y 1,724 UA/mL de cultivo para *Listeria innocua* ATCC33090, *Listeria monocytogenes* Scott A, LM 82, LMB 911204/47 y LMB 92000/48 respectivamente.

Se propone para *Listeria innocua* ATCC33090, *Listeria monocytogenes* LMB 911204/47 y LMB 92000/48 que su mecanismo de resistencia posiblemente consiste en un cambio en el metabolismo fermentativo de la glucosa, utilizando por lo tanto un sistema de transporte de glucosa diferente al de PTS (aunque el uso de dicho sistema no se demostró en este trabajo experimental). Para *Listeria monocytogenes* Scott A y LM 82, podría ocupar el sistema fuerza motriz de protones como alternativa al PTS, teniendo del mismo modo un cambio en su metabolismo.

No se detectaron cambios significativos en la pared celular de las cepas de *Listeria* testigo y resistentes. Por lo que la tesis apoyaría la hipótesis del cambio en el metabolismo como posible mecanismo de resistencia a las bacteriocinas de la clase Ila como lo es la pediocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- Aasen I.M., Moretro T., Katia T y Axelsson L. (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocins production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53: 159 – 166.
- Barbuddhe S.B., Malik SVS. y Bhilegaonkar KN. (1999). Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by commercial nisin and lactic acid in raw buffalo meat mince. *Journal of Food Science and Technology*. 36 (4): 320 – 324.
- Bogovič-Matijašić B., Rogelj I., Nes I.F. y Holo H. (1998). Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 49: 606 – 612.
- Cabo M.L., Murado M.A., González M.P. y Pastoriza L. (1999). A method for bacteriocin quantification. *Journal of Applied Microbiology*. 87: 907 – 914.
- Cabrera M., Fernández M., Font G. y Seldes M. (2000). Direct analysis by electrospray ionization tandem mass spectrometry of mixtures of phosphatidylglycerols from *Lactobacillus*. *Journal of Mass Spectrometry*. 35: 1452 – 1459.
- Cañas A., Pérez A., Molares H., Saucedo I., Fernández L., Castillo R. y Santiago V. (2000). Bacterias patógenas más comunes en los productos cárnicos: características y métodos para su control. *Industria Alimentaria*. Septiembre – Octubre. Pag. 40 – 51.
- Cardoso Elisa M.M. (2003). Bacteriocinas producidas por cepas de *Enterococcus*. [http://www.universia.com.ar/contenidos/investigacion/unl/tecnologia/cs\\_alimentacion/642.htm](http://www.universia.com.ar/contenidos/investigacion/unl/tecnologia/cs_alimentacion/642.htm). Fecha de consulta 07/02/2004
- Carlson S.A., Frana T. y Griffith R. (2001). Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium exposed to microcin producing *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (8): 3763 – 3766.
- Clinton J. D. (1971). Biological techniques in electron microscopy. International Textbook Series. Florida. USA. Pag. 63.
- Cotter P. D., Hill C. y Ross R. P. (2005). Bacteriocin: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 3: 777 – 788.
- Crandall A.D. y Montville T. J. (1998). Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (1): 231 – 237.
- Chatterjee C, Paul M, Xie L. y van der Donk W. (2005). Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chemical Review*. 105: 633 – 683.
- Chen H. y Hoover D.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2: 82 – 100.
- Chikindas M. L, García-Garcera M.J., Driessen A.J.M., Ledebøer M. A., Nissen-Meyer J., Nes I.F., Abee T., Konings W.N. y Venema G. (1993). Pediocin PA-1, a bacteriocin from

- Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (11): 3577 – 3584.
- Chikindas M. L, Chi-Zhang Y. y Yam K. L. (2004). Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. *International Journal of Food Microbiology*. 90: 15 - 22.
- Farber M. y Peterkin L. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food – borne pathogen. *Microbiological Reviews*. 55 (3): 476 – 511.
- Faruk B. T. y Bibek R. (1996). Lactic acid bacteria. Editorial Springer. Berlin Heidelberg. Alemania. Pag. 137 – 203.
- Gänzle M., Weber S. y Hammes W. (1999). Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*. 46: 207 – 217.
- Gao Y., Belkum M. y Stiles M. (1999). The outer membrane of gram-negative bacteria inhibits antibacterial activity of brochocin-C. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (10): 4329 – 4333.
- Garrigues C., Loubiere P., Lindley N. y Cocaigh-Bousquet M. (1997). Control of the shift from homolactic acid to mixed acid fermentation in *Lactococcus lactis*: Predominant role of the NADH/NAD<sup>+</sup>. *Journal of Bacteriology*. 179 (17): 5282 – 5287.
- González Martínez B.E., Gómez Treviño M. y Jiménez Salas Z. (2003) Bacteriocinas de Prebióticos. Revista Salud Pública y Nutrición. Vol. 4 Núm 2.  
<http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/in/2/ensayos/bacteriocinas.htm>
- Gravesen A., Jydegaard A., Mendes J., Hansen T. y Knøchel S. (2002a). Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness cost in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (2): 756 – 764.
- Gravesen A., Ramnath M., Rechinger B., Andersen N., Jänsch L-. Héchard Y., Hastings J.W. y Knøchel S. (2002b). High – level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*. 148: 2361 – 2369.
- Guyonnet D., Fremaux C., Cenatiempo Y. y Berjeaud J.M. (2000). Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (4): 1744 – 1748.
- Harris L.J., Daeschel M.A., Stiles M.E. y Klaenhammer T.R. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 52 (6): 384 – 387.
- Héchard Y. y Sahl H.G. (2002). Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from gram-positive bacteria. *Biochimie*. 84: 545 – 557.
- Hernández Cruza P.E. (2003). Bacterias lácticas productoras de bacteriocinas. Universidad Complutense de Madrid.  
[http://www.ucm.es/info/otri/complutecno/fichas/tec\\_p Hernandez2.htm](http://www.ucm.es/info/otri/complutecno/fichas/tec_p Hernandez2.htm) Fecha de consulta 17/10/2003.

- Hernández Hernández E. (2004). Efecto antioxidante de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y de salvia (*Buddleia perfoliata* Kunth) en una pasta de carne cruda de cerdo. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México. D.F.
- Hernández López J.C. (2002). Caracterización parcial de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México. D.F.
- Hernández P.E., Cintas L., Fernández F. Herranz C., Criado R., Gutiérrez J., y Cinti R. (2003). Caracterización bioquímica, inmunológica y genética, actividad antimicrobiana y modo de acción de bacteriocinas (péptidos antimicrobianos) producidas por bacterias lácticas de origen alimentario. <http://www.ucm.es/info/nutricio/lineas/ehernan.htm>. Fecha de consulta 28/02/2004.
- Katla T., Netersatd K., Vancanneyt M., Swings J. y Axelsson L. (2003). Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to Sakacin P, Sakacin A, Pediocin PA-1, and Nisin. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (8): 4431 – 4473.
- Larsen G., Vogensen F. y Josephsen J. (1993). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* M1401. *Journal of Applied Bacteriology*. 75: 113 – 122.
- Madigan M, Martinko J y Parker J. (1998). Brock Biología de los microorganismos. Prentice Hall. 8ª edición. Madrid. Pág. 68 – 69, 406 – 407, 514 – 515.
- Marín I.F., Mendoza Y.M., Abellan L.O. y Carrion O.J. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria in Spanish soft cheese made with *Lactococcus lactis* subsp *diacetylactis*. *Journal of Food Safety*. 19 (3): 161 – 170.
- Mastronicolis S.K., German J.B., Megaulas N., Petrou E., Foka P. y Smith G.M. (1998). Influence of cold shock on the fatty-acid composition of different lipid classes of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*. 15: 299 – 306.
- Mastronicolis S.K., Arvanitis N., Karaliota A., Litos C y Stavroulakis G. (2005). Cold dependence of fatty acid profile of different lipid structures of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*. 22: 213 – 219.
- Mazzotta A.S y Montville T.J. (1997). Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10°C and 30°C. *Journal of Applied Microbiology*. 82: 32 – 38.
- Merino L., Hrefñuk G. Alonso J. y Ronconi M. (2000). Dotación plasmática y bacteriocinotipo en *Shigella* spp. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. México. Pag. 1-4.
- Minor Pérez H. (2004). Caracterización bioquímica y espectro de inhibición microbiana de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus bruchneri* y *Lactobacillus paracasei*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana. México. D.F.

- Montville T.J. y Chen Y. (1998). Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50: 511 – 519.
- Moroni O., Kheadr E., Lacroix C. y Fliss I. (2005). Sensitivity of food-borne *Listeria monocytogenes* to antibiotics and a bacteriocin-like molecule produced by the new subspecies *Bifidobacterium thermophilum subsp. infantis* RBL 67. Cartel del 8<sup>th</sup> Simposium de Bacterias Lácticas. The Netherlands Holanda.
- Murray M. y Richard J.A. (1997). Comparative study of the antilisterial activity of nisin A and pediocin AcH in fresh ground pork stored aerobically ay 5°C. *Journal of Food Protection*. 60 (2): 1534 – 1540.
- Mustapha A., Ariyapitipun T. y Clarke A. (2002). Survival of *Escherichia coli* 0157:H7 on vacuum – packaged raw beef treated with polylactic acid lactic acid and nisin. *Journal of Food Science*. 67 (1): 262 – 266.
- Olivera M., Zarelli V., Pappano N. y Debattista N. (2001). A comparative study of bacteriostatic activity of synthetic hidroxyolated flavonoids. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32: 229 – 232.
- Padgett T, Han I. y Dawson P. (1998). Incorporation of Food-Grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. *Journal of Food Protection*. 61 (10): 1330 – 1335.
- Parente E. y Ricciardi A. (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52: 628 – 638.
- Price F. J. y Schweigert S. B. (1994). Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. Editorial Acribia. Zaragoza España. Pág. 369 – 371.
- Postma P., Lengeler J. y Jacobson R. (1993). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. *Microbiology Review*. 57 (3): 543 – 594.
- Pucci M., Vedamuthu E., Kunka B. y Vandenberg P. (1988). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Applied and Environmental Microbiology*. 54 (10): 2349 – 2353.
- Quintero S.B., Vernon-Carter J., Guerrero-Legarreta I. y Ponce-Alquicira E. (2005). Incorporation of the antilisterial bacteriocin-like inhibitory substance from *Pediococcus parvulus* VKMX133 into film-forming protein matrices with different hidrophobicity. *Journal of Food Science*. 70 (9): 398 – 403.
- Ramnath M, Beukes M., Tamura K y Hastings W (2000). Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme Iiab component in a leucocin A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (7): 2098 – 3101.
- Schillinger U., Cheng H., Keppler K. y Holzapfel W. (1998). Use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria to inhibit spontaneous nisin-resistan mutant of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Microbiology*. 85: 657 – 663.

- Schneider R., Fernández F.J., Aguilar M.B., Guerrero-Legarreta I., Alpuche-Solís A. y Ponce-Alquicira E. (2006). Partial characterization of a class II pediocin produced by *Pediococcus parvulus* 133 strain isolated from meat (Mexican "chorizo"). *Food Control*. En prensa.
- Tu L. y Mustapha A. (2002). Reduction of *Brochothrix thermosphacta* and *Salmonella serotype typhimurium* on vacuum – packaged fresh beef treated with nisin and nisin combined with EDTA. *Journal of Food Science*. 67 (1): 302 - 306.
- Vadyvaloo V., Hasting J.W., Merwe M. y Rautenbach M. (2002). Membrane of class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased level of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (11): 5223 – 5230.
- Vadyvaloo V., Arous A., Gravesen A., Hécharde Y., Chauhan-Haubrock R., Hasting J. y Rautenbach M. (2004a). Cell-surface alterations in class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology*, 150: 3025 – 3033.
- Vadyvaloo V., Snoep J. L., Hastings J. y Rautenbach M. (2004b). Physiological implications of class IIa bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology*, 150: 335 – 340.
- Verheul A., Russell N., Hof R., Rombouts F. y Abbe T. (1997), Modifications of membrane phospholipids composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (9): 3451 – 5357.
- Yang R, Johnson MC y Ray B (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 3355-3359.
- Yin L., Wu C. y 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. y Jiang S. (2004). Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (5): 1146 – 1151.

## 11. ANEXOS

### ANEXO A

#### A. Compuestos, medios de cultivo y equipos empleados

**Tabla A.1.** Composición del medio CGB modificado para el cultivo de *Pediococcus parvulus* (Hernández López, 2002).

Compuesto	Gramos / Litro	Procedencia
Peptona biotriptasa	20	BD Bioxon Becton Dickinson de México
Glucosa	10	BD Bioxon Becton Dickinson de México
Extracto de levadura	5	BD Bioxon Becton Dickinson de México
Citrato de amonio	2	J.T. Baker, México
Fosfato disódico	2	J.T. Baker, México
Sulfato de magnesio	0.1	J.T. Baker, México
Sulfato de manganeso	0.05	J.T. Baker, México
Tween 80	4 mL	Hycel, México

**Tabla A.2.** Fuente de reactivos y medios de cultivo empleados.

Reactivo/ medio de cultivo	Procedencia
Fosfato monosódico	J.T. Baker, México
Ácido fosfórico	J.T. Baker, México
NaOH	J.T. Baker, México
Ácido sulfúrico	J.T. Baker, México
Hexano	J.T. Baker, México
Cloroformo	J.T. Baker, México
Metanol	J.T. Baker, México
Trifluoruro de boro	
BHI, infusión cerebro corazón	Bioxon Becton Dickinson de México
Agar bacteriológico	Bioxon, Becton Dickinson de México

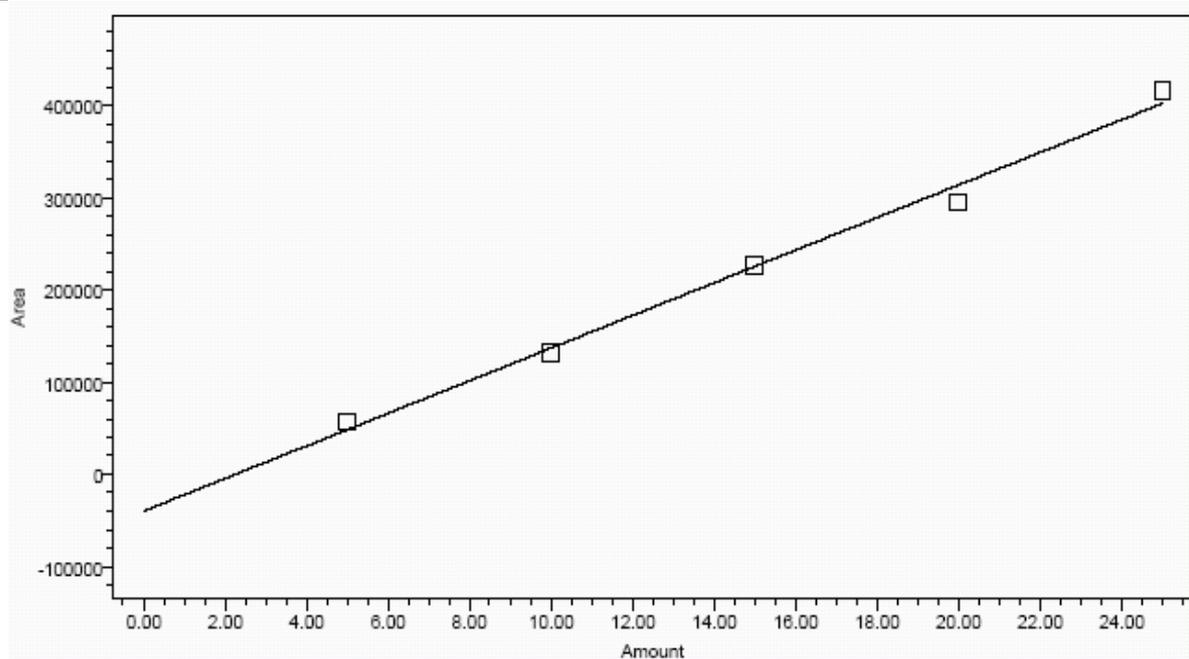
**Tabla A.3.** Modelo de cada equipo empleado.

<b>Equipo</b>	<b>Modelo</b>
Ultracongelador	Revco Scientific Inc, Asheville N.C, EUA
Potenciómetro	pH Meter, Beckman $\Phi$ 50, EUA
Centrífuga	J2 – M1 Beckman, EUA
Liofilizadora	Freeze Dry System, Freezone 4.5, Labconco corporation, Kansas City, Missouri, EUA
Espectrofotómetro	Beckman Du <sup>®</sup> 650, EUA
Micro-centrífuga	Eppendorf Centrifuge 5415 D, Germany
Sonicador	Branson 5210, Branson <sup>®</sup> Ultrasonic Co., Danbury EUA
Rotaevaporador	Buchi 461 Water Bath, Switzerland

## ANEXO B

### B. Curvas de calibración de HPLC.

Processing Method:	IRPDA	Project Name:	Water
Processing Method ID:	1991	System:	IRPDA
Calibration ID:	1992	Proc. Channl. Descr.:	ACIDOS ORGANICOS



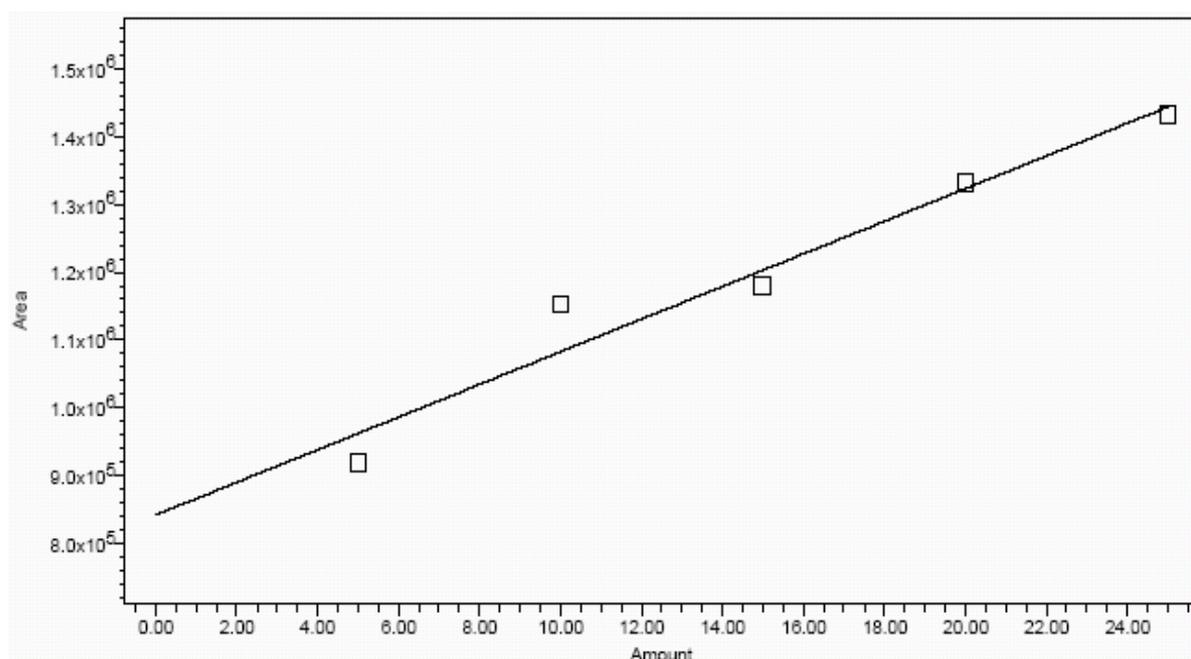
**Figura B.1.** Curva de calibración de ácido láctico.

Datos de la curva de calibración: Tiempo de retención 13.592 min, R: 0.995740, R<sup>2</sup>: 0.991497, Ecuación  $Y = 1.77e+004 X - 4.00e+004$ .

**Tabla B.1.** Áreas obtenidas para cada concentración de ácido láctico.

Concentración mM	Área	Concentración calculada
5	56769.358	5.471
10	131166.801	9.675
15	226695.944	15.074
20	295202.536	18.945
25	417134.918	25.836

Processing Method:	IRPDA	Project Name:	Water
Processing Method ID:	1991	System:	IRPDA
Calibration ID:	1992	Proc. Channl. Descr.:	ACIDOS ORGANICOS



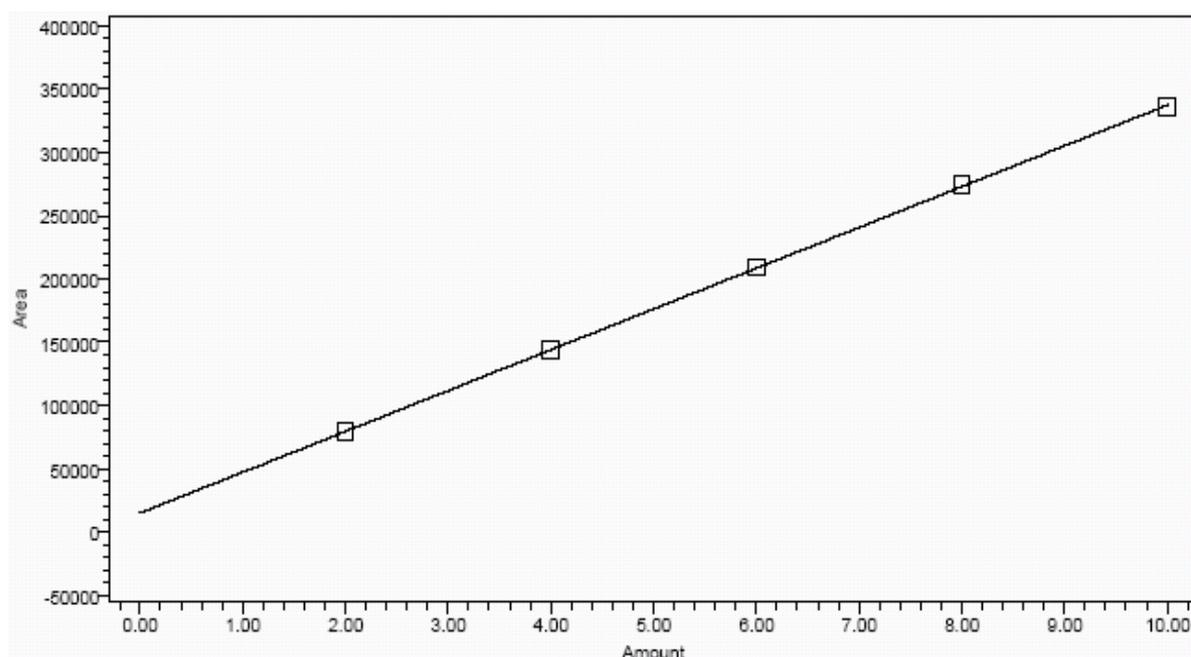
**Figura B.2.** Curva de calibración de ácido pirúvico.

Datos de la curva de calibración: Tiempo de retención 15.398 min, R: 0.975271, R<sup>2</sup>: 0.951154, Ecuación:  $Y = 2.40e+004 X + 8.42e+005$ .

**Tabla B.2.** Áreas obtenidas para cada concentración de ácido pirúvico.

Concentración mM	Área	Concentración calculada
5	919686.541	3.234
10	1151924.867	12.892
15	1178872.271	14.012
20	1331597.900	20.363
25	1431043.745	24.499

Processing Method:	IRPDA	Project Name:	Water
Processing Method ID:	1991	System:	IRPDA
Calibration ID:	1992	Proc. Channl. Descr.:	ACIDOS ORGANICOS



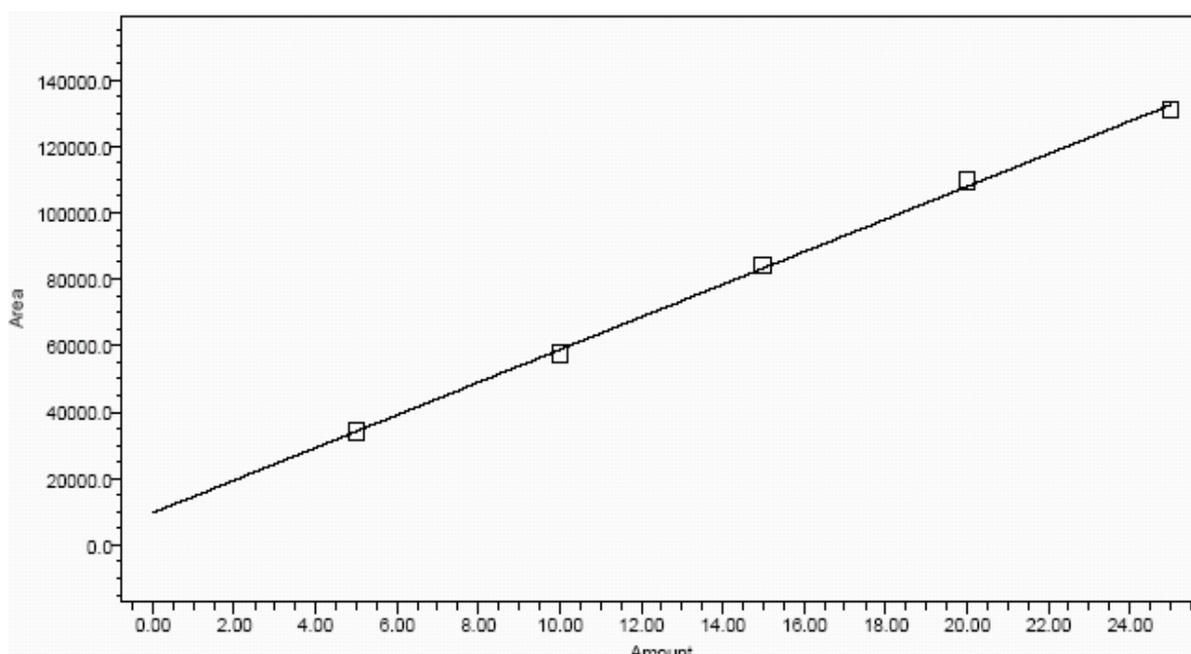
**Figura B.3.** Curva de calibración de glucosa.

Datos de la curva de calibración: Tiempo de retención 21.110 min, R: 0.999951, R<sup>2</sup>: 0.999902, Ecuación:  $Y = 3.22e+004 X + 1.51e+004$ .

**Tabla B.3.** Áreas obtenidas para cada concentración de glucosa.

Concentración mM	Área	Concentración calculada
2	79494.889	1.998
4	143215.311	3.975
6	209243.392	6.023
8	274197.218	8.039
10	336287.019	9.965

Processing Method:	IRPDA	Project Name:	Water
Processing Method ID:	1991	System:	IRPDA
Calibration ID:	1992	Proc. Channl. Descr.:	ACIDOS ORGANICOS



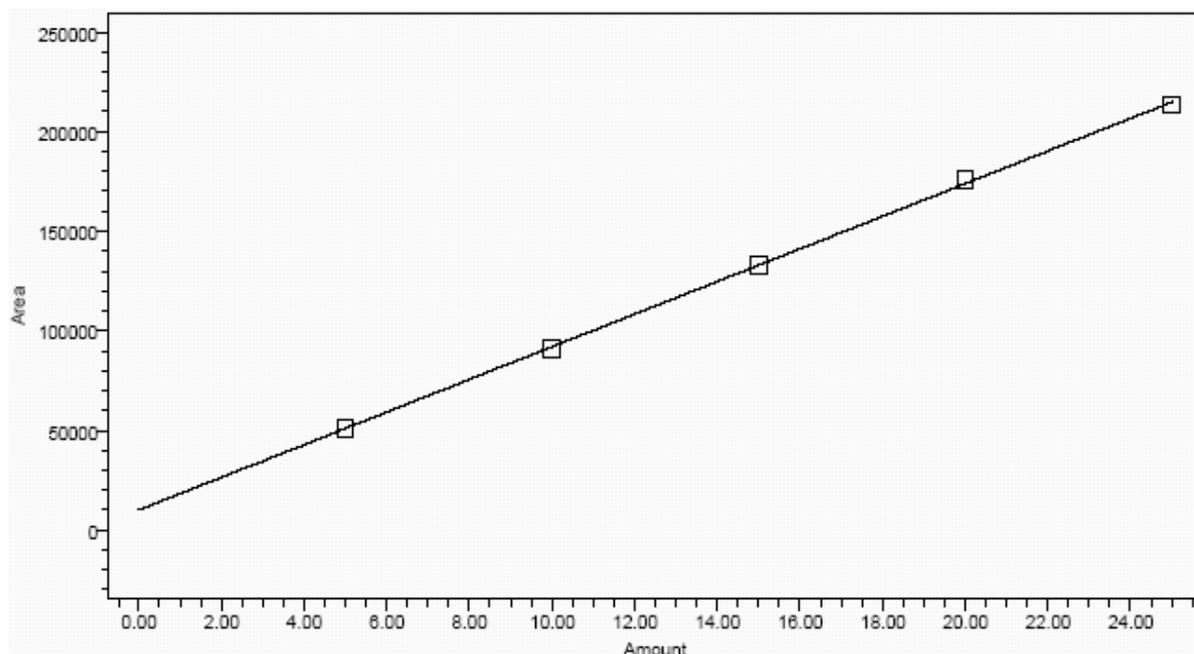
**Figura B.4.** Curva de calibración de ácido acético.

Datos de la curva de calibración: Tiempo de retención 22.315 min, R: 0.999369, R<sup>2</sup>: 0.998739, Ecuación  $Y = 4.91e+003 X + 9.68e+003$ .

**Tabla B.4.** Áreas obtenidas para cada concentración de ácido acético.

Concentración mM	Área	Concentración calculada
5	34305.955	5.017
10	57448.082	9.733
15	84236.591	15.191
20	109555.313	20.350
25	130946.145	24.709

Processing Method:	IRPDA	Project Name:	Water
Processing Method ID:	1991	System:	IRPDA
Calibration ID:	1992	Proc. Channl. Descr.:	ACIDOS ORGANICOS



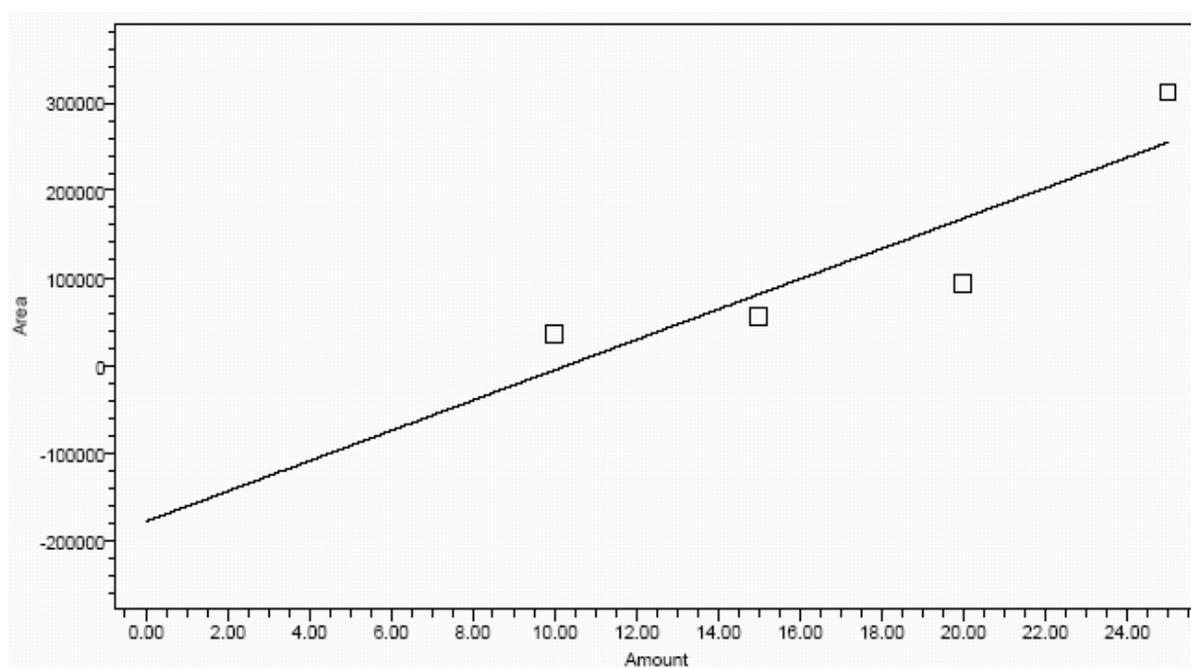
**Figura B.5.** Curva de calibración de ácido fórmico.

Datos de la curva de calibración: Tiempo de retención 24.733 min, R: 0.999771, R<sup>2</sup>: 0.999542, Ecuación:  $Y = 8.19e+003 X + 1.02e+004$

**Tabla B.5.** Áreas obtenidas para cada concentración de ácido fórmico.

Concentración mM	Área	Concentración calculada
5	34305.955	5.017
10	57448.082	9.733
15	84236.591	15.191
20	109555.313	20.350
25	130946.145	24.709

Processing Method:	IRPDA	Project Name:	Water
Processing Method ID:	1991	System:	IRPDA
Calibration ID:	1992	Proc. Channl. Descr.:	ACIDOS ORGANICOS

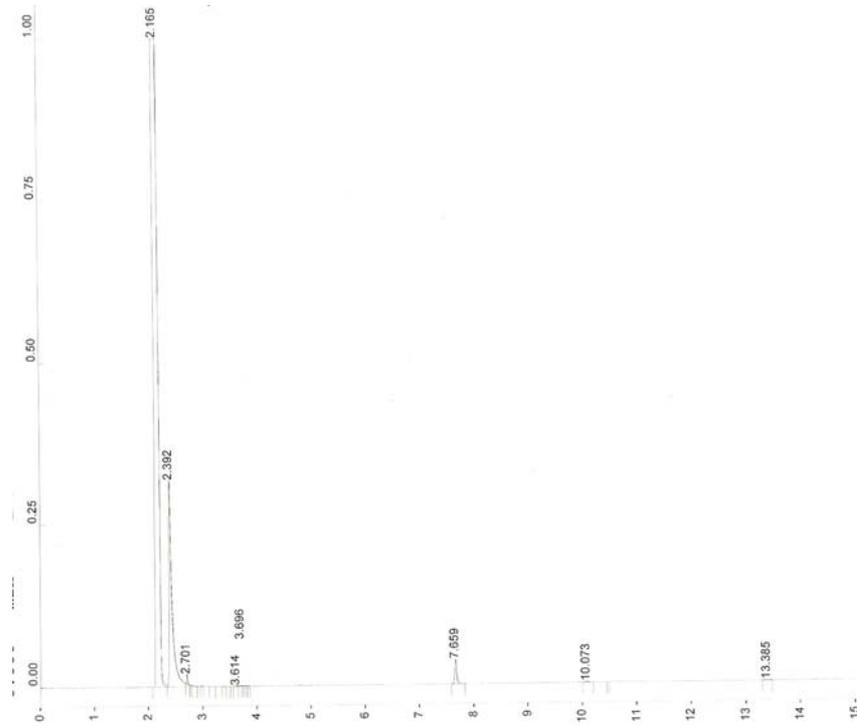
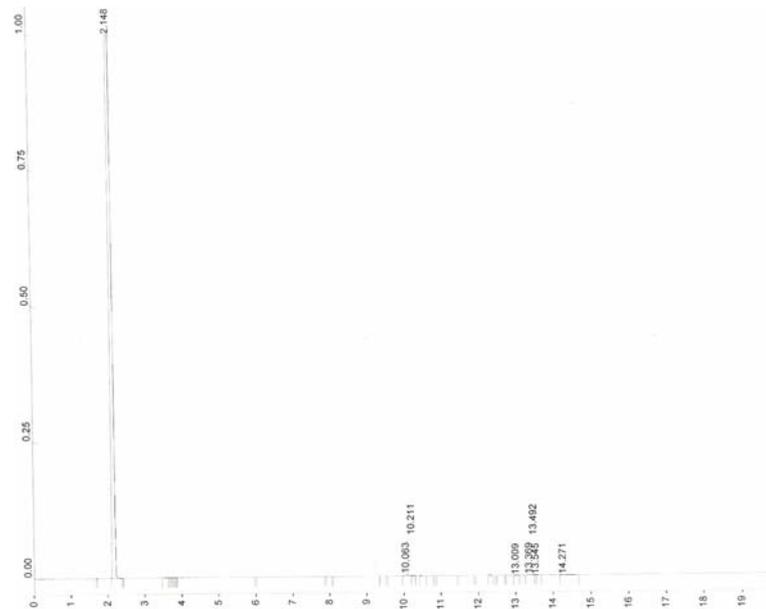


**Figura B.6.** Curva de calibración de etanol.

Datos de la curva de calibración: Tiempo de retención 34.512 min, R: 0.878386, R<sup>2</sup>: 0.771562, Ecuación:  $Y = 1.73e+004 X - 1.79e+005$ .

**Tabla B.6.** Áreas obtenidas para cada concentración de etanol.

Concentración mM	Área	Concentración calculada
10	35625.955	12.375
15	56444.039	13.576
20	93647.441	15.724
25	311950.620	28.325

**ANEXO C****C. Cromatogramas de los estándares de los ácidos grasos.****Figura C.1.** Cromatograma del ácido mirístico**Figura C.2.** Cromatograma del ácido palmítico

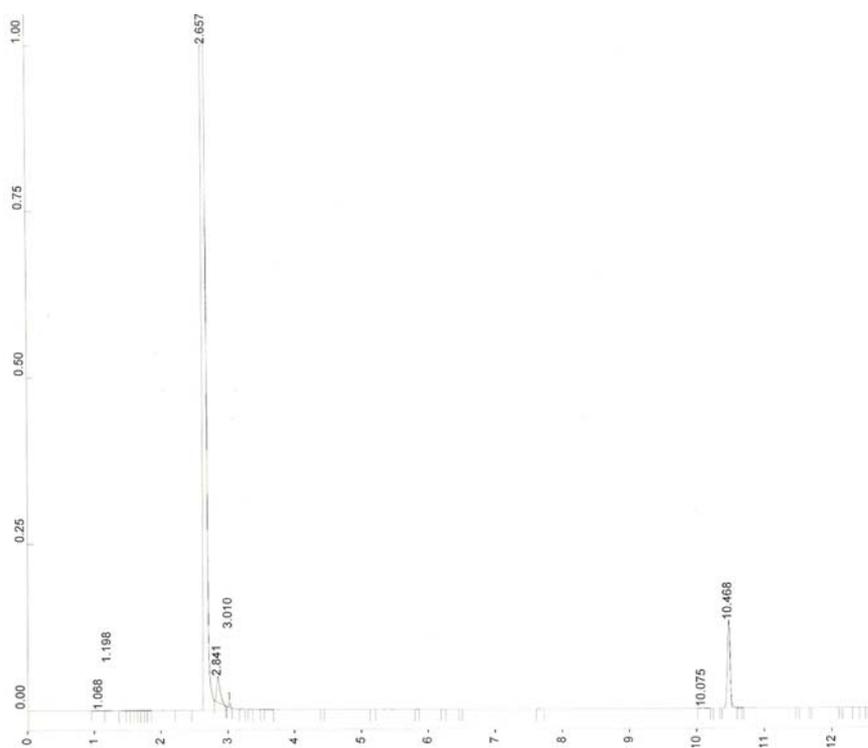


Figura C.3. Cromatograma del ácido palmitoleico

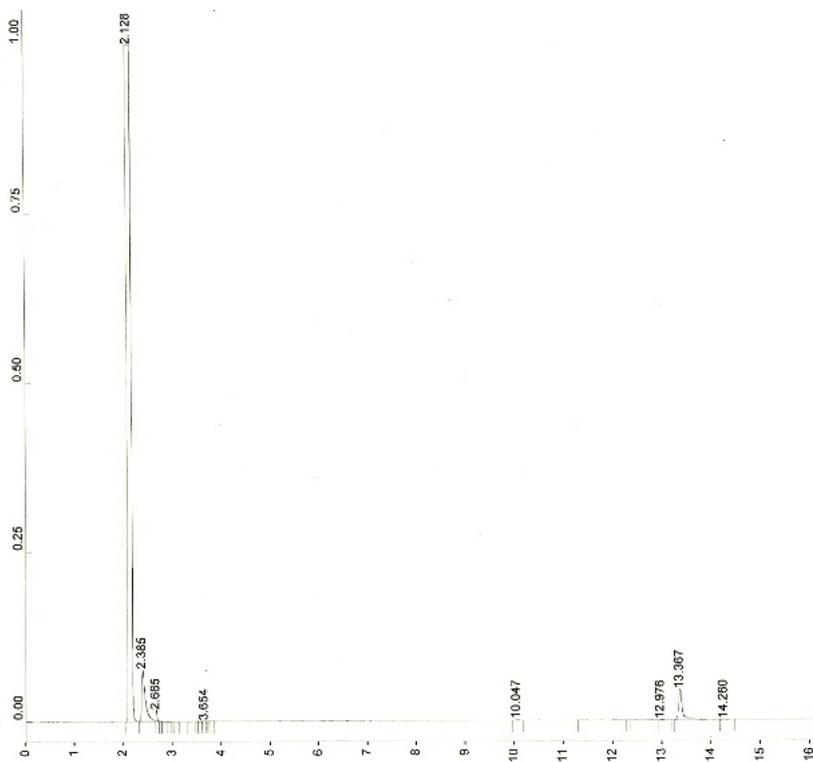


Figura C.4. Cromatograma del ácido oleico

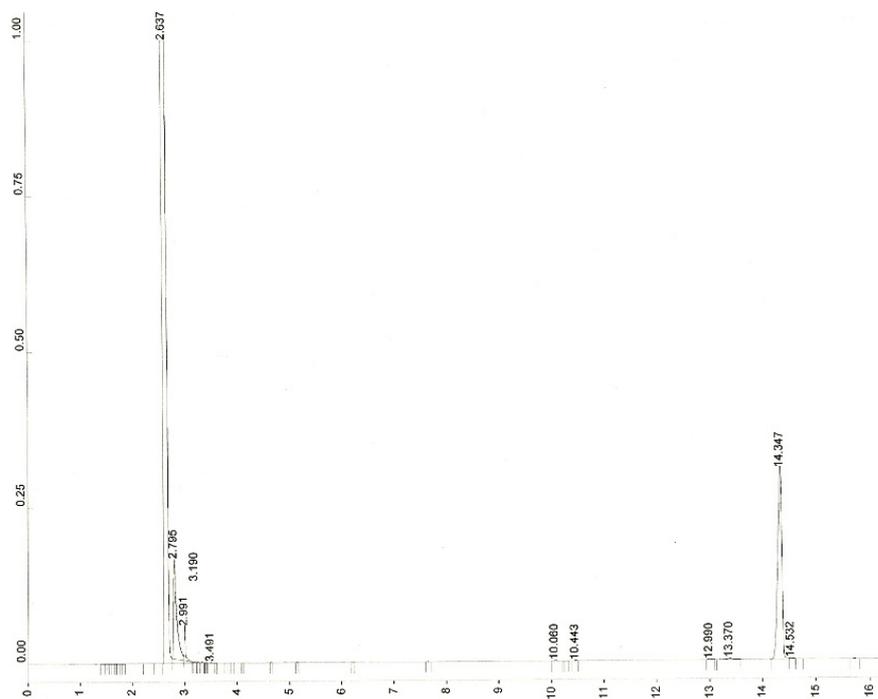


Figura C.5. Cromatograma del ácido linoleico

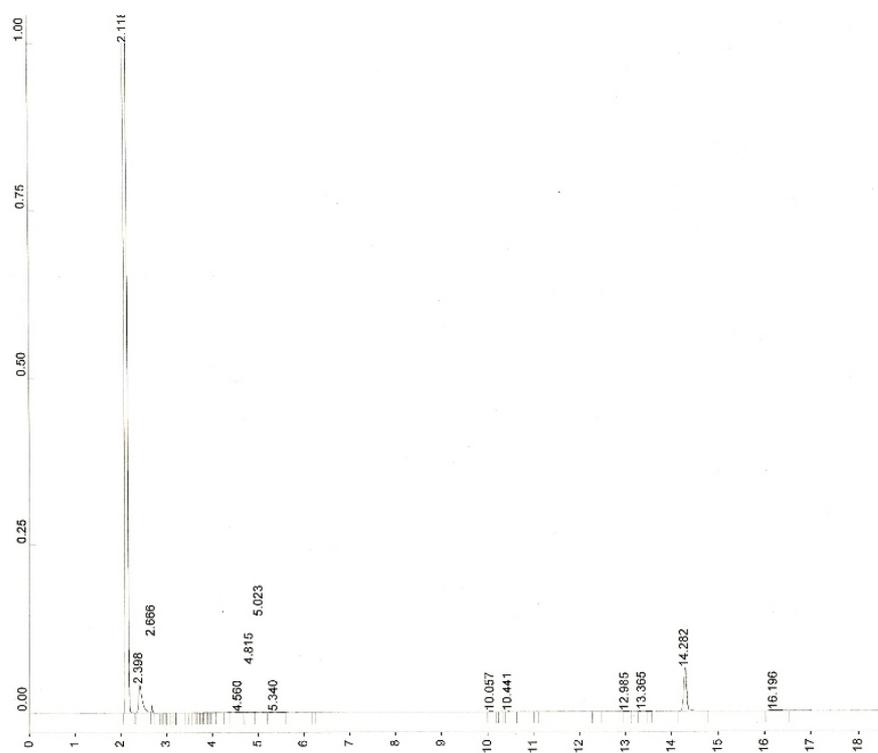


Figura C.5. Cromatograma del ácido linolénico

## ANEXO D

### D. Perfiles de lípidos totales de las cepas de *Listeria*.

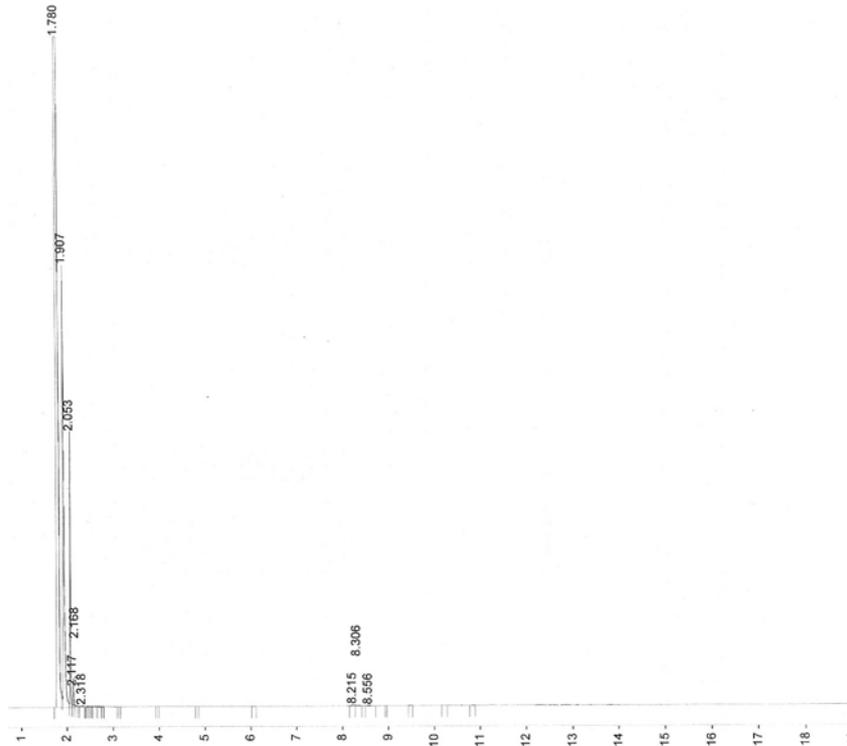


Figura D.1. Perfil de lípidos totales de *Listeria monocytogenes* Scott A testigo

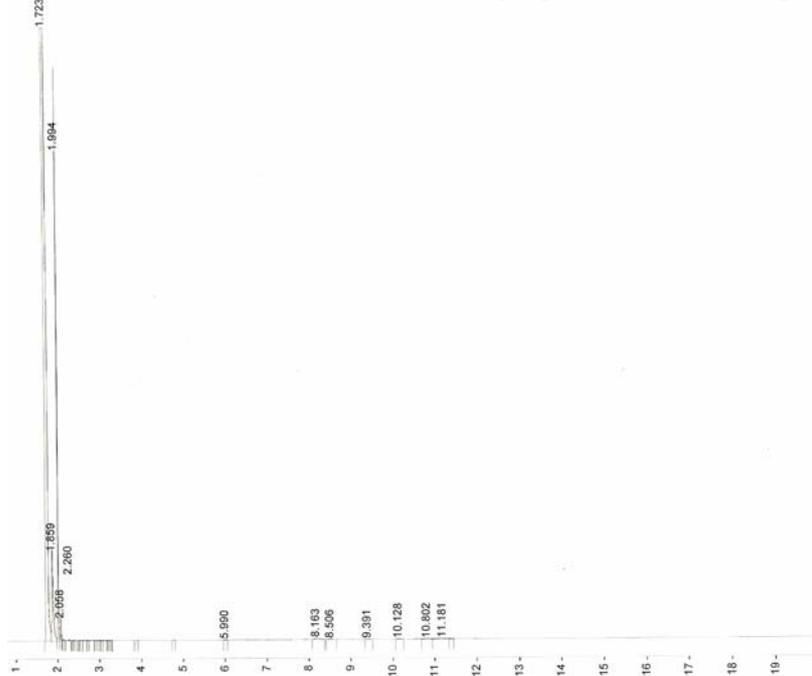


Figura D.2. Perfil de lípidos totales de *Listeria monocytogenes* Scott A resistente

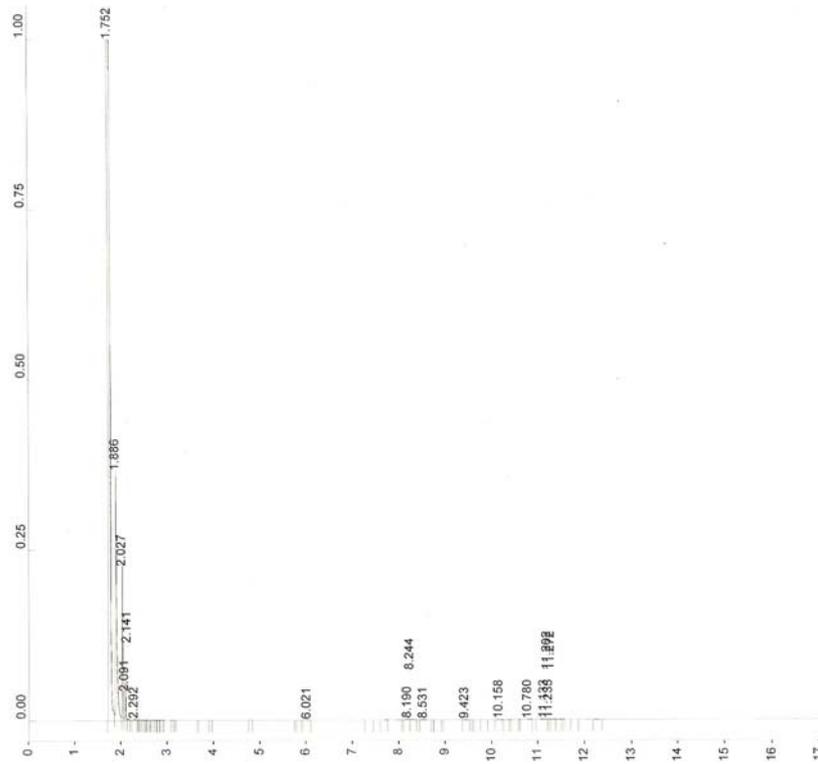


Figura D.3. Perfil de lípidos totales de *Listeria monocytogenes* LM 82 testigo

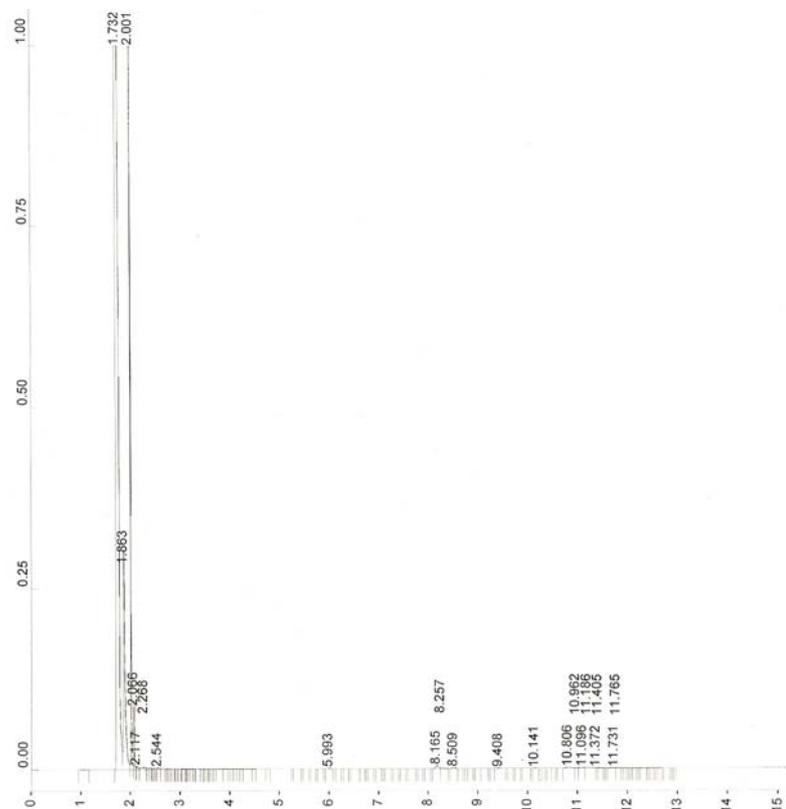


Figura D.4. Perfil de lípidos totales de *Listeria monocytogenes* LM 82 resistente

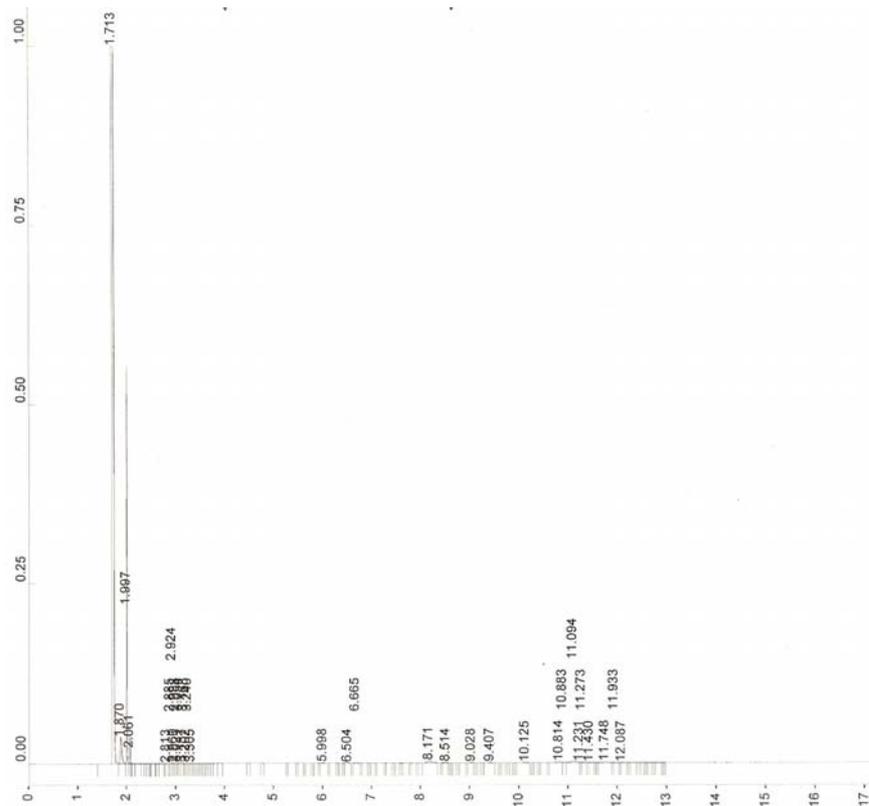


Figura D.5. Perfil de lípidos totales de *Listeria monocytogenes* LMB 911204/47 testigo

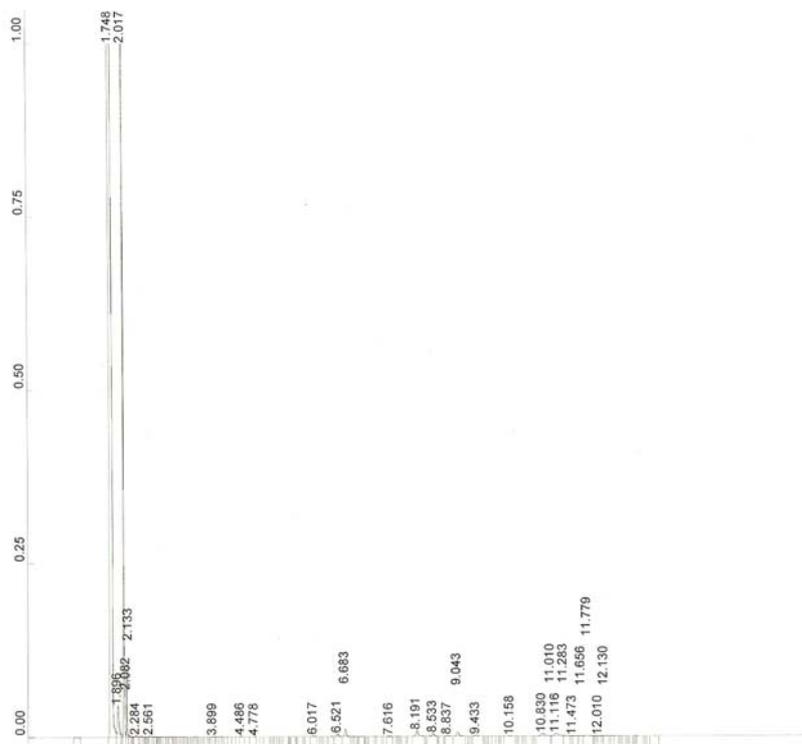


Figura D.6. Perfil de lípidos totales de *Listeria monocytogenes* LMB 911204/47 resistente

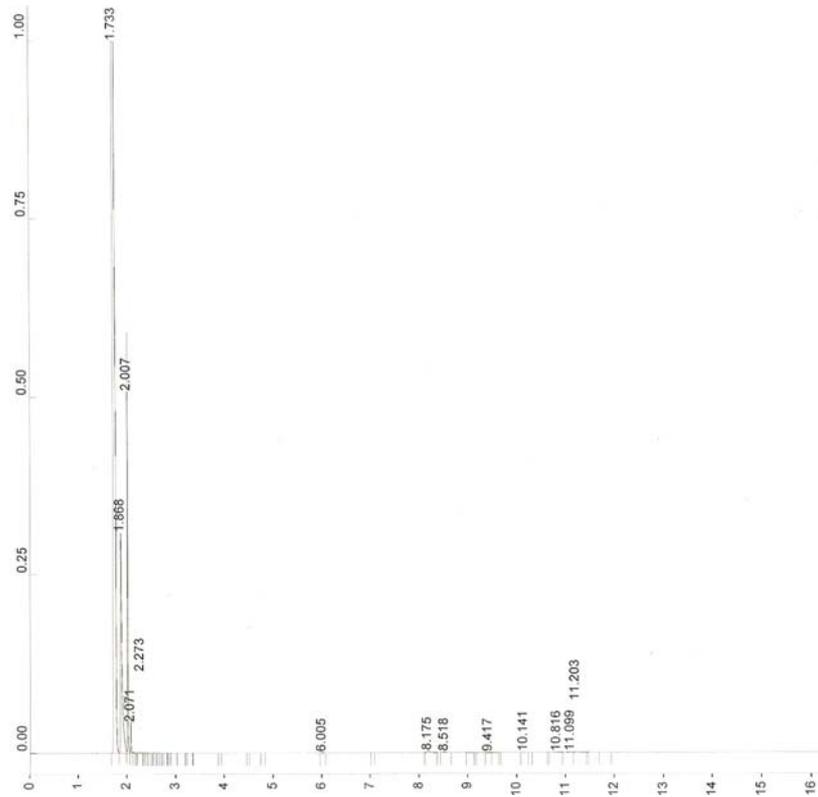


Figura D.7. Perfil de lípidos totales de *Listeria monocytogenes* LMB 92000/48 testigo

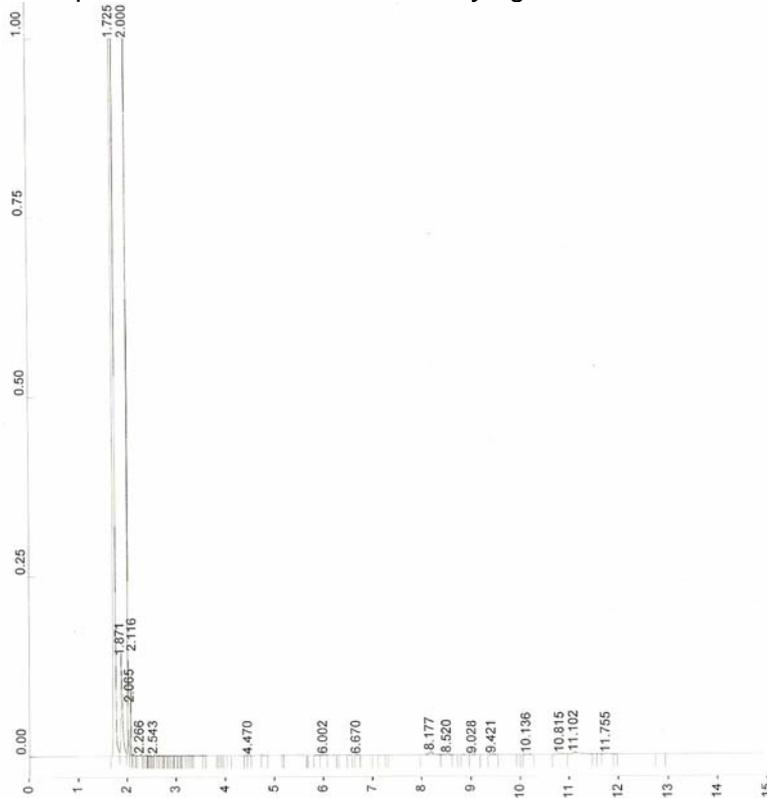


Figura D.8. Perfil de lípidos totales de *Listeria monocytogenes* LMB 92000/48 resistente

## ANEXO E

## E. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS (NCSS).

Tabla E.1. Prueba de ANOVA para evaluar la DO y la concentración de pediocina.

Cepa	Variable		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Sig.P> ( $\alpha=0.05$ )
<i>Listeria innocua</i> ATCC33090	DO	Entre grupos	4	0.709	0.177	1.106	0.005
		Dentro de grupos	85	13.626	0.160		
		Total	89	14.336			
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	DO	Entre grupos	4	1.485	0.371	2.079	0.091
		Dentro de grupos	85	15.180	0.179		
		Total	89	16.665			
<i>Listeria monocytogenes</i> LM 82	DO	Entre grupos	4	0.306	7.661E-02	0.462	0.000
		Dentro de grupos	85	14.098	0.166		
		Total	89	14.404			
<i>Listeria monocytogenes</i> LMB 911204/47	DO	Entre grupos	4	0.429	0.107	0.633	0.000
		Dentro de grupos	85	14.395	0.169		
		Total	89	14.824			
<i>Listeria monocytogenes</i> LMB 92000/48	DO	Entre grupos	4	0.754	0.188	1.100	0.001
		Dentro de grupos	85	14.565	0.171		
		Total	89	15.319			