



---

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

---

**Aspectos de seguridad de *Enterococcus faecium* MXVK29 y  
*Enterococcus faecalis* MXVK22 aislados de productos cárnicos y  
caracterización molecular de sus bacteriocinas.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA  
P R E S E N T A:

**M. EN B. YENIZEY MERIT ÁLVAREZ CISNEROS**

**DIRECTOR DE TESIS:**

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA.

**CO-DIRECTOR DE TESIS:**

DR. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO.

**ASESORES:**

DRA. CARMEN WACHER RODARTE.

DRA. TERESITA DEL ROSARIO SAINZ ESPUÑES.

**México, D.F., Marzo de 2011**

---

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT con la referencia 001466.

La presente tesis de doctorado forma parte del proyecto titulado “Caracterización molecular de bacteriocinas y su inclusión en el diseño de empaques biodegradables con actividad antimicrobiana”, apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, SEP-CONACYT con el número de registro 2008-105870.

---

Iztapalapa, D.F., a 25 de Marzo de 2011

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

**Aspectos de seguridad de *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Enterococcus faecalis* MXVK22 aislados de productos cárnicos y caracterización molecular de sus bacteriocinas.**

que presentó:

**M. EN B. YENIZEY MERIT ÁLVAREZ CISNEROS**

**Comité Tutorial:**

**Director:** Dra. Edith Ponce Alquicira  
Biotecnología, UAMI


**Co-Director:** Dr. Francisco José Fernández Perrino  
Biotecnología, UAMI

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

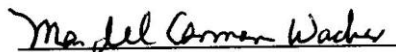
**Asesor:** Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes  
Dpto. Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco

**Jurado:**

**Presidente:** Dr. Octavio Loera Corral  
Dpto. Biotecnología, UAM-Iztapalapa



**Secretario:** Dra. María del Carmen Wachter Rodarte  
Facultad de Química, UNAM



**Vocal:** Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes  
Dpto. Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco



**Vocal:** Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez  
Dpto. Atención a la Salud, UAM-Xochimilco



---

*DEDICATORIA:*

*A mis padres por su amor y apoyo incondicional*

*Esther Cisneros Santos  
e  
Ignacio Alvarez Salgado*

*A mis hermanos que siempre están cuando los necesito,*

*Abraham, Isaac y Miriam.*

*A Luis el amor de mi vida,  
que siempre me ha apoyado como mi mano derecha.*

*Finalmente a esa pequeña personita que llego a mi vida,  
y me enseñó lo bello que es despertar todos los días  
a pesar del cansancio y los problemas  
a cambio de ver su gran sonrisa.*

*Mi hijo Leonardo*

*Muchas gracias por todo, los amo.*

# Índice general

| <b>Contenido</b>                                    | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| Índice general.....                                 | iv            |
| Índice de tablas.....                               | viii          |
| Índice de figuras.....                              | x             |
| Resumen.....  | xiii          |
| Abstract.....                                       | xv            |
| <br>  |               |
| <b>1. JUSTIFICACIÓN.....</b>                        | <b>1</b>      |
| <b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>                         | <b>2</b>      |
| 2.1 EL GÉNERO <i>Enterococcus</i> .....             | 2             |
| 2.2 ASPECTOS DE SEGURIDAD DE ENTEROCOCOS.....       | 2             |
| 2.2.1 Factores de virulencia .....                  | 3             |
| 2.2.2 Resistencia a antibióticos.....               | 4             |
| 2.2.3 Producción de aminas biogénicas.....          | 6             |
| 2.3 ENTEROCOCOS Y BIOCONSERVACIÓN DE ALIMENTOS..... | 7             |
| 2.3.1 La conservación de los alimentos.....         | 7             |
| 2.3.2 Enterococos como cultivos iniciadores .....   | 9             |
| 2.3.2.1 Carne y derivados cárnicos .....            | 10            |
| 2.3.2.2 Queso.....                                  | 11            |
| 2.3.3 Enterococos como probióticos .....            | 11            |
| 2.3.4 Enterocinas. ....                             | 12            |
| 2.3.4.1 Aplicación de enterocinas en alimentos..... | 13            |
| 2.3.4.2 Clasificación de las enterocinas.....       | 16            |
| 2.3.4.3 Mecanismos de acción.....                   | 18            |
| 2.3.4.4 Biosíntesis de bacteriocinas.....           | 21            |
| 2.4 RESISTENCIA A BACTERIOCINAS.....                | 22            |
| <b>3. ANTECEDENTES.....</b>                         | <b>24</b>     |
| <b>4. HIPÓTESIS.....</b>                            | <b>26</b>     |

---

|   |    |
|---|----|
| <b>5. OBJETIVOS</b> .....   | 26 |
| 5.1 OBJETIVO GENERAL.....   | 26 |
| 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....   | 26 |
| <b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | 27 |
| 6.1 METODOLOGÍA GENERAL.....  | 27 |
| 6.2 CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....   | 28 |
| 6.3 EXTRACCIÓN DE LA ENTEROCINA.....  | 29 |
| 6.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA.....  | 29 |
| 6.5 CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE ENTEROCINAS.....  | 30 |
| 6.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.....                                       | 30 |
| 6.6.1 Perfil de crecimiento de <i>Listeria</i> sp. en presencia<br>de la bacteriocina.....          | 30 |
| 6.6.2 Obtención de un modelo matemático para determinar la<br>concentración mínima inhibitoria..... | 31 |
| 6.7 OBTENCIÓN DE CEPAS RESISTENTES A LA BACTERIOCINA.....   | 32 |
| 6.7.1 Perfil genómico de cepas silvestres y resistentes de<br><i>Listeria</i> sp.....               | 32 |
| 6.7.1.1 Preparación del ADN genómico.....   | 34 |
| 6.7.1.2 Digestión de ADN genómico.....  | 35 |
| 6.7.1.3 Electroforesis en campo pulsado.....  | 35 |
| 6.7.1.4 Análisis de los patrones de PFGE.....   | 35 |
| 6.8 ASPECTOS DE SEGURIDAD DE CEPAS DE ENTEROCOCOS.....  | 36 |
| 6.8.1 Extracción de ADN.....  | 36 |
| 6.8.2 Detección de factores de virulencia por PCR.....  | 36 |
| 6.8.2.1 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR).....  | 36 |
| 6.8.3 Determinación de la susceptibilidad a antibióticos.....                                       | 38 |
| 6.8.3.1 Método de difusión en agar.....   | 38 |
| 6.8.3.2 Determinación por PCR de la presencia de genes de<br>resistencia.....                       | 39 |
| 6.8.4 Determinación de la actividad amino-descarboxilasa.....                                       | 40 |
| 6.9 PURIFICACIÓN DE LA BACTERIOCINA.....  | 41 |

---

|  |           |
|--|-----------|
| 6.10 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA BACTERIOCINA.....   | 42        |
| 6.10.1 Identificación del extremo amino terminal.....  | 42        |
| 6.10.2 Identificación del gen estructural.....   | 43        |
| 6.10.3 Genes involucrados en la biosíntesis de la bacteriocina.....                              | 45        |
| 6.10.3.1 Diseño de cebadores .....   | 45        |
| 6.10.3.2 Construcción de librerías genómicas.....  | 46        |
| 6.10.3.3 Amplificación de genes adyacentes al gen estructural.....                               | 48        |
| <b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>  | <b>50</b> |
| 7.1 CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE ENTEROCINAS.....   | 50        |
| 7.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.....                                    | 52        |
| 7.2.1 Actividad antimicrobiana.....  | 52        |
| 7.2.2 Perfil de crecimiento de <i>Listeria</i> sp. en presencia de bacteriocina.....             | 53        |
| 7.2.3 Obtención de un modelo matemático para determinar la concentración mínima inhibitoria..... | 59        |
| 7.3 OBTENCIÓN DE CEPAS RESISTENTES A LA BACTERIOCINA.....  | 63        |
| 7.3.1 Perfil genómico de cepas silvestres y resistentes de <i>Listeria</i> sp.....               | 66        |
| 7.4 ASPECTOS DE SEGURIDAD DE CEPAS DE ENTEROCOCOS.....   | 69        |
| 7.4.1 Obtención de ADN genómico.....   | 69        |
| 7.4.2 Detección de factores de virulencia por PCR.....   | 71        |
| 7.4.2.1 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR).....                                       | 71        |
| 7.4.3 Determinación de la susceptibilidad a antibióticos.....                                    | 75        |
| 7.4.3.1 Método de difusión en agar.....  | 76        |
| 7.4.3.2 Determinación de genes de resistencia por PCR.....                                       | 77        |
| 7.4.4 Determinación de la actividad amino-descarboxilasa.....                                    | 80        |
| 7.5 PURIFICACIÓN DE LA BACTERIOCINA.....   | 81        |
| 7.6 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA BACTERIOCINA.....  | 83        |
| 7.6.1 Identificación del extremo amino terminal.....   | 83        |
| 7.6.2 Identificación del gen estructural.....  | 87        |

|  |            |
|--|------------|
| 7.6.3 Genes involucrados en la biosíntesis de la bacteriocina..... | 91         |
| <b>8. SÍNTESIS DE RESULTADOS.....</b>                              | <b>101</b> |
| <b>9. CONCLUSIONES.....</b>  | <b>104</b> |
| <b>10. PERSPECTIVAS.....</b>                                       | <b>105</b> |
| <b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>                                       | <b>106</b> |
| <b>ANEXO A.....</b>  | <b>118</b> |
| <b>ANEXO B.....</b>  | <b>121</b> |



## Índice de tablas

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>Tabla 1.</b> Comparación de los sistemas de clasificación para bacteriocinas producidas por BAL.....   | 19            |
| <b>Tabla 2.</b> Cepas de <i>Listeria</i> sp. utilizadas en el análisis de resistencia.....  | 28            |
| <b>Tabla 3.</b> Cebadores utilizados para PCR y productos para la detección de factores de virulencia.....  | 37            |
| <b>Tabla 4.</b> Cebadores utilizados para la detección de genes de resistencia.....   | 40            |
| <b>Tabla 5.</b> Cebadores utilizados para identificar bacteriocinas del género enterococos y características de las enterocinas.....  | 44            |
| <b>Tabla 6.</b> Cebadores utilizados para identificar genes involucrados en la biosíntesis de la bacteriocina.....  | 49            |
| <b>Tabla 7.</b> Parámetros estimados de las curvas de crecimiento de <i>Listeria</i> sp. en presencia de diferentes concentraciones de bacteriocina producida por <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29 y <i>Enterococcus faecalis</i> MXVK22..... | 58            |
| <b>Tabla 8.</b> Parámetros estimados del modelo matemático utilizado para determinar la concentración mínima inhibitoria de extracto crudo de bacteriocina contra cepas de <i>Listeria</i> sp.....  | 61            |
| <b>Tabla 9.</b> Resistencia a antibióticos por el método de difusión en disco.....  | 76            |
| <b>Tabla 10.</b> Comparación entre PCR y antibiogramas para determinar la resistencia a antibióticos.....   | 79            |
| <b>Tabla 11.</b> Producción de aminas biogénicas.....   | 81            |

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Tabla 12.</b> | Recuperación de bacteriocina en los diferentes pasos de purificación.....   | 82 |
| <b>Tabla 13.</b> | Bacteriocinas alineadas por similitud de aminoácidos con la bacteriocina 29 producida por <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29.....                                 | 86 |
| <b>Tabla 14.</b> | Comparación de la secuencia del extremo amino terminal de bacteriocinas de la clase IIa con la bacteriocina producida por <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29..... | 87 |
| <b>Tabla 15.</b> | Proteínas alineadas por similitud de aminoácidos con el fragmento amplificado mediante el kit comercial Genome Walker.....  | 96 |
| <b>Tabla 16.</b> | Alineamientos con mayor similitud a nivel operón de bacteriocinas encontradas en la base de datos del NCBI.....   | 97 |

## Índice de figuras

|  | Página |
|--|--------|
| <b>Figura 1.</b> Mecanismos de acción de bacteriocinas.....  | 20     |
| <b>Figura 2.</b> Representación de determinantes genéticos del operón necesarios para secretar una bacteriocina.....   | 21     |
| <b>Figura 3.</b> Biosíntesis de las bacteriocinas de la clase IIa.....   | 22     |
| <b>Figura 4.</b> Metodología general.....  | 27     |
| <b>Figura 5.</b> Esquema de la distribución de electrodos en el sistema CHEF de electroforesis en campo pulsado.....   | 33     |
| <b>Figura 6.</b> Esquema del diseño de cebadores para secuenciar los genes involucrados en la biosíntesis de la bacteriocina producida por <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29.....   | 46     |
| <b>Figura 7.</b> Perfil de la fermentación del cultivo de <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29.....  | 50     |
| <b>Figura 8.</b> Perfil de la fermentación del cultivo de <i>Enterococcus faecalis</i> MXVK22.....   | 51     |
| <b>Figura 9.</b> Actividad antimicrobiana de la bacteriocina producida por <i>E. faecalis</i> MXVK22 y <i>E. faecium</i> MXVK29.....   | 52     |
| <b>Figura 10.</b> Curvas de crecimiento de <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 y <i>Listeria monocytogenes</i> en presencia de varias concentraciones de la bacteriocina producida por <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29..... | 56     |
| <b>Figura 11.</b> Curvas de crecimiento de <i>Listeria innocua</i> ATCC3309 y <i>Listeria monocytogenes</i> en presencia de varias concentraciones de la bacteriocina producida por <i>Enterococcus faecalis</i> MXVK2.....  | 57     |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 12.</b> Determinación gráfica de la concentración mínima inhibitoria estimada para el extracto crudo de las bacteriocinas producidas por <i>Enterococcus faecium</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> .....  | 60 |
| <b>Figura 13.</b> Curvas de crecimiento de cepas silvestres y resistentes de <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 y <i>Listeria monocytogenes</i> en medio TSB en presencia de 1066 UA/mL de la bacteriocina producida por <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29.....  | 64 |
| <b>Figura 14.</b> Curvas de crecimiento de cepas silvestres y resistentes de <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 y <i>Listeria monocytogenes</i> en medio TSB en presencia de 1066 UA/mL de la bacteriocina producida por <i>Enterococcus faecalis</i> MXVK22..... | 65 |
| <b>Figura 15.</b> Dendrogramas obtenidos a partir del PFGE de cepas silvestres y resistentes de <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 y <i>Listeria monocytogenes</i> digeridas con la enzima <i>AscI</i> .....  | 67 |
| <b>Figura 16.</b> ADN total extraído de diferentes cepas.....  | 70 |
| <b>Figura 17.</b> Perfil electroforético de los fragmentos amplificados por PCR a 54°C de <i>E. faecalis</i> NCIMB-700585.....   | 72 |
| <b>Figura 18.</b> Perfil electroforético en gel de agarosa al 0.8% de los genes de virulencia amplificados por PCR.....  | 73 |
| <b>Figura 19.</b> Perfil electroforético de los fragmentos amplificados por PCR para los genes <i>cob</i> , <i>efaAfm</i> y <i>efaAfs</i> .....  | 75 |
| <b>Figura 20.</b> Perfil electroforético de los fragmentos amplificados por PCR para los genes <i>tetS</i> , <i>mecA</i> y <i>vanA</i> .....   | 78 |
| <b>Figura 21.</b> Electroforesis desnaturalizante utilizando el sistema Tris-tricina de la bacteriocina producida por <i>Enterococcus faecium</i> .....  | 84 |
| <b>Figura 22.</b> Electroforesis de agarosa de la amplificación de diferentes bacteriocinas por PCR utilizando el genoma de <i>E. faecium</i> .....  | 88 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 23.</b> Comparación de la secuencia de nucleótidos de la enterocina producida por <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29 con el gen estructural de la enterocina A.....  | 89  |
| <b>Figura 24.</b> Comparación de la secuencia de nucleótidos de la enterocina producida por <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29 con el gen estructural de la enterocina B.....  | 89  |
| <b>Figura 25.</b> Electroforesis de agarosa de la digestión y purificación de ADN extraído de <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29.....  | 91  |
| <b>Figura 26.</b> Electroforesis de agarosa de los genes involucrados en la biosíntesis de la bacteriocina producida por <i>Enterococcus faecium</i> .....   | 92  |
| <b>Figura 27.</b> Secuencias obtenidas con los cebadores P2EB3 y AP2 utilizando el kit Genome Walker.....  | 93  |
| <b>Figura 28.</b> Secuencia obtenida con los cebadores P2EA3 y AP2 utilizando el kit Genome Walker.....  | 94  |
| <b>Figura 29.</b> Electroforesis de agarosa de los genes involucrados en la biosíntesis de la bacteriocina producida por <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29 (PCR 2).....   | 95  |
| <b>Figura 30.</b> Alineamientos obtenidos con la base de datos del NCBI del fragmento amplificado con el kit comercial Genome Walker.....  | 95  |
| <b>Figura 31.</b> Comparación de la secuencia del operón de la enterocina A ( <i>entAIFK</i> genes) con la secuencia obtenida de la bacteriocina producida por <i>E. faecium</i> MXVK29.....   | 99  |
| <b>Figura 32.</b> Diagrama de los sitios de corte para la enzima de restricción <i>EcoRV</i> sobre la secuencia de nucleótidos que codifican para el operón de <i>Enterococcus faecium</i> que codifica para la enterocina A y sus proteínas accesorias..... | 120 |

## Resumen

La bioconservación consiste en el uso controlado de microorganismos o sus metabolitos para controlar la microbiota de descomposición y/o los patógenos, así como para prolongar la vida útil e incrementar la calidad sanitaria de los alimentos. Los enterococos son bacterias ácido lácticas (BAL) que contribuyen a las propiedades organolépticas de los alimentos fermentados, además de tener la capacidad de producir bacteriocinas (enterocinas). Estas bacteriocinas tienen altas posibilidades de ser utilizadas como conservadores naturales, con la ventaja de que pueden ser degradadas por las enzimas proteolíticas presentes en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que el género *Enterococcus* puede ser portadores de genes de resistencia, o bien de genes que codifican para algunos factores de virulencia. Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria estos aspectos pueden ser una limitante en el uso de este género en los alimentos. El propósito de este trabajo fue identificar si las cepas *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Enterococcus faecalis* MXVK22 pueden ser utilizadas como posibles cultivos iniciadores. Para cumplir este objetivo se determinaron los siguientes parámetros: cinética de producción, determinación de la concentración mínima inhibitoria y capacidad de generar cepas resistentes del extracto de bacteriocina; así como la determinación de aspectos de seguridad de cepas de enterococos, incluyendo la purificación y caracterización molecular parcial e identificación de la enterocina producida por estos microorganismos.

El perfil de producción de las bacteriocinas en estudio es el de un metabolito primario con una actividad antimicrobiana de 2133.33 UA/mL y 4266.66 UA/mL (enterocina producida por *E. faecalis* MXVK22 y *E. faecium* MXVK29, respectivamente). En las concentraciones de estudio (2133, 1066, 533, 267 y 134 UA/mL) se observó un efecto bacteriostático sobre las cepas de *Listeria* probadas (*Listeria innocua* ATCC33090, *Listeria monocytogenes* LM82 y Scott A), a excepción de *Listeria monocytogenes* LMB 911204/47, la cual no presentó un efecto inhibitorio con ninguna de las concentraciones utilizadas. Para eliminar el 100% del microorganismo sensible (*Listeria* sp.) es necesario adicionar al medio 2535, 6040, 3969 y 11021 UA/mL de la bacteriocina producida por *E. faecium* MXVK29; y 4263, 2425, 1209 y 3810 UA/mL de la bacteriocina producida por *E. faecalis* MXVK22 (*Listeria innocua* ATCC33090, *Listeria monocytogenes* LM82, LMB

911204/47 y Scott A, respectivamente). Se obtuvieron cepas resistentes de *Listeria* que muestran cambios en los perfiles genómicos con respecto a sus cepas sensibles, lo que indica que las bacteriocinas produjeron una resistencia con reflejo a nivel genómico, por lo cual éstas deben ser consideradas como parte de una tecnología de barreras y no como preservante único. De todos los factores de virulencia analizados (*cylA*, *cylB* y *cylM*, *agg*, *gelE*, *esp*, *efaA<sub>fs</sub>*, *efaA<sub>fm</sub>*, *cpd*, *cob*, *ccf* y *ace*) en *Enterococcus faecalis* MXVK22 y *Enterococcus faecium* MXVK29 (cepas testigo); solo el gen *ccf* que codifica para una feromona sexual fue amplificado por PCR para todas las cepas en estudio. La presencia de esta feromona es común en cepas de enterococos aisladas de diferentes fuentes (cultivos iniciadores, alimentos y clínicos) y no se considera un factor de virulencia mientras no se presente el gen *agg* (proteína de agregación). *Enterococcus faecium* MXVK29 fue sensible a todos los antibióticos probados, a diferencia de *Enterococcus faecalis* MXVK22, que presentó resistencia a vancomicina y tetraciclina. *Enterococcus faecalis* MXVK22, no presentó formación de aminas biogénicas con el método utilizado para el análisis, en contraste con *Enterococcus faecium* MXVK29 que tuvo actividad descarboxilasa positiva para la formación de tiramina. El rendimiento obtenido con el protocolo de purificación fue de 32.7% para el extracto de bacteriocina (EB) de *Enterococcus faecium* MXVK29 y 32.1% para el EB de *Enterococcus faecalis* MXVK22. La secuencia del extremo amino terminal de la molécula de bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* MXVK29 presentó una secuencia consenso hidrofílica y catiónica YGNGV(X)C(X)4C, con dos residuos de cisteína en las posiciones 9 y 14. El fragmento amplificado por PCR tuvo una similitud del 100% con el péptido maduro de la enterocina A y B producidas por *Enterococcus faecium* MTCC5153. La secuencia consenso de las secuencias obtenidas fue alineada, obteniéndose una similitud del 100% con la secuencia parcial del operón de la enterocina A (*entAIF*) reportada en la base de datos del NCBI.

*Enterococcus faecium* MXVK29 podría ser utilizado como parte de un método de bioconservación, ya sea como cultivo iniciador, cultivo bioprotector o como conservador natural en alimentos; además la enterocina A tienen un gran potencial para ser usada como conservador natural en alimentos.

## Abstract

Bioconservation is the controlled use of microorganisms or their metabolites to control the microflora in decomposition and also pathogens increasing the shelf life and improving the sanitary quality of food. Enterococci are lactic acid bacteria (LAB) that contribute to the organoleptic properties of fermented foods, as well as having the ability to produce bacteriocins (enterocin), which can be degraded by proteolytic enzymes present in the gastrointestinal tract; in addition they could be used as natural preservatives. However, some studies have demonstrated that the genus *Enterococcus* may act as reservoirs for antibiotic resistance genes, in addition, they may carry some virulence determinants, thus rising concerns about the safety of strains found in foods. The purpose of this study was to identify if the strain of *Enterococcus faecium* MXVK29 and *Enterococcus faecalis* MXVK22 can be used as potential fermentation starters.

The methodology was divided in different sections: production kinetics, minimum inhibitory concentration determination, capacity to generate resistant strains, determination of safety aspects of enterococci strains, purification and partial molecular characterization of enterocins.

The profile for both bacteriocins is a primary metabolite and they showed an antimicrobial activity of 2133.33 AU/mL and 4266.66 AU/mL (enterocin produced by *E. faecalis* MXVK22 and *E. faecium* MXVK29, respectively). Bacteriocin concentrations (2133, 1066, 533, 267 and 134AU/mL) tested in this study have a bacteriostatic effect on *Listeria* strains, with the exception of *Listeria monocytogenes* 911204/47LMB, who did not show an inhibitory effect on any concentration.



The minimum inhibitory concentration of bacteriocin was 2535, 6040, 3969, and 11021 UA/mL for bacteriocin produced by *E. faecium* MXVK29 and 4263, 2425, 1209 and 3810 AU/mL for bacteriocina produced by *E. faecalis* MXVK22 (*Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* LM82, LMB911204/47 and ScottA, respectively). Resistant strains of *Listeria* showed changes in genomic profiles where compared to sensitive strains.

The virulence factors (*cylA*, *cylB* y *cylM*, *agg*, *gelE*, *esp*, *efaA<sub>fs</sub>*, *efaA<sub>fm</sub>*, *cpd*, *cob*, *ccf* y *ace*) were amplified by PCR in all strains tested (*Enterococcus faecalis* MXVK22 and *Enterococcus faecium* MXVK29), the *ccf* gene encoding a sex pheromone was positive for all strains tested. *Enterococcus faecium* MXVK29 was sensitive to all antibiotics tested, unlike *Enterococcus faecalis* MXVK22 that showed resistance to vancomycin and tetracycline. *Enterococcus faecalis* MXVK22 did not form any biogenic amines, in contrast to *Enterococcus faecium* MXVK29 that had positive activity decarboxylase for tyramine.

The yield obtained with the purification protocol was 32.7% for the bacteriocin extract (EB) *Enterococcus faecium* MXVK29 and 32.1% for EB *Enterococcus faecalis* MXVK22.

Amino terminal sequence of the bacteriocina produced by *Enterococcus faecium* MXVK29, presented a hydrophilic and cationic consensus sequence YGNGV(X)C(X)4C with two cysteine residues at positions 9 and 14. The PCR amplified fragment had 100% similarity to the mature peptide of enterocin A and enterocin B produced by *Enterococcus faecium* MTCC5153. The consensus sequence of the obtained sequences was aligned with 100% similarity with the partial sequence of the enterocin operón (*entAIF*) reported in NCBI database.

*Enterococcus faecium* MXVK29 could be used as part of a bioconservation method either as a starter culture, bioprotector culture or additive, additionally the enterocin A has a great potential for use as natural preservative in food.

## 1. Justificación

En los últimos años ha existido un gran interés por emplear cepas de enterococos como cultivos iniciadores para la fermentación de productos cárnicos y lácteos, debido a que éstos contribuyen en las propiedades sensoriales del producto fermentado final, además de su capacidad para producir bacteriocinas. Las bacteriocinas (en general, y las enterocinas en particular), por su origen proteico, son consideradas conservadores naturales inocuos toxicológicamente, debido a que son inactivadas por enzimas proteolíticas. Esta característica les permite ser consideradas como conservadores seguros de una gran variedad de alimentos.

Sin embargo, antes de su posible aplicación en alimentos las cepas bacteriogénicas de enterococos y sus enterocinas deben ser caracterizadas bioquímica y molecularmente, debido a que pueden presentar resistencia a antibióticos o poseer factores de virulencia que pueden representar un factor de riesgo para la salud. Por ello, y a pesar de que las cepas de enterococos sean de gran interés para los procesos de fermentación, son muy importantes los estudios para identificar la presencia de posibles factores de riesgo, de forma que puedan proponerse como una alternativa segura para futuras aplicaciones en alimentos.

En el trabajo de Maestría, se realizó la caracterización bioquímica de las enterocinas producidas por *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Enterococcus faecalis* MXVK22, y se obtuvo su espectro inhibitorio. Se probó, asimismo, el origen proteico y la termotolerancia de las enterocinas, también se realizó su purificación y separación por electroforesis de las mismas. Sin embargo, la información obtenida aun no era suficiente para determinar su posible uso como conservador. Por esta razón, se propuso ampliar los estudios realizados con la caracterización molecular, necesaria para determinar algunas propiedades como: el mecanismo de expresión, secreción, resistencia e inmunidad, además de ser una etapa indispensable para manipulaciones futuras de la cepa, como sobreproducción o producción heteróloga de las bacteriocinas.

## 2. Introducción

### 2.1 EL GÉNERO *Enterococcus*

El término “enterococo” fue utilizado por primera vez en 1899 por Thiercelin, para referirse a un diplococo Gram positivo encontrado en el intestino humano. En 1906 Andrewes y Horder asignaron la denominación *Streptococcus faecalis* a un microorganismo aislado de un paciente con endocarditis. Desde entonces, la clasificación de esta bacteria fue controvertida. En 1937 se dio un avance importante en este tema, cuando Sherman propuso una clasificación esquemática que estructuraba a los estreptococos en cuatro grupos: piógenos, viridans, lácticos y enterococos. El grupo de los enterococos engloba a aquellos microorganismos en forma de cocos Gram-positivos que se agrupan en parejas o en cadenas cortas y pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas. En general son anaerobios facultativos, no esporulados, catalasa negativos, oxidasa negativos y presentan crecimiento óptimo a temperaturas de 35°C (aunque algunas especies del género crecen a temperaturas de 10–45°C), en presencia de NaCl al 6.5%, a pH 9.6 y pueden sobrevivir a tratamientos de 60°C durante 30 minutos. En 1984, Schleifer y Kilpper-Balz propusieron una nueva clasificación para las bacterias del género *Streptococcus* que reaccionan con el antisuero del grupo D (*S. faecalis* y *S. faecium*), agrupándolas como el género *Enterococcus*. Posteriormente, y tras diversos estudios quimiotaxonómicos, en este grupo se englobaron también otras especies pertenecientes al grupo D de los estreptococos: *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans* y *E. gallinarum*.

### 2.2 ASPECTOS DE SEGURIDAD DE ENTEROCOCOS

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se consideran organismos GRAS (generalmente reconocidos como seguros, por sus siglas en inglés) en la producción de alimentos. Sin embargo, en los últimos años se ha cuestionado el estatus GRAS de uno de los grupos de bacterias lácticas: los enterococos. Estos son microorganismos ubicuos que habitan el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Con frecuencia se encuentran en alimentos fermentados debido a su tolerancia al cloruro sódico y al nitrito, lo que les permite sobrevivir, e incluso multiplicarse, durante la fermentación (Giraffa, 2002).

Los enterococos se han utilizado desde hace años en la producción de alimentos por su importante contribución al desarrollo del aroma en quesos y productos cárnicos, como probióticos en alimentación humana y animal y como cultivos bioprotectores en productos lácteos y cárnicos (Coppola y col., 1998; Aymerich y col., 2000a). Sin embargo, su presencia en los alimentos es motivo de controversia, ya que algunos autores los consideran microorganismos indeseables, indicadores de contaminación fecal y responsables del deterioro de los productos cárnicos (Bell y DeLacey, 1984; Franz y col., 1999). Esta controversia se ha visto además acentuada por la desafortunada relevancia clínica que en las últimas décadas han adquirido los enterococos, ya que se han convertido en la tercera causa de enfermedades hospitalarias, causando infecciones del tracto urinario, bacteriemia y endocarditis. La mayor parte de estas infecciones por enterococos están causadas por *Enterococcus faecalis*, responsable del 80% de los casos, seguida por *Enterococcus faecium*, que se asocia a un 15-20% de las infecciones restantes (Morrison y col., 1997).

### 2.2.1 Factores de virulencia

Los mecanismos de virulencia de los enterococos no se conocen con exactitud, aunque se han descrito una serie de factores de virulencia que influyen en la adherencia al tejido hospedador, la invasión, la formación de abscesos, la resistencia y modulación de los mecanismos de defensa del hospedador, la secreción de citolisinas y la producción de feromonas codificadas en plásmidos (Jett y col., 1994; Lowe y col., 1995; Haas y Gilmore, 1999; Franz y col., 1999; Eaton y Gasson, 2001).

La adherencia al tejido hospedador está mediada por adhesinas. Una de las adhesinas es la llamada sustancia de agregación (*agg*), una proteína de superficie inducible por feromonas que interviene en la unión de la célula donante a células aceptoras libres de plásmidos y promueve la agregación celular (Waters y Dunny, 2001). Otras adhesinas pueden actuar en los procesos de endocarditis, como el antígeno A de *E. faecalis* (*EfaA<sub>fs</sub>*) y *E. faecium* (*EfaA<sub>fm</sub>*). En modelos animales, *EfaA<sub>fs</sub>* ha sido relacionada con un aumento en la virulencia; por el contrario, aún no se ha demostrado que *EfaA<sub>fm</sub>* cause virulencia de las cepas que la expresan (Singh y col., 1998). Finalmente, la proteína de superficie (*esp*)

participa en la adhesión celular a superficies bióticas y abióticas y en la formación de biopelículas (Lowe y col., 1995; Shankar y col., 2001; Toledo-Arana y col., 2001).

Otro factor de virulencia descrito es la gelatinasa (codificada por el gen *gelE*), una zinc-endopeptidasa que hidroliza diversas proteínas, como gelatina, colágeno, caseína, lactoglobulina y otros péptidos bioactivos (Makinen y col., 1989; García de Fernando y col., 1991). Este factor se ha encontrado mayoritariamente en enterococos aislados de pacientes con endocarditis, por lo que parece contribuir en la virulencia de estos microorganismos.

Los enterococos de origen alimentario no se han relacionado, hasta ahora, como causa directa de infecciones clínicas (Adams, 1999), aunque es cierto que se han encontrado genes que codifican para factores de virulencia en cepas aisladas de alimentos (Eaton y Gasson, 2001; Franz y col., 2001; Semedo y col., 2003; Ben Belgacem y col., 2010). La frecuencia de dichos hallazgos es, de todas formas, menor que en el caso de las cepas de origen clínico.

### **2.2.2 Resistencia a antibióticos**

Otra característica que contribuye a la patogenicidad de los enterococos es su resistencia a una gran variedad de antibióticos, lo que dificulta en gran medida el tratamiento médico de las infecciones por este género (Murray, 1990; Mundy y col., 2000). Los enterococos resistentes a antibióticos están ampliamente distribuidos en alimentos crudos (Giraffa, 2002), así como también se han aislado de productos lácteos, alimentos preparados, productos cárnicos y en cepas utilizadas como probióticos (Quednau y col., 1998; Teuber y col., 1999; Shalini y Singh, 2005; Hummel y col., 2007).

Los enterococos se caracterizan por presentar resistencia intrínseca a un gran número de antibióticos ( $\beta$ -lactámicos, lincosaminas y aminoglicósidos, por ejemplo). Además de la resistencia intrínseca, los enterococos pueden presentar nuevas resistencias por la adquisición de ADN extracromosómico mediante el mecanismo de intercambio genético denominado conjugación (Clewell, 1981; Franz y col., 1999). La transferencia

génica por conjugación ha sido demostrada, al menos *in vitro*, entre cepas de la misma especie (Coconcelli y col., 2003), entre especies diferentes de enterococos (Nicas y col., 1989; Boyle y col., 1993) y entre bacterias de otros géneros, como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Noble y col., 1992; Tenover y col., 2004).

Las especies del género *Enterococcus* muestran de forma general, una baja resistencia intrínseca a los  $\beta$ -lactámicos (como la penicilina y ampicilina, entre otros), que ejercen un efecto bacteriostático sobre estas bacterias (Huycke y col., 1998). Los principales mecanismos de resistencia a estos antibióticos implican la producción de proteínas de unión a penicilinas (PBPs) de baja afinidad.

La estreptomicina fue el primer aminoglicósido reportado para el que apareció resistencia en cepas de enterococos (hasta incluso concentraciones superiores a 2000  $\mu\text{g/mL}$ ). Esta resistencia se lleva a cabo por la adenilación de la estreptomicina, debida a la acción de la estreptomicina adeniltransferasa codificada por el gen *aadA* (Eliopoulos y col., 1984). La resistencia a gentamicina, kanamicina, neomicina y netilmicina (aminoglicósidos también) se debe principalmente a la producción de la enzima bifuncional 2'-fosfotransferasa-6'-acetiltransferasa, la cual promueve la fosforilación dependiente de ATP de los aminoglicósidos (Murray y col., 1983). La frecuencia de resistencia a glicopéptidos es mayor en *E. faecium*, a pesar de que las infecciones por *E. faecalis* son más frecuentes.

Los antibióticos macrólidos se emplean en el tratamiento de infecciones en humanos, siendo normalmente la eritromicina el antibiótico de primera elección. Los genes de resistencia a macrólidos más frecuentes son los denominados *erm*, los cuales codifican para una metiltransferasa que actúa sobre residuos específicos de la subunidad 23S del ARN ribosómico, impidiendo así la unión de la eritromicina (Pechere, 2001). Se han descrito diversos genes *erm* en cepas de enterococos, siendo *ermB* el predominante (88%). La resistencia a macrólidos se puede transmitir de animales a humanos, por la diseminación de bacterias resistentes o por transferencia horizontal a través de elementos genéticos móviles.

Entre el 60 y el 65% de las cepas de enterococos de origen clínico muestran resistencia a tetraciclinas, aunque estos antibióticos no son empleados de forma rutinaria en el tratamiento de infecciones causadas por estos microorganismos. También se ha descrito la presencia de cepas resistentes a tetraciclinas en diversos alimentos de origen animal (Butaye y col., 2000; Pavia y col., 2000). Existen dos mecanismos fundamentales de resistencia a tetraciclinas en los enterococos: bombas de flujo y protección del ribosoma, impidiendo así la unión del antibiótico. Los genes *tetK* y *tetL* codifican para bombas de exportación o flujo, las cuales bombean el antibiótico al exterior de la célula y los genes *tetM*, *tetO* y *tetS* codifican para proteínas que proporcionan resistencia a tetraciclinas mediante protección del ribosoma. Los genes *tetL* y *tetM* son los más frecuentes en enterococos y pueden estar localizados tanto en el cromosoma como en plásmidos de carácter conjugativo.

Finalmente, la vancomicina (glicopéptido) es el principal motivo de preocupación, ya que este antibiótico es una de las últimas opciones de terapia antimicrobiana en algunas infecciones por bacterias Gram-positivas (Rubin y col., 1992; Wegener y col., 1999). A finales de los ochenta se aislaron las primeras cepas de enterococos resistentes a este antibiótico, desde entonces la resistencia a la vancomicina se ha convertido en un factor importante en la infección y colonización por enterococos. La resistencia a vancomicina en enterococos es variada, se han descrito seis genotipos, denominados *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* y *vanG* (Healey y col., 2000; Arthur y Quintiliani, 2001). El genotipo *vanA* es el más frecuente del género *Enterococcus*.

### **2.2.3 Producción de aminas biogénicas**

Los alimentos fermentados pueden contener cantidades considerables de aminas biogénicas que no sólo pueden ser precursoras de nitrosaminas, sino que también pueden causar trastornos como la intoxicación histamínica (intoxicación escombroidea), crisis hipertensivas (interacción entre alimentos y medicamentos) y migrañas de origen alimentario en individuos sensibles (Brink y col., 1990; Bardócz, 1995).

En los embutidos fermentados, el pH ácido que se produce durante la fermentación parece estimular la síntesis y actividad de la amino-descarboxilasa, tanto la de la microbiota responsable de la fermentación, como la de los microorganismos contaminantes presentes en las materias primas (Maijala y col., 1995). Los diferentes estudios sobre aminas biógenas en productos cárnicos crudos curados fermentados indican que la tiramina es la primera amina que alcanza mayores concentraciones (hasta un máximo de 1000 mg/kg de peso seco) al finalizar la fermentación o maduración del producto. En segundo lugar (en tiempo y cantidad) se producen las diaminas putrescina y/o cadaverina. Los contenidos de histamina y demás aminas aromáticas suelen ser bastante bajos, aunque determinados productos pueden presentar contenidos de estas aminas incluso superiores a los de la tiramina. Los niveles descritos de aminas biógenas raramente provocan intoxicación escombroida o síntomas de migraña, pero dado que se han descrito embutidos fermentados de alta calidad con valores de aminas biógenas extremadamente bajos, es conveniente establecer medidas de control que permitan evitar la acumulación de aminas durante la elaboración de estos productos.

## **2.3 ENTEROCOCOS Y BIOCONSERVACIÓN DE ALIMENTOS**

### **2.3.1 La conservación de los alimentos**

El crecimiento y actividad de los microorganismos es la causa principal de descomposición de los alimentos, ya que existen miles de géneros y especies de microorganismos que provocan este fenómeno (aunque es cierto que algunos de ellos también se pueden emplear para la conservación). En general, todos los alimentos contienen sustratos suficientes para el crecimiento de microorganismos, tanto patógenos como alterantes, por lo que se hace necesaria la aplicación de medidas que prolonguen la vida útil y aseguren la inocuidad de los mismos. La refrigeración es el proceso más común de conservación de los productos cárnicos, junto con métodos como el envasado al vacío, cocción, adición de sales y agentes antimicrobianos (Jay, 1987).



En México es común encontrar productos expuestos a condiciones que promuevan la proliferación de microorganismos, como el transporte inadecuado, fallas en los sistemas de refrigeración y malas prácticas de manufactura, entre otras, lo que reduce la vida de anaquel, causa pérdidas económicas a la industria y, principalmente, riesgos para la salud de los consumidores. Las intoxicaciones alimentarias de origen bacteriano ocupan en México el cuarto lugar de enfermedades gastrointestinales, con 28,652 casos reportados durante el 2006, según la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud (boletín epidemiológico CIE10a Rev., 2006). Los principales alimentos implicados son lácteos, carne, pollo, pescado y mariscos.

Un microorganismo frecuente en alimentos es *Listeria monocytogenes*, que tiene la capacidad de sobrevivir y crecer a temperaturas de refrigeración, lo que le permite acumularse en los alimentos durante el almacenamiento y le convierte en un riesgo potencial para los consumidores. Además *Listeria* es relativamente tolerante a factores como el NaCl y valores de pH reducidos; en los alimentos con pH bajo o a los que se les ha agregado ácidos orgánicos, las listerias que llegan a sobrevivir pueden recuperarse y crecer a bajas temperaturas, si es que no existen otras barreras antimicrobianas presentes (Doyle, 1999).

Dentro de las técnicas de conservación se encuentra la adición de conservadores. En México, el reglamento de la Ley General de Salud en materia de control sanitario de actividades, establecimientos y servicios, en su capítulo noveno, artículo 674 (Diario Oficial de la Federación, 1988), define a un conservador como “una sustancia o mezcla de sustancias que previenen, retardan o detienen el proceso de la fermentación, enmohecimiento, putrefacción, acidificación u otra alteración de los alimentos, causados por algunos microorganismos y por algunas enzimas”. Entre los conservadores permitidos se encuentran el ácido benzoico, benzoato de sodio, ácido sórbico, sulfito de sodio, metil parabeno, propil parabeno, nitrito y nitrato de potasio y nisina, entre otros.

La nisina es un conservador natural producido por *Lactococcus lactis*, empleada desde 1983 en la Unión Europea como conservador en alimentos con el nombre E234, aunque no fue hasta el año 1988 cuando 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 es la única bacteriocina reconocida con la categoría GRAS para su incorporación en alimentos para el consumo humano.

### 2.3.2 Enterococos como cultivos iniciadores

Antiguamente, los alimentos fermentados se elaboraban mediante procesos empíricos basados en la actividad de la microbiota presente de forma natural en las materias primas (fermentaciones naturales). Actualmente, las fermentaciones industriales son procesos dirigidos en los que se añade a la materia prima cultivos de microorganismos seleccionados, tanto bacterias como hongos y/o levaduras (cultivos iniciadores), lo que permite estandarizar y garantizar las características organolépticas y mejorar la calidad higiénico-sanitaria del producto final.

Los enterococos se distribuyen extensamente en el ambiente, habitan principalmente el tracto intestinal de humanos. *E. faecalis* es la especie predominante en el intestino humano, aunque en algunos individuos *E. faecium* excede en número a *E. faecalis* (Devriese y Pot, 1995). Sin embargo, Mundt (1986) demostró que la presencia de *E. faecalis* en muchos productos alimenticios no está siempre relacionada con una contaminación fecal. Estados Unidos estableció en 1992 un nivel máximo para la presencia de coliformes y *Escherichia coli* (considerados indicadores de la higiene), mientras que no se fijó ningún límite para los enterococos (Anónimo, 1969). La resistencia de los enterococos a temperaturas de pasteurización, y su adaptabilidad a diferentes sustratos y condiciones de crecimiento (temperaturas bajas y altas, pH extremo, salinidad) implican que pueden ser encontrados en cualquier producto alimenticio fabricado a partir de materias primas crudas como leche o carne y en alimentos sometidos a un tratamiento térmico. Esto significa que esta bacteria puede soportar las condiciones a las que es sometido un alimento

durante su producción, y que los enterococos pueden ser parte habitual de la microbiota del alimento terminado, especialmente quesos y carnes fermentadas.

La contribución de los enterococos a las propiedades sensoriales de los productos fermentados y su capacidad de producir bacteriocinas (enterocinas) son características importantes para su uso en tecnología alimenticia. Este tipo de investigaciones se han centrado en la aplicabilidad de estas cepas en productos como queso y carne. Sin embargo, la selección de los enterococos implicados en el procesamiento de alimentos es una tarea difícil, debido a su riesgo potencial sobre la salud humana (Vancanneyt y col., 2002; De Vuyst y col., 2003), por la posible resistencia a antibióticos y producción de factores de virulencia. Hasta el momento, sin embargo, no se ha podido demostrar que las cepas presentes en alimentos puedan ocasionar enfermedad en humanos (Adams, 1999). Además, algunos estudios indican que las cepas portadoras de caracteres de virulencia forman un grupo genómico diferente de la mayoría de las cepas aisladas de alimentos (Vancanneyt y col., 2002; Ben Belgacem y col., 2010).

### **2.3.2.1 Carne y derivados cárnicos**

La presencia del género *Enterococcus* en el aparato gastrointestinal de los animales puede conducir a la contaminación de la carne durante la matanza. En un estudio con enterococos presentes en productos de carne crudos, *E. faecalis* fue la cepa aislada predominante en cortes de carne de vaca y de cerdo, mientras que *E. faecium* fue aislado de salchichas procedentes de carne de cerdo (Stiles y col., 1978).

En países del Mediterráneo, muchos productos fermentados de carne son elaborados por pequeñas compañías, granjas o carnicerías locales, que generalmente obtienen productos con un pH mayor que el estándar para embutidos ( $\text{pH} > 5.3$ ). En estos productos, la fermentación se realiza sin cultivos iniciadores, confiando en la biota endógena que mantiene las cualidades organolépticas tradicionales. La microbiota natural está constituida por una mezcla de BAL, incluyendo enterococos y lactobacilos, así como estafilococos y levaduras. La actividad bioquímica de los enterococos en un embutido no ha sido estudiada en detalle como en el caso de los productos lácteos, pero se cree que pueden contribuir al

aroma de los embutidos por su actividad glucolítica, proteolítica y lipolítica (Hugas y col., 2003).

### **2.3.2.2 Queso**

La prevalencia de enterococos en leche y quesos es el resultado de condiciones higiénicas durante su producción, su presencia ha sido relacionada indirectamente con contaminación de fuentes de agua, equipo de ordeño y tanques de almacenamiento (Gelsomino y col., 2002; Giraffa, 2002). Aunque algunos autores sostienen que altos niveles de contaminación por enterococos pueden conducir al deterioro de características sensoriales en algunos quesos (López-Díaz y col., 1995), otros sostienen el beneficio de la presencia de los enterococos en el queso, ya que contribuyen a la maduración y desarrollo del aroma de estos productos (debido a su actividad proteolítica y lipolítica), así como a la producción de diacetilo y otros compuestos volátiles. El predominio y la persistencia de los enterococos en algunos tipos de quesos durante la maduración se atribuyen al amplio rango de temperatura de crecimiento y/o a la alta tolerancia a las sales y ácidos orgánicos (Freitas y col., 1995).

Las cepas utilizadas como cultivos iniciadores son usualmente aisladas de hábitats naturales o de fermentaciones ocurridas naturalmente en alimentos de origen similar (Leroy y de Vuyst, 2004). Actualmente, sólo la cepa *Enterococcus faecium* K77D ha sido aceptada por el ACNFP (British' Advisory Committee on Novel Foods and Processes) como cultivo iniciador para quesos tipo Cheddar, Feta, Mozzarella, Cebreiro y Venaco (Foulquié y col., 2006).

### **2.3.3 Enterococos como probióticos**

La alteración del equilibrio de la biota microbiana del tracto gastrointestinal del ser humano suele ocasionar serios problemas de salud, ya que se reduce la capacidad de asimilación de los nutrientes de los alimentos y se incrementa la susceptibilidad a padecer determinadas enfermedades. La primera definición de probiótico fue dada por Lilly y Stillwell (1965) como “una sustancia producida por microorganismos que estimulan el crecimiento de otros microorganismos”, pero la definición más usada es la propuesta por

Fuller (1989) como “aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino”. Para decir que un microorganismo tiene un efecto probiótico debe cumplir las siguientes características (Salminen y col., 1996):

- ✚ Capacidad de adherirse a las células epiteliales del intestino.
- ✚ Eliminar o reducir patógenos adheridos a las células del intestino.
- ✚ Producir ácidos, peróxido de hidrógeno y/o bacteriocinas.
- ✚ Ser seguro, no invasivo, no cancerígeno y no patógeno.
- ✚ Ayudar al balance normal de la microbiota intestinal.
- ✚ Resistir el pH del estomago y de las sales biliares en el intestino.

Muchas bacterias probióticas son de origen intestinal y pertenecen a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, además se han utilizado cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* entre otros géneros (Hopzapfel y col., 1998). Aunque tanto *E. faecium* como *E. faecalis* se utilizan como probióticos en humanos, *E. faecalis* es más usado como suplemento de alimentos animales.

La cepa *E. faecium* SF68 ha sido estudiada con detalle como probiótico en humanos, especialmente en el tratamiento de diarreas (Lewenstein y col., 1979). Esta cepa presenta una resistencia moderada a los antibióticos y ejerce un efecto inhibitor *in vitro* sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. y *Enterobacter* sp. Además es resistente a pH ácido e insensible a sales biliares (Lewenstein y col., 1979; Bellomo y col., 1980; Canganella y col., 1996).

#### 2.3.4 Enterocinas

La bioconservación tiene como principal objetivo la extensión de la vida media y la mejora de la seguridad de los alimentos empleando microorganismos o sus metabolitos. Los microorganismos iniciadores pueden producir una amplia variedad de compuestos y sustancias protéicas antimicrobianas (bacteriocinas), que pueden inhibir o reducir la microbiota no deseable en los productos alimenticios.

Las bacteriocinas son definidas como péptidos, en su mayoría termoestables, con actividad antimicrobiana, sintetizados ribosomalmente por BAL como parte de su mecanismo de defensa (Klaenhammer, 1988 y 1993; Jack y col., 1995; Nes y col., 1996; Cotter y col., 2005). Por definición, las bacteriocinas son inactivadas por al menos una proteasa, y por lo tanto, son inactivadas por las enzimas gastrointestinales, lo que les confiere la propiedad de inocuidad (Nettles, 1993).

Las enterocinas son bacteriocinas producidas por especies de enterococos, como *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* y *Enterococcus munditi*. En la actualidad se han descrito numerosas cepas bacteriocinogénicas aisladas de sistemas alimentarios (lácteos, embutidos, vegetales y pescados) debido a la amplia distribución de estas cepas. Muchas de estas enterocinas muestran actividad bactericida frente a microorganismos patógenos o alterantes presentes en los alimentos (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, entre otros), por lo que se ha sugerido que podrían jugar un papel importante como conservantes naturales (Giraffa y col., 1997; Cleveland y col., 2001; Chen y Hoover, 2003; Deegan y col., 2006).

#### **2.3.4.1 Aplicación de enterocinas en alimentos**

Existen muchos estudios referentes al aislamiento y caracterización de enterocinas producidas por enterococos. Las enterocinas han sido aisladas de diversas fuentes, incluyendo alimentos (queso, carne, pescados y embutidos), animales y seres humanos. Las bacteriocinas producidas por enterococos son generalmente activas contra patógenos Gram-positivos (*Listeria* sp. y *Clostridium* sp., por ejemplo) y Gram-negativos como *E. coli* y *Vibrio cholerae* (Foulquié y col., 2006).

Como se ha mencionado, el uso de bacteriocinas puede darse en forma de cultivos iniciadores, cultivos antimicrobianos y/o mediante la adición directa de la enterocina durante los procesos de fermentación. La aplicación de estas enterocinas ha sido estudiada en una amplia variedad de alimentos fermentados, pero normalmente sólo en condiciones de escala piloto. Los reportes de la optimización de la producción de enterocinas y el crecimiento de los enterococos durante la fermentación son escasos. Sin embargo, los

estudios cinéticos de las fermentaciones pueden ser analizados para conocer la relación entre la producción de la bacteriocina, el crecimiento del organismo productor y el ambiente microbiano (Leroy y De Vuyst, 2002).

Aunque hay muchas bacteriocinas producidas por enterococos que han sido aisladas de productos fermentados de carne, sólo un número limitado de estudios se han realizado para el uso directo de tales sustancias en la producción de productos cárnicos. Recientemente se ha usado *E. faecium* o sus enterocinas como cultivo iniciador para la fabricación de productos fermentados de carne. *E. faecium* RZS C13 y *E. faecium* CCM 4231 han sido utilizados como iniciadores de cultivos para la producción de embutidos estilo español (Callewaert y col., 2000). El género *Enterococcus* es parcialmente competitivo durante la fermentación de carne e inhibe fuertemente el crecimiento de *Listeria* sp. La producción de malos sabores no fue detectada, por lo que los autores recomendaron como conveniente la adición de este microorganismo a cultivos de carnes para mejorar la seguridad del alimento.

Aymerich y col. (2000a) aplicaron las enterocinas A y B como aditivos semipurificados de alimentos (en diferentes productos cárnicos) y observaron el efecto inhibitorio sobre *Listeria*. Sin embargo, la adición de estas enterocinas como cultivo iniciador no tuvo efecto sobre la inhibición de *Listeria* en embutidos secos fermentados (Aymerich y col., 2000b). En contraste, la combinación de *E. faecium* y su enterocina pudieron prevenir la aparición de viscosidad en el jamón cocinado (Aymerich y col., 2002).

Se ha demostrado que hay limitaciones en el uso de algunas enterocinas como agentes anti-*Listeria* e inhibidores de patógenos, ya que el uso óptimo de las bacteriocinas para inhibir el crecimiento de *Listeria* y otros patógenos requiere de un detallado conocimiento de su actividad contra cepas sensibles y de los factores que pueden limitar su eficacia. Estos factores pueden ser la estructura y composición de los alimentos y su interacción con las bacteriocinas. Las bacterias lácticas se encuentran comúnmente en carnes y las bacteriocinas de estos microorganismos han sido ampliamente investigadas (aunque para la aplicación de estas sustancias en alimentos se requiere tener en cuenta que

las condiciones en el mismo podrían ser sustancialmente distintas a las existentes *in vitro*). Un ejemplo de esto último es la aplicación de nisina A en carnes, un péptido que es 200 veces más soluble a pH 2 que a pH 8 (Cleveland y col., 2001). Debido a su capacidad de inhibir *in vitro* el crecimiento de *Clostridium*, podría haberse utilizado como alternativa al uso de nitritos en carnes, sin embargo, las condiciones de pH y las interacciones con componentes de la carne disminuyen mucho su eficacia como antimicrobiano. Debido a estos inconvenientes, se han estudiado otras bacteriocinas, como leucocina A, enterocina, sakacina y carnobacteriocinas A y B, como preservantes en carnes crudas (Gálvez y col., 2007). Ennahar y Deschamps (2000) encontraron alta actividad de la enterocina A producida por *Enterococcus faecium* sobre 13 cepas de *Listeria monocytogenes*.

La utilización de bacteriocinas en alimentos estaría contemplada como parte de un mecanismo de barrera y no como agente preservante único, a menos que se conozcan todas las características de la bacteriocina. Una de las ventajas asociadas con el uso de las bacteriocinas en el alimento es que estos péptidos pueden formar parte de la dieta del ser humano y de los animales, ya que la carne y los productos lácteos son fuente de bacterias ácido lácticas. Las bacteriocinas son de naturaleza proteica, y por lo tanto son inactivadas por proteasas de origen gástrico o pancreático durante su paso a través del aparato gastrointestinal, por lo que si fueran utilizadas en alimentos no deberían alterar la microbiota del tracto digestivo.

Además, muchas bacteriocinas son termoestables y pueden sobrevivir a los ciclos de proceso térmico de los alimentos. Otras bacteriocinas pueden trabajar a pH y temperaturas bajas, siendo útiles en alimentos ácidos y productos congelados o almacenados bajo refrigeración. Las bacteriocinas además tienen uso en procesos de refrigeración mínima, atmósferas controladas y comidas preparadas.



Una desventaja del uso de bacteriocinas en alimentos es que son moléculas hidrofóbicas, lo cual provocaría que la bacteriocina se uniera a la fase hidrofóbica del alimento (como las emulsiones o a las superficies del alimento, con lo que la actividad disminuiría notablemente). Por esta razón, muchos investigadores sugieren que el uso de bacteriocinas sea limitado a productos no emulsionados. Sin embargo, mientras que la mayoría de las bacteriocinas son hidrofóbicas y moléculas relativamente pequeñas, pueden difundirse fácilmente a través de la fase acuosa de los productos alimenticios. El ambiente específico del alimento puede tener otras desventajas, como baja solubilidad o una mala distribución de las moléculas de bacteriocinas, sensibilidad a las enzimas del alimento y un impacto negativo de los altos niveles de sal o de otro ingrediente que afecten a la producción o a la actividad de la bacteriocina (Foulque y col., 2006; Galvez y col., 2007). Mientras que estas desventajas han sido identificadas por muchos científicos, las bacteriocinas han demostrado ser en la práctica eficaces en diferentes sistemas de alimentos, incluyendo los que contienen grasas naturales, como los quesos y productos cárnicos.

#### **2.3.4.2 Clasificación de las enterocinas**

La mayoría de las bacteriocinas de BAL son péptidos cationicos, hidrofóbicos o anfifílicos, compuestos de 20 a 60 aminoácidos (Nes y Holo, 2000). Los aminoácidos que le dan a la proteína sus características hidrofóbicas y cationicas son: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina, triptofano (hidrofóbicos); lisina, arginina e histidina (catiónicos). Las bacteriocinas han sido agrupadas según características diversas, como espectro de inhibición, mecanismo de acción, estructura química, tamaño y resistencia a temperatura, por ejemplo.

Klaenhammer (1993) definió cuatro clases de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (BAL), denominadas del I al IV. La clase I, o lantibioticos, está integrada por péptidos termoestables (<5 kDa), sintetizados en forma de propéptidos, y que sufren modificaciones postraduccionales que originan la aparición de aminoácidos modificados y caracterizados por la presencia de deshidroaminoácidos y tioéter aminoácidos (deshidroalanina, deshidrobutirina, lantionina y  $\beta$ -metil-lantionina) en su estructura. La

clase II, o no lantibióticos (péptidos activos contra *Listeria*), está integrada por péptidos termoestables (<10 kDa) que no contienen lantionina. Es el grupo que comprende la mayor cantidad de bacteriocinas y se divide en tres subgrupos: la clase II-a o pediocin-like peptides (péptidos similares a la pediocina, activos contra *Listeria* y que contienen una secuencia aminoacídica consenso Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys en su extremo amino terminal), la clase II-b (que agrupa bacteriocinas cuya actividad requiere la acción complementaria de dos péptidos) y la clase II-c (péptidos con grupos tiol activos, que requieren cisteína reducida para activarse). La clase III (o proteínas termolábiles) está integrada por proteínas termosensibles (> 30 kDa). Finalmente, la clase IV contiene péptidos complejos que requieren moléculas lipídicas o carbohidratos, junto con la fracción protéica, para su actividad. Esta última clase incluye glicoproteínas, lipoproteínas y glicolipoproteínas.

Cotter y col. (2005) sugirieron una modificación a esta clasificación (tabla 1), en la que las bacteriocinas quedan agrupadas en dos grupos mayoritarios: los lantibióticos que contienen lantionina (clase I) y las bacteriocinas que no contienen lantionina (clase II). Las bacteriocinas de altos pesos moleculares y termolábiles (clase III) quedan agrupadas bajo la designación de “bacteriolisinas”. Con respecto a la antigua clase IV, los autores no la incluyen dentro de la clasificación, debido a que ninguno de los miembros de este grupo ha sido suficientemente caracterizado como para demostrar su existencia. Heng y Tagg (2006) propusieron una nueva clasificación de bacteriocinas, en la que respetan la agrupación de Cotter y col. (2005) con respecto a la clase I y II, pero la clase III la dividen en dos: IIIa: bacteriolíticas y IIIb: no líticas. Además, la antigua clase IIc (péptidos con grupos tiol activos) en esta clasificación queda agrupada en la clase IV, para péptidos cíclicos (tabla 1).

Algunos de los criterios que establecen la clasificación de las bacteriocinas no son, sin embargo, aplicables a las enterocinas, debido a que presentan características comunes a más de una clase o subclase de las actualmente descritas. Por ejemplo, la hemolisina de *E. faecalis* pertenece al grupo de los lantibióticos (clase I), pero su actividad depende de la acción conjunta de dos péptidos (subclase IIb). La enterocina P podría ser incluida en la subclase IIc (Nes y col., 1996) pues es secretada por una prepeptido traslocasa, sin embargo

presenta una secuencia consenso YGNGV típica de la subclase IIa (Klaenhammer, 1993; Cotter y col., 2005; Heng y Tagg, 2006; Franz y col., 2007).

Franz y col. (2007) propusieron, por ello y de acuerdo con las características particulares de estos compuestos, una nueva clasificación, especial para enterocinas. Esta nueva clasificación incluye cuatro clases principales (tabla 1): enterocinas lantibióticas (clase I), enterocinas no lantibióticas (clase II), enterocinas cíclicas (clase III) y grandes proteínas (clase IV). La clase II se subdivide en tres subclases: enterocinas de la familia de las pediocinas (IIa), enterocinas sintetizadas sin un péptido líder (IIb) y enterocinas lineales que no pertenecen a la familia de las pediocinas (IIc).

Muchas de las bacteriocinas estudiadas hasta el momento pertenecen a la clase II de enterocinas, pero sólo los péptidos antimicrobianos de la clase IIa son los considerados con mayor interés para ser utilizados como conservadores en alimentos (Cleveland y col., 2001).

#### **2.3.4.3 Mecanismos de acción**

Diversos mecanismos de acción han sido propuestos para describir la acción bactericida de las bacteriocinas. La formación de poros o canales selectivos es uno de los mecanismos mejor descritos. El espectro de acción, relativamente reducido, que poseen algunas bacteriocinas sugiere la presencia de receptores moleculares a nivel de membrana en la célula blanco, aunque esto no ha sido demostrado (Van Belkum y Stiles, 2000).

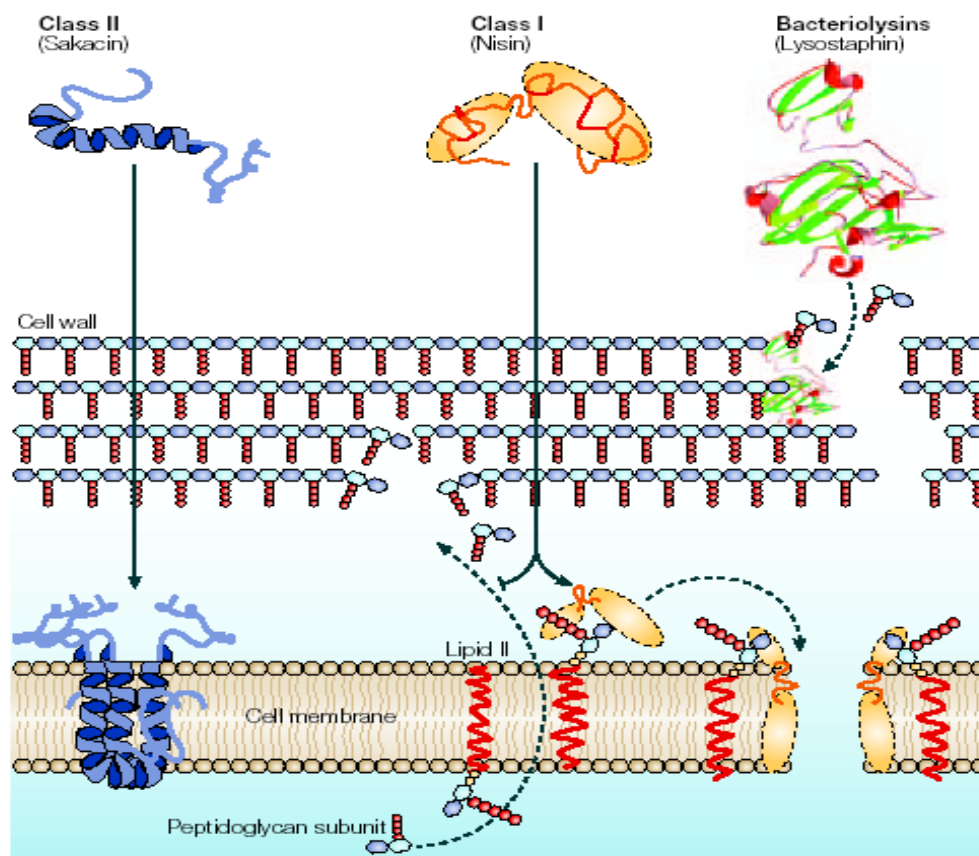
Las bacteriocinas se pueden agrupar con base en su estructura, pero también con base en su modo de acción. Algunos miembros de la clase I (lantibióticos), como la nisina, han demostrado tener un modo dual de acción: pueden unirse al lípido II (receptor universal y principal transportador de sub-unidades de peptidoglicano del citoplasma a la pared celular) impidiendo la síntesis correcta de la pared celular y conduciendo a la célula a la muerte. Además, puede utilizar al lípido II e interaccionar con la bacteriocina para iniciar un proceso de inserción en la membrana y formación de poros, que conducen a la muerte rápida de la célula (Cotter y col., 2005).

**Tabla 1.** Comparación de los sistemas de clasificación para bacteriocinas producidas por BAL.

| Clase | Klaenhammer (1993)   | Cotter y col., 2005  | Heng y Tagg (2006)   | Franz y col., 2007<br>(Clasificación propuesta para enterocinas)   | Ejemplos<br>Bacteriocina/cepa productora (género y especie) |
|-------|--|--|--|--|---|
| I     | Lantibióticos  | Lantibióticos  | Lantibióticos  | Enterocinas lantibióticas  | Citolisina/ <i>E. faecalis</i>                              |
| IIa   | Tipo pediocina (Pediocin-like) o activos contra <i>Listeria</i> , secuencia consenso (YGNGVXC) cerca del N-terminal y péptido líder GG | Tipo pediocina (Pediocin-like) o activos contra <i>Listeria</i> , secuencia consenso (YGNGVXC) cerca del N-terminal y péptido líder GG | Tipo pediocina (Pediocin-like) o activos contra <i>Listeria</i> , secuencia consenso (YGNGVXC) cerca del N-terminal y péptido líder GG | Enterocinas de la familia de las pediocinas, activos contra <i>Listeria</i> , secuencia consenso (YGNGVXC) cerca del N-terminal y péptido líder GG | Enterocina A/ <i>E. faecium</i>                             |
| IIb   | Dos péptidos, con péptido líder GG   | Dos péptidos, con péptido líder GG   | Dos péptidos, con péptido líder GG   | Enterocinas sintetizadas sin un péptido líder  | Enterocina L50A/ <i>E. faecium</i>                          |
| IIc   | Péptidos con grupo tiol (SH) y péptido líder GG  | Péptidos cíclicos  | —  | Otras enterocinas lineales no de la familia de pediocinas  | Enterocina B/ <i>E. faecium</i>                             |
| IId   | —  | Bacteriocinas de un solo péptido y lineales (no pediocinas)  | No pediocinas  | —  | —   |
| IIIa  | Grandes proteínas termolábiles   | Bacteriolisinas  | Bacteriolíticas  | Péptidos cíclicos  | Enterocina AS48/ <i>E. faecalis</i>                         |
| IIIb  | —  | —  | No líticas   | —  | —   |
| IV    | Complejos de proteínas   | —  | Péptidos cíclicos  | Grandes proteínas  | Enterolisina A/ <i>E. faecalis</i>                          |

En general, los péptidos de la clase II tienen una estructura anfifílica helicoidal la cual permite que se inserte en la membrana de las células blanco, conduciendo a la despolarización y muerte (Cotter y col., 2005). El extremo hidrofílico amino terminal de las moléculas es la parte donde se da la interacción inicial con las cabezas de los fosfolípidos aniónicos de la membrana. El extremo C terminal de la molécula, que es más hidrofóbico que el amino, se cree que tiene relación con las interacciones hidrofóbicas con la membrana.

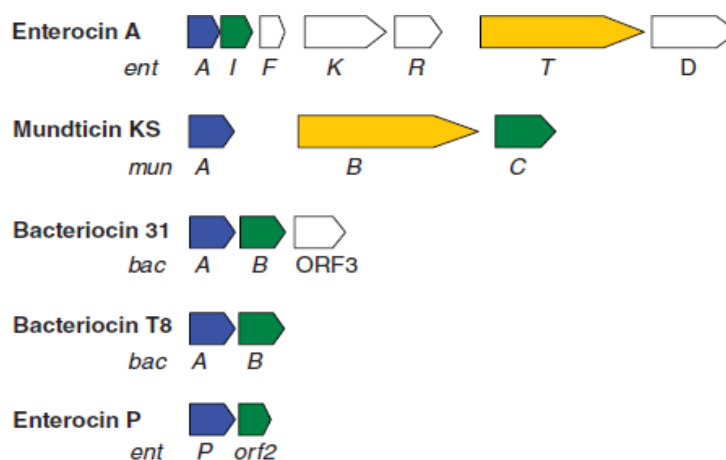
Las grandes proteínas bacteriolíticas (bacteriolisinas o clase III de las bacteriocinas) como la lisostafina, pueden funcionar directamente en la pared celular de blancos gram positivos, conduciendo a la muerte y lisis de la célula (Cotter y col., 2005; figura 1).



**Figura 1.** Mecanismos de acción de bacteriocinas  
Fuente: Cotter y col., 2005

### 2.3.4.4 Biosíntesis de bacteriocinas

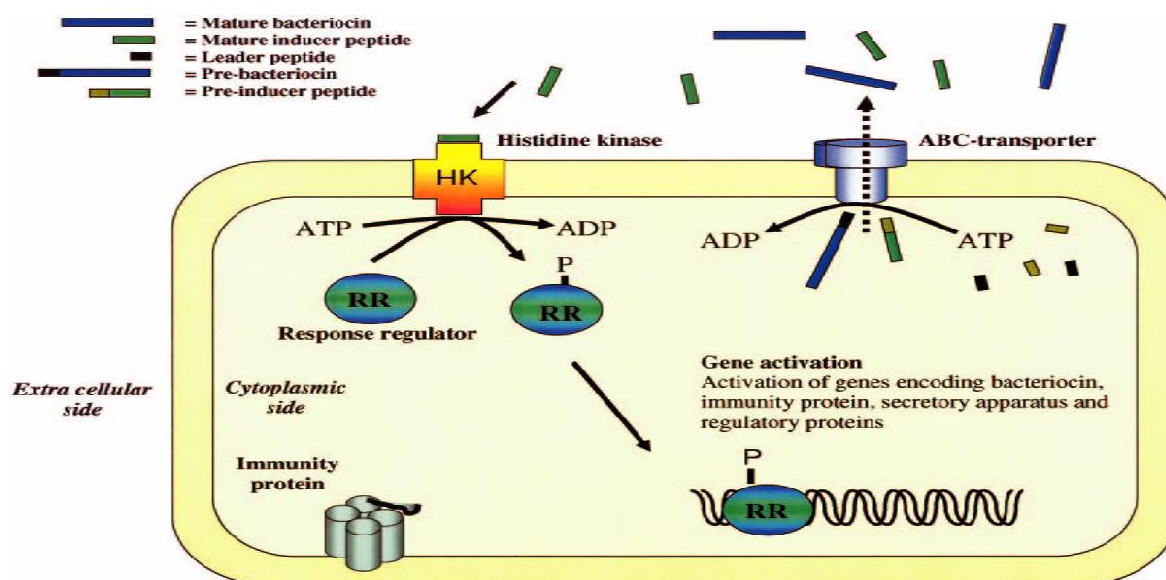
Debido a su naturaleza protéica, las bacteriocinas son sintetizadas mediante mecanismos ribosomales que involucran transcripción y traducción. Los genes que codifican para la producción de las bacteriocinas y la inmunidad a las mismas están usualmente organizados en grupos de operones localizados en el cromosoma o en plásmidos (Chen y Hoover, 2003; Yin y col., 2003; Drider y col., 2006). Por lo menos cuatro genes son requeridos para la producción de bacteriocinas de la clase IIa: el gen estructural de la prebacteriocina, el gen de inmunidad, el gen que codifica para el sistema de secreción ABC de la bacteriocina y el gen de inducción (Ennahar y col., 2000; Nes y col., 2002). Las bacteriocinas de la clase IIa caracterizadas genéticamente hasta la fecha están formadas por uno o cuatro genes en un operón; la pediocina PA-1, por ejemplo, contiene los cuatro genes necesarios para la producción y exportación de la bacteriocina en el mismo operón. En otros casos, los genes son distribuidos en varios operones, y un operón contiene el gen estructural y de inmunidad, un segundo operón contiene el gen de secreción de la bacteriocina y un tercer operón contiene los genes necesarios para la regulación de la producción de la bacteriocina (figura 2; Ennahar y col., 2000; Franz y col., 2007).



**Figura 2.** Representación de determinantes genéticos del operón necesarios para secretar una bacteriocina. Bacteriocina inmadura-prepéptido (Azul), inmunidad (verde), sistema de transporte ABC (amarillo), proteínas accesorias-inducción (blanco).

Fuente: Franz y col., 2007.

Muchas bacteriocinas son sintetizadas biológicamente como un prepéptido inactivo que porta un péptido guía N-terminal. La biosíntesis de las bacteriocinas parte, en general, de la formación del prepéptido, el cual es eliminado en un sitio proteolítico específico (doble glicina) durante la secreción por el sistema ABC, para así obtener un péptido maduro (bacteriocina madura) al cruzar la membrana citoplasmática. Al mismo tiempo, se sintetiza el prepéptido de inducción, que también sufre procesos de maduración y secreción. Una vez secretado, interacciona con un receptor de membrana que contiene un dominio histidin quinasa (o cinasa) que fosforila a una proteína reguladora de respuesta citoplásmica, que a su vez activa la transcripción de los operones involucrados en la síntesis de la bacteriocina (Figura 3; Chen y Hoover, 2003; Drider y col., 2006).



**Figura 3.** Biosíntesis de las bacteriocinas de la clase IIa.

Fuente: Drider y col., 2006

## 2.4 RESISTENCIA A BACTERIOCINAS

Una vez determinado que un nuevo conservante es seguro y efectivo, es importante asegurar la longevidad de su uso previniendo la proliferación de células resistentes. De hecho, las células son capaces de presentar resistencia frente a diversos antibióticos, y se ha documentado la transferencia de resistencia entre diferentes organismos, como ya se mencionó anteriormente. Aunque las bacteriocinas no son antibióticos, preocupa el hecho de

que la exposición a las bacteriocinas de lugar a células con una mayor resistencia a los antibióticos. La resistencia a antibióticos, no obstante, se asocia usualmente con determinantes genéticos, a diferencia de lo que ocurre con la resistencia a la mayoría de las bacteriocinas, en la que la causa más común es algún tipo de adaptación al medio o cambios fisiológicos en la membrana de la célula diana (Crandall y Monville, 1998). Recientemente se ha descrito que las células de *L. monocytogenes* resistentes a bacteriocinas de la subclase IIa contienen niveles superiores de fosfatidilglicerol con cadenas acilo cortas (Vadivaloo y col., 2002), lo que les proporciona una membrana más fluida. Aunque la mayoría de las investigaciones demuestran que los cambios en la composición de la membrana citoplasmática son los responsables de la resistencia, algunos mutantes poseen una enzima, nisinasasa, que degrada la nisina (Jarvis, 1967).

Chikindas y col. (2004) observaron que la nisina adicionada en altas concentraciones favorecía la aparición de resistencia a la acción de la bacteriocina en *L. monocytogenes*, lo que les llevó a realizar un estudio en el que añadieron la bacteriocina de manera controlada en un caldo de cultivo (partiendo de un concentración inicial de 200 hasta 1000 UI/mL), simulándose un efecto de liberación gradual de la nisina. Este estudio lo compararon con la adición directa de 1000 UI/mL del compuesto, encontrando resultados que indican que la inhibición de *L. monocytogenes* es lineal con respecto al aumento de la concentración de la bacteriocina. La inhibición de dicha bacteriocina, por el contrario, fue mayor con respecto al tiempo a bajas concentraciones de la misma, por lo que los autores supusieron que *L. monocytogenes* desarrolla un mecanismo de defensa a altas concentraciones de bacteriocina. Por otra parte, se observó este mismo efecto en bacteriocinas de la clase IIa (como pediocina y leucocina), lo cual es un punto considerable de decisión para que este tipo de compuestos sea aplicable en alimentos (Gravesen y col., 2002a).

Algunos de los mecanismos propuestos para la resistencia a bacteriocinas de *Listeria monocytogenes* (ausencia de la subunidad EII<sub>ab</sub> del sistema fosfotransferasa, cambio en el metabolismo de *Listeria monocytogenes* y cambio en la composición de la membrana celular) pueden involucrar un cambio en el genoma de las cepas resistentes, lo cual indicaría una resistencia permanente y no temporal causada por el estrés del medio.



### 3. Antecedentes

La utilización de enterococos como cultivos iniciadores productores de bacteriocinas como preservantes naturales en alimentos ha despertado gran interés. En los últimos años se han realizado grandes avances en los conocimientos sobre los mecanismos de acción, estructura, síntesis y caracterización molecular de estas sustancias. Sin embargo, el surgimiento de cepas resistentes a bacteriocinas hizo necesaria la ampliación de los estudios en este campo.

En 1996 se aceptó en Inglaterra el uso de *E. faecium* K77D como cultivo iniciador en productos fermentados (ACNFP, 1996). Eaton y Gasson (2001) estudiaron diferentes cepas aisladas de alimentos y de hospitales, encontrando que las cepas de alimentos contienen algunos factores de virulencia similares a los aislados clínicos. Yousif y col. (2005) caracterizaron cepas de varios enterococos asociados a la fermentación de un producto africano, encontrando cuatro cepas como posibles candidatas a cultivos iniciadores que producen bacteriocinas y no presentan factores de riesgo para la salud. Shin y col. (2008) estudiaron cepas aisladas del tracto gastrointestinal de pollos, encontrando dos cepas de enterococos capaces de producir las enterocinas A, B y L50, además de tener efecto probiótico *in vitro*. Sparo y col. (2008) utilizaron la cepa *Enterococcus faecalis* CECT7121, aislada de maíz, como cultivo iniciador en la fabricación de embutidos secos fermentados en ausencia de nitritos, encontrando un producto final sin diferencias significativas en color, sabor, aroma o calidad microbiológica con respecto a su control. Recientemente, Vure y Halami (2009) y Ben Belgacem y col. (2010) evaluaron algunas propiedades tecnológicas, aspectos de seguridad alimenticia, actividad antimicrobiana, capacidad de producir bacteriocinas y aplicaciones como probióticos de cepas de enterococos aisladas de leche fermentada y carne, respectivamente.

En estudios preliminares realizados en el Laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, se ha reportado que las cepas *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Enterococcus faecalis* MXVK22, aisladas de productos cárnicos, tenían la capacidad de producir compuestos antimicrobianos de tipo bacteriocinas.

Los resultados obtenidos indicaron que estas cepas producen bacteriocinas termotolerantes, con inmunidad para su cepa productora y con pesos moleculares aparentes menores a 5 kDa. Además, el espectro de inhibición de la bacteriocina producida por *E. faecalis* MXVK22 es mayor al de la bacteriocina producida por *E. faecium* MXVK29, ya que la primera tiene una alta actividad antilisteria, además de inhibir a *Brochothrix thermosphacta* y *Clostridium sporogenes* (Schneider, 2005; Álvarez-Cisneros, 2007).

## 4. Hipótesis

- ✚ Si *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Enterococcus faecalis* MXVK22 son considerados futuros cultivos iniciadores para la fermentación de productos cárnicos, éstos deben producir por lo menos una bacteriocina de la clase II, además de no presentar factores de virulencia y/o resistencia a antibióticos.

## 5. Objetivos

### 5.1 General:

- ✚ Evaluar cepas de enterococos productoras de bacteriocinas como posibles cultivos iniciadores.

### 5.2 Particulares:

- Obtener la cinética de crecimiento y producción de bacteriocinas en *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Enterococcus faecalis* MXVK22.
- Generar un extracto crudo de las enterocinas producidas por *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Enterococcus faecalis* MXVK22 y determinar su concentración mínima inhibitoria.
- Establecer si cepas de *Listeria* sp. presentan resistencia a diferentes concentraciones de enterocina y comparar las cepas resistentes obtenidas con las silvertres.
- Determinar la presencia de factores de virulencia, resistencia a antibióticos y capacidad de producir aminas biogénicas como descriptores de los aspectos de seguridad de *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Enterococcus faecalis* MXVK22.
- Identificar el gen de producción y genes accesorios de las bacteriocinas identificadas; así como realizar comparaciones con otras bacteriocinas descritas anteriormente.

## 6. Materialés y métodos

### 6.1 METODOLOGÍA GENERAL

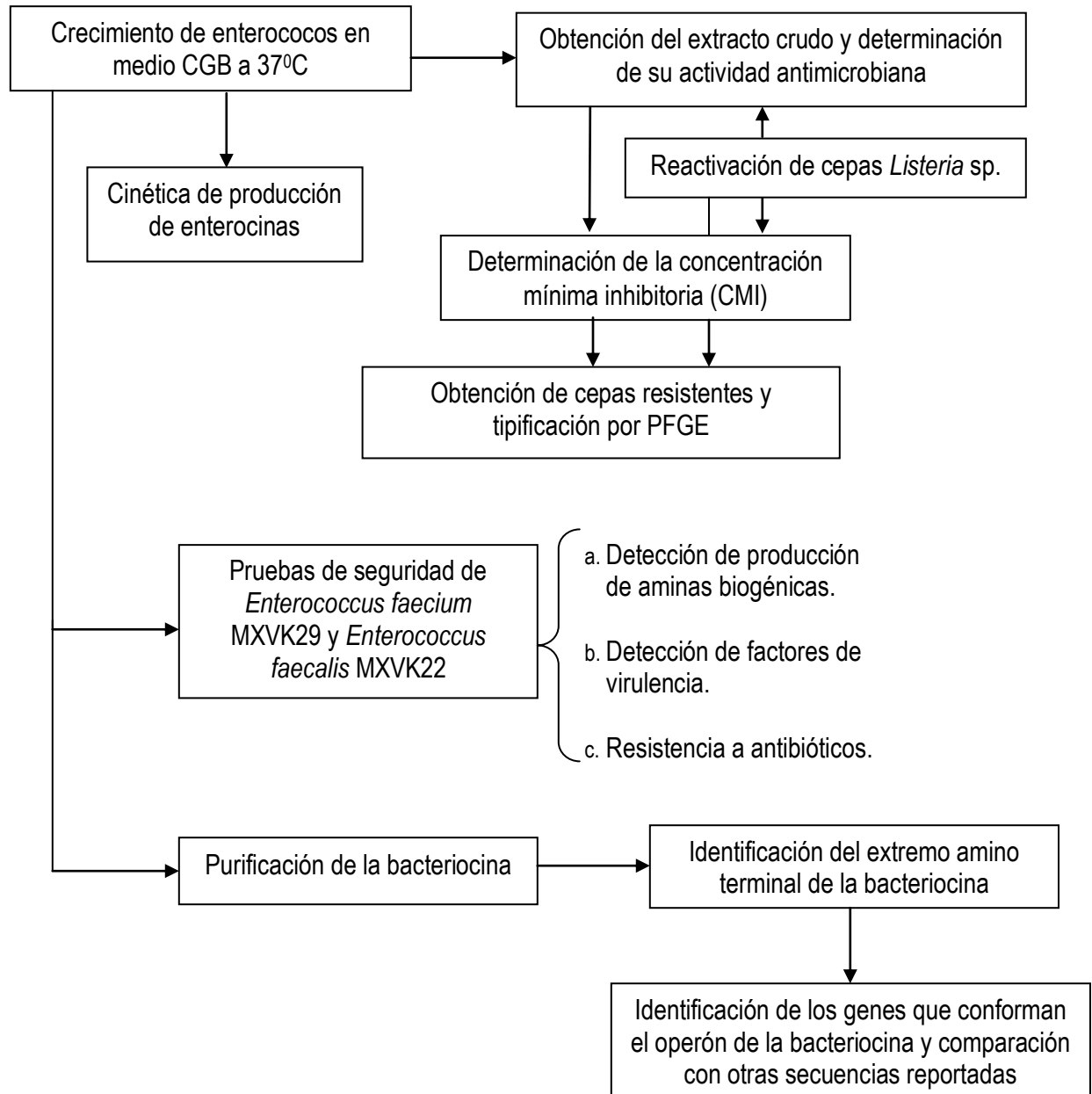


Figura 4. Metodología general.

## 6.2. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Las cepas *Enterococcus faecium* MXVK29, *Enterococcus faecalis* MXVK22 y *Pediococcus acidilactici* fueron aisladas de chorizo mexicano por el grupo de trabajo del Dr. M. Collins de la Queen's University of Belfast. Las cepas utilizadas como controles fueron *Enterococcus faecalis* NCIMB-700585, *Enterococcus faecium* SF68 y *Enterococcus faecalis* ATCC29212, (donada por la Dra. Sainz de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco). Las cepas se conservaron en viales con glicerol al 50%, a -80°C. Las cepas de *Listeria* sp. fueron obtenidas de diferentes fuentes (tabla 2). *Enterococcus* sp. fue reactivada en medio CGB (caldo caseína-glucosa; extracto de levadura 0.5% (Bioxon, México), peptona biotriptasa 2% (Bioxon, México), dextrosa 1% (Bioxon, México), sulfato de manganeso 0.005% (J.T. Baker, México), citrato de amonio 0.2% (J.T. Baker, México), fosfato disódico 0.2% (J.T. Baker, México), sulfato de magnesio 0.01% (J.T. Baker, México), tween 80 0.10% (Hycel, México), a pH 7 y 37°C. Las cepas productoras de bacteriocina se incubaron en condiciones de anaerobiosis, para descartar presencia de halos derivados de la producción de peróxido de hidrógeno. Las cepas de *Listeria* sp. fueron incubadas a 37°C en caldo TSB (soya-tripticosa, Difco Laboratories, Detroit, Michigan).

**Tabla 2.** Cepas de *Listeria* sp. utilizadas en el análisis de resistencia.

| Microorganismo   |
|--|
| <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 <sup>a</sup>           |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ScottA <sup>b</sup>        |
| <i>Listeria monocytogenes</i> LM82 <sup>c</sup>          |
| <i>Listeria monocytogenes</i> LMB 911204/47 <sup>b</sup> |

<sup>a</sup>Christian Hansen, Horsholm, Dinamarca.

<sup>b</sup>Dr. Iniesta, Universidad de Murcia, España.

<sup>c</sup>Dr. Urruburu, Universidad de Valencia, España.

### **6.3 EXTRACCIÓN DE LA ENTEROCINA**

El extracto crudo de bacteriocina se obtuvo a partir de un cultivo de 16 horas de *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Enterococcus faecalis* MXVK22. El extracto crudo fue sometido a un calentamiento a 70°C durante 30 minutos para la inactivación de las proteasas que pudieran estar presentes en el medio (Katla y col., 2003), seguido de una centrifugación a 3100 ×g durante 10 minutos a 4°C. Una vez centrifugado, se colectó el sobrenadante y se ajustó el pH a un valor de 6.5; posteriormente se filtró a través de membranas estériles Millipore (Durapore® Membrane Filters, GV, Irlanda) con tamaño de poro de 0.22 µm. El filtrado obtenido se liofilizó y almacenó a -80°C hasta su uso, etiquetándose como extracto crudo de bacteriocina (ECB). Para evaluar la cinética de producción de la bacteriocina sólo se trabajó con el filtrado.

### **6.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA**

La actividad inhibitoria del compuesto se midió por el método de difusión en agar (Schillinger y Lücke, 1989), con modificaciones. La técnica consistió en realizar diluciones seriadas del ECB y depositar 30 µL de las diluciones en pozos hechos con una pipeta Pasteur estéril en medio TSB semisólido (0.8% de agar bacteriológico) superpuesto sobre una capa del mismo medio pero con 1.5% de agar bacteriológico. El medio semisólido fue previamente inoculado con 70 µL de un cultivo en fase logarítmica ( $D_{O_{600nm}}=0.3$ ,  $10^6$ - $10^7$  ufc/mL) de la cepa sensible *Listeria innocua* ATCC33090. La actividad se evaluó determinando el halo de inhibición formado sobre la cepa sensible, una vez incubada la placa a 37°C durante 24 h.

La actividad se reportó en unidades arbitrarias por mililitro (UA/mL), estando definida una UA como el inverso de la máxima dilución (base 2) con la cual se obtiene un halo de inhibición de 2 mm de diámetro dividido por el volumen colocado en cada pozo del compuesto antimicrobiano y multiplicado por un factor de conversión de µL a mL ( $D \times 1000/30$ , donde D= inverso dilución) (Bhunias y col., 1991; Chikindas y col., 2004).

## **6.5 CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE ENTEROCINAS**

Se inocularon matraces de 500 mL de caldo de cultivo CGB con 1% (v/v) de inóculo de 14 horas de *E. faecium* MXVK29 y *E. faecalis* MXVK22, y se incubaron a 37°C durante 30 horas. Se tomaron alícuotas de 10 mL con intervalos de dos horas para analizar el crecimiento celular (UFC/mL), pH y actividad antimicrobiana del extracto crudo de bacteriocina.

## **6.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA**

### **6.6.1 Perfil de crecimiento de *Listeria* sp. en presencia de bacteriocina**

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). Por una parte se realizó la preparación del inóculo, de acuerdo a las especificaciones del CLSI (2006), transfiriéndose de 4 a 5 colonias de *Listeria* sp. a un tubo con solución fisiológica (0.85%), y ajustándose la turbidez hasta que ésta se equiparó al estándar 0.5 de la escala de MacFarland (equivale aproximadamente a  $1 \times 10^8$  UFC/mL; si es necesario se puede agregar más solución fisiológica). Una vez obtenido este inóculo se realizó una dilución de 1/100 ( $1 \times 10^6$  UFC/mL) y ésta fue almacenada en refrigeración hasta su uso (no superándose en ningún caso los 15 minutos). Por otra parte, se preparó el stock del extracto de bacteriocina, disolviendo un gramo de ECB en agua destilada estéril, y esterilizando posteriormente la solución por filtración (membranas estériles Millipore, Durapore® Membrane Filters, GV, Irlanda, con tamaño de poro de 0.22  $\mu$ m). Una vez hecho esto, se utilizó un método cualitativo de dilución en caldo (López-Malo y col., 2005), que ayuda a conocer la concentración en la cual un antimicrobiano es letal para un microorganismo sensible. Este método consiste en realizar diluciones de dos en dos del stock con el inóculo de la cepa de interés, de tal forma que se diluyen a la mitad las concentraciones y el inóculo (previamente preparado) hasta llegar a una concentración de 62.5 mg/mL y  $5 \times 10^5$  UFC/mL (ECB e inóculo, respectivamente; CLSI, 2006). Se utilizó un control positivo (caldo TSB sin bacteriocina) y un control negativo (caldo TSB sin inóculo). Los diferentes tubos se incubaron a 37°C durante 24 horas, con agitación de 150 rpm, y se tomaron alícuotas en seis tiempos diferentes (0, 2, 4, 6, 12 y 24 horas) para

determinar el número de microorganismos viables. Finalmente se realizó la curva letal de tiempo, que consiste en graficar el logaritmo de las UFC/mL contra el tiempo, promediándose los respectivos duplicados. Una vez realizados estos gráficos se obtuvieron los parámetros cinéticos de velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) y tiempo de latencia (t-lag) con el programa MicroFit© v.1.0. (creado por el Dr. Meter D.G. Wilson, Institute of Food Research).

### **6.6.2 Obtención de un modelo matemático para determinar la concentración mínima inhibitoria**

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la mínima concentración del compuesto antimicrobiano que se necesita para inhibir el crecimiento de un microorganismo después de 24 horas de incubación (Madigan y col., 1998). Para calcular la concentración mínima inhibitoria se siguió el modelo propuesto por Olivera y col. (2001):

$$\mu = \mu_T - K \times C$$

Donde:

$\mu$  = velocidad específica de crecimiento ( $\text{min}^{-1}$ ).

$\mu_T$  = velocidad de crecimiento en cultivo libre de bacteriocina (control positivo,  $\text{min}^{-1}$ ).

$K$  = velocidad específica de inhibición ( $\text{mL} \times \mu\text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ).

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

Para obtener el modelo se graficaron las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) de cada una de las cepas de *Listeria* (obtenidas en el apartado anterior) contra las diferentes concentraciones de bacteriocina ( $C$ ) probadas (2133, 1066, 533, 267 y 133 UA/mL). Se obtuvo el modelo matemático para cada cepa y cada línea de tendencia se extrapoló hasta que la velocidad de crecimiento fuese cero ( $\mu = 0$ ), es decir, la concentración de bacteriocina en la que no se presentaría crecimiento, obteniéndose de esta forma la CMI.



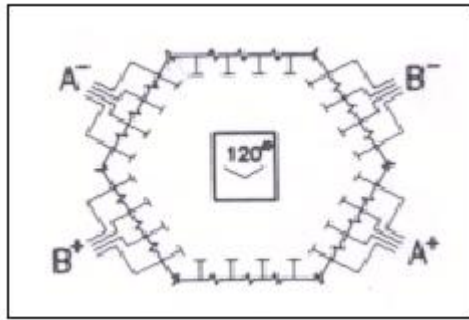
## **6.7 OBTENCIÓN DE CEPAS RESISTENTES A LA BACTERIOCINA**

Para realizar esta prueba se utilizaron cepas de *Listeria* sp., ya que se ha reportado que estas presentan cierta resistencia a altas concentraciones de compuestos antimicrobianos producidos por BAL (Chikindas y col., 2004). Cada una de las cepas de *Listeria* sp. fueron inoculadas como se indica en el apartado 6.5.1, para obtener una concentración final de inóculo de  $5 \times 10^5$  UFC/mL y una concentración final de bacteriocina de 1066 UA/mL, incubándose a 37°C con agitación de 150 rpm durante 12 horas. Pasado este tiempo se adicionó nuevamente bacteriocina en el caldo de cultivo, cada 24 horas y de forma controlada, hasta completar 4264 UA/mL (CMI máxima para cepas de *Listeria* sp.), simulando el efecto de liberación gradual de la bacteriocina en algún alimento. Una vez expuestas las cepas de *Listeria* a la bacteriocina se realizaron cinéticas de crecimiento (apartado 6.5.1) en presencia de la bacteriocina (1066 UA/mL), para verificar que fueran resistentes reales y no se tratara sólo de un fenómeno temporal (Chikindas y col., 2004).

### **6.7.1 Perfil genómico de cepas silvestres y resistentes de *Listeria* sp**

Este experimento fue diseñado con la finalidad de comprobar si las cepas resistentes obtenidas en la sección anterior son resistentes causadas por el estrés del medio en el que se generaron o si, por el contrario, la resistencia se presenta a nivel genómico con alguna diferencia en el ADN de la cepa resistente en comparación con la cepa silvestre (no resistente). Para obtener el perfil genómico se usó la metodología descrita por Graves y Swaminathan (2001), con modificaciones, la cual se basa en la electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés).

La electroforesis en gel por campos pulsados separa moléculas de ADN en matrices de agarosa sometiéndolas a campos eléctricos que se alternan en dos direcciones. Esta técnica molecular permite tipificar cepas de la misma especie, para así poder determinar diferencias genéticas entre ellas por medio de la digestión y separación de moléculas de ADN total con tamaños desde 20 kpb hasta 10 Mpb. De todos los sistemas desarrollados, el más extendido ha sido el CHEF (Clamped Homogeneous Electric Field electrophoresis), que se caracteriza por obtener líneas rectas empleando campos homogéneos. En este sistema, se utiliza un arreglo hexagonal con veinticuatro electrodos (figura 5).



**Figura 5.** Esquema de la distribución de electrodos en el sistema CHEF de electroforesis en campo pulsado. El ángulo señalado ( $120^\circ$ ) es el de reorientación entre el campo eléctrico A y el B.

En función del número de diferencias entre dos patrones (Tenover y col., 1995), las diferencias entre cepas de la misma especie se clasifican en:

**a.- Idénticas, iguales o indistinguibles (similitud 100%):** Cuando dos cepas presentan el mismo número de bandas y éstas tienen aparentemente el mismo tamaño, se dice que ambas representan la misma clona.

**b.- Cercanamente relacionadas (similitud del 85-100%):** Cuando el número de diferencias es inferior o igual a 3. Esto es debido a que un único cambio genético (mutación espontánea que afecte un lugar de restricción) se traduce en un máximo de tres diferencias entre los patrones de una cepa y su ancestro. En este caso, las dos cepas pueden considerarse genéticamente relacionadas (una subtipo de la otra o ambas derivadas de un ancestro común).

**c.- Posiblemente relacionadas (similitud del 65-85%):** Cuando los cambios entre dos patrones pueden ser atribuidos a dos hechos genéticos independientes, el número de cambios puede llegar a ser hasta de 6 (inserciones o deleciones de ADN, o ganancia o pérdida de sitios de restricción).

**d.- No relacionadas (similitud menor al 65%):** Cuando los cambios entre los dos patrones son atribuibles a tres o más cambios genéticos independientes, lo cual se traduce en un número de diferencias superior a 6. En este caso se interpreta que las dos cepas pertenecen a clones distintos, sin ninguna relación.

### **6.7.1.1 Preparación del ADN genómico**

Las cepas de *Listeria* sp. resistentes y silvestres fueron sembradas en cajas de Petri con TSA (agar soya tripticaseína) e incubadas a 37°C durante 24 horas. Se seleccionó una colonia y se transfirió a un tubo con TSB (con la finalidad de obtener un cultivo joven de bacterias y un ADN en excelentes condiciones), el cual fue incubado a 37°C durante toda la noche. Se verificó la concentración del cultivo en un Densimat (bioMérieux, SA, Francia) hasta obtener una medición de 3 según la escala de MacFarland ( $1 \times 10^9$  bacterias/mL). A continuación se tomó 1 mL de cultivo en tubos de microcentrífuga estériles de 2 mL y se centrifugó a  $4000 \times g$  durante 20 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 200  $\mu$ L de TE (1 mM EDTA pH 8 y 10 mM Tris-HCl pH 8), centrifugándose nuevamente durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y se agregaron 140  $\mu$ L de TE y 60  $\mu$ L de lisozima 10 mg/mL (Sigma), se mezclaron las soluciones con las células hasta que se disgregó el botón celular y la mezcla se incubó a 37°C durante 10 minutos en baño de agua. Se agregaron 200  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión 1.6% (Certified<sup>TM</sup>, Bio-Rad) disuelta en una solución de SDS 1% (J.T. Baker, Germany) y Proteinasa K 0.2 mg/mL (Promega) preparada previamente con agua destilada estéril. Se mezcló, resuspendiendo completamente el paquete celular, y se depositó la suspensión en los moldes para pozos (Bio-Rad, Hércules, CA), dejando un menisco y refrigerándose durante 15 minutos. Cada trozo de agarosa se transfirió a un tubo cónico de polipropileno con 4 mL de buffer de lisis (50 mM Tris pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 1% Lauril sarcosina sódica pH 7.6 y 0.15 mg/mL de Proteinasa K) y se incubó a 50-54°C durante 2 horas en baño de agua. Se recuperó el trozo de agarosa de la solución, se lavó en un microtubo de 1.5 mL con agua destilada estéril precalentada (50-54°C) y se incubó durante 10 minutos a 54°C (este paso de lavado se repitió 3 veces). Se lavó el trozo de agarosa de nuevo, ahora con TE precalentado (50-54°C) y se incubó durante 15 minutos a 54°C (este paso de lavado se repitió en 6 ocasiones). Una vez terminados los lavados, el trozo de agarosa se almacenó en TE a 4°C hasta su uso (no superándose en ningún caso las 24 horas).

### **6.7.1.2 Digestión de ADN genómico**

Se dejó estabilizar medio trozo de agarosa con el ADN durante 30 minutos con buffer # 4 (correspondiente a la enzima de restricción *AscI*). El trozo de agarosa fue digerido con la enzima de restricción *AscI* (New England BioLabs), utilizando una concentración de 20 unidades de enzima por trozo de agarosa y un tiempo de incubación de 4 horas a 37°C.

### **6.7.1.3 Electroforesis en campos pulsado**

Los fragmentos de ADN digeridos dentro del trozo de agarosa fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa para PFGE al 0.8% (Pulsed Field Certified Agarose, Ultra Pure DNA Grade Agarosa, Bio-Rad) en buffer TBE 0.5X (Tris-Borato-EDTA). Una vez solidificado el gel, se incorporó cada medio trozo de agarosa en un pozo y se aplicó encima una capa de agarosa al 2% como sellador. La separación electroforética se llevó a cabo en un equipo de electroforesis en campo pulsado CHEF-DR II (Bio-Rad) con buffer TBE 0.5X. Las condiciones electroforéticas fueron las siguientes: 6 volts/cm (cambio de orientación inicial 5 s, cambio de orientación final 45 s) durante 22 horas a 14°C. Después de la electroforesis, los geles fueron teñidos 15-20 minutos en bromuro de etidio (10 mg/mL) y observados en un transiluminador Gel Doc XR (Bio-Rad), utilizando el software Quantity One para su interpretación.

### **6.7.1.4 Análisis de los patrones de PFGE**

Los perfiles electroforéticos obtenidos por PFGE se analizaron con el software Gene Tool y Gene Directory (Syngene, Versión 2.01.00, UK) para obtener los dendrogramas. El método de alineación utilizado fue UPGMA (*Unweighted Pair Group with Mathematical Average*), basado en un coeficiente de similitud “Dice” y una tolerancia en la posición de bandas de 1.25%. Los dendrogramas fueron comparados de acuerdo al criterio de tipificación de cepas bacterianas (Tenover y col. 1995), para determinar si existían diferencias entre las cepas en estudio.

## **6.8 ASPECTOS DE SEGURIDAD DE CEPAS DE ENTEROCOCOS**

### **6.8.1 Extracción de ADN**

El ADN genómico de *Enterococcus* sp. fue extraído de un cultivo de 18 horas en caldo CGB, siguiendo las especificaciones del manual de Promega para el Kit Wizard Genomic DNA Purification. Para corroborar la presencia e integridad del ADN de interés se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v).

### **6.8.2 Detección de factores de virulencia por PCR**

#### **6.8.2.1 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)**

El ADN total de las diferentes cepas fue usado en las reacciones de PCR para detectar la presencia de genes involucrados en la expresión de citolisina (*cylA*, *cylB* y *cylM*), sustancias de agregación (*agg*), gelatinasa (*gelE*), proteína superficial enterococal (*esp*), adhesinas de la pared celular de *E. faecalis* y *E. faecium* (*efaA<sub>fs</sub>* y *efaA<sub>fm</sub>*, respectivamente) y feromonas sexuales (*cpd*, *cob* y *ccf*), de acuerdo con Eaton y Gasson (2001), y de la adhesina de colágeno (*ace*) (Duprè y col., 2003). Los cebadores utilizados y el tamaño del producto de amplificación se muestran en la tabla 3. Las cepas *E. faecalis* NCIMB-700558, *E. faecalis* ATCC29212 y *E. faecium* SF68 (probiótico comercial) fueron usadas como controles para las correspondientes reacciones de PCR.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ L, usando 10  $\mu$ L de ADN genómico (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L), 2  $\mu$ L de cada cebador 20  $\mu$ M (dos oligonucleótidos para cada gen), 5  $\mu$ L de buffer 10X sin color, 5  $\mu$ L de  $MgCl_2$  25 mM, 2  $\mu$ L de mezcla de nucleótidos 10 mM y 0.5  $\mu$ L de Go Taq-DNA polimerasa 5 U/ $\mu$ L (todos los reactivos de la mezcla fueron adquiridos a Promega, excepto los cebadores). Se realizó una mezcla para seis reacciones sin agregar el ADN para cada gen y esta se dividió en seis partes iguales; finalmente a cada fracción se le agregaron los 10  $\mu$ L de ADN de cada una de las cepas a probar (*E. faecalis* MXVK22, *E. faecium* MXVK29, las tres cepas control y el control de reacción) y se introdujeron al termociclador, programado previamente con el tiempo y número total de ciclos para cada etapa. Las condiciones de la reacción fueron desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, alineamiento o hibridación a 54°C durante 1

minuto y polimerización o extensión a 72°C durante 1 minuto. Finalmente, se realizó una extensión final a 72°C durante 5 minutos. El tamaño de los productos de PCR se determinó mediante electroforesis en agarosa 1% (p/v) y se comparó con los tamaños reportados en la literatura (tabla 3).

**Tabla 3.** Cebadores utilizados para PCR y productos para la detección de factores de virulencia.

| <b>Gen</b>    | <b>Cebador*</b> | <b>Secuencia 5' – 3'</b>       | <b>Tamaño del producto (pb)</b> |
|---------------|-----------------|--------------------------------|---------------------------------|
| <i>agg</i>    | TE3             | AAG AAA AAG AAG TAG ACC AAC    | 1553                            |
|               | TE4             | AAA CGG CAA GAC AAG TAA ATA    |                                 |
| <i>gelE</i>   | TE9             | ACC CCG TAT CAT TGG TTT        | 419                             |
|               | TE10            | ACG CAT TGC TTT TCC ATC        |                                 |
| <i>cylM</i>   | TE13            | CTG ATG GAA AGA AGA TAG TAT    | 742                             |
|               | TE14            | TGA GTT GGT CTG ATT ACA TTT    |                                 |
| <i>cylB</i>   | TE15            | ATT CCT ACC TAT GTT CTG TTA    | 843                             |
|               | TE16            | AAT AAA CTC TTC TTT TCC AAC    |                                 |
| <i>cylA</i>   | TE17            | TGG ATG ATA GTG ATA GGA AGT    | 517                             |
|               | TE18            | TCT ACA GTA AAT CTT TCG TCA    |                                 |
| <i>esp</i>    | TE34            | TTG CTA ATG CTA GTC CAC GAC C  | 933                             |
|               | TE36            | GCG TCA ACA CTT GCA TTG CCG AA |                                 |
| <i>efaAfs</i> | TE5             | GAC AGA CCC TCA CGA ATA        | 705                             |
|               | TE6             | AGT TCA TCA TGC TGT AGTA       |                                 |
| <i>efaAfm</i> | TE37            | AAC AGA TCC GCA TGA ATA        | 735                             |
|               | TE38            | CAT TTCATCATC TGA TAG TA       |                                 |
| <i>cpd</i>    | TE51            | TGG TGG GTT ATT TTT CAA TTC    | 782                             |
|               | TE52            | TAC GGC TCT GGC TTA CTA        |                                 |
| <i>cob</i>    | TE49            | AAC ATT CAG CAA ACA AAG C      | 1405                            |
|               | TE50            | TTG TCA TAA AGA GTG GTC AT     |                                 |
| <i>ccf</i>    | TE53            | GGG AAT TGA GTA GTG AAG AAG    | 543                             |
|               | TE54            | AGC CGC TAA AAT CGG TAA AAT    |                                 |
| <i>ace</i>    | ACE1            | AAA GTA GAA TTA GAT CCA CAC    | 350                             |
|               | ACE2            | TCT ATC ACA TTC GGT TGC G      |                                 |

\*Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por Invitrogen-Accesolab.

### **6.8.3 Determinación de la susceptibilidad a antibióticos**

#### **6.8.3.1 Método de difusión en agar**

La prueba de susceptibilidad a antibióticos se realizó de acuerdo al método de difusión en disco del CLSI (2006). La técnica consistió en tomar de 4 a 5 colonias de *Enterococcus* sp. aisladas de la misma morfología, de una placa de aislamiento de CGB y transferirlas a un tubo que contenía 4-5 mL de suero fisiológico, incubándose el microorganismo hasta que la turbidez se equiparara a la del estándar 0.5 de MacFarland. No más de 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión, se sumergió un hisopo estéril en la misma y se rotó varias veces, presionando firmemente en la pared interior del tubo para eliminar el exceso de inóculo.

Se sembró el inóculo en placas de agar Mueller-Hinton (AMH) con la superficie seca, estriando el hisopo sobre la totalidad de la superficie de agar (este procedimiento se repitió tres veces, rotándose 60° la placa cada vez para asegurar una distribución uniforme del inóculo). Las placas se dejaron secar 3-5 minutos, sin exceder los 15 minutos, para eliminar el exceso de humedad superficial antes de aplicar los discos de antibióticos. Se colocaron uniformemente los discos apropiados en la superficie de la placa de agar, utilizando una pinza estéril (el disco no debe ser movido una vez que haya tenido contacto con la superficie del agar, ya que el antibiótico difunde rápidamente). Se incubó en condiciones aerobias a 37°C durante 16-18 horas (24 horas en el caso de la vancomicina) y se examinó cada placa, midiendo los diámetros de las zonas de inhibición completa, incluyendo el diámetro del disco. Los siguientes antibióticos fueron usados (BBL™ Sensi-Disc™, Becton, Dickinson and Company): cloranfenicol (C, 30 µg), cloxacilina (CX, 1 µg), eritromicina (E, 15 µg), gentamicina (GM, 10 µg), kanamicina (K, 30 µg), neomicina (N, 30 µg), netilmicina (NET, 30 µg), penicilina (P, 10 unidades internacionales), tetraciclina (TE, 30 µg) y vancomicina (VA, 30 µg). El nivel de susceptibilidad para cada cepa de enterococo fue reportado como resistente, intermedio o sensible, de acuerdo a las recomendaciones del CLSI (2006). *Enterococcus faecalis* ATCC29212 fue utilizada como cepa control.

### **6.8.3.2 Determinación por PCR de la presencia de genes de resistencia**

Esta prueba se realizó con la finalidad de corroborar el método de difusión en agar, ya que en ocasiones se pueden presentar falsos positivos. Se determinaron cuatro de los principales grupos de antibióticos que presentan resistencia en microorganismos (tetraciclinas, cloranfenicol, penicilinas y vancomicina). La extracción del ADN genómico de *Enterococcus* sp. se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.8.1. El ADN total de las diferentes cepas fue usado en las reacciones de PCR para detectar la presencia de genes involucrados en la resistencia de tetraciclinas (*tetM* y *tetS*), cloranfenicol (*catA*), meticilina y antibióticos  $\beta$ -lactámicos (*mecA*) y vancomicina (*vanA*). Los cebadores utilizados y el tamaño del producto de amplificación se muestran en la tabla 4. La cepa *E. faecium* SF68 (probiótico comercial), *Pediococcus acidilactici* y *Staphylococcus aureus* fueron usados como controles para las correspondientes reacciones de PCR.

La reacción de PCR se llevó a cabo con las siguientes concentraciones: 10  $\mu$ L de buffer 10X sin color, 3.5  $\mu$ L de  $MgCl_2$  25 mM, 20  $\mu$ L de solución Q 5X, 2  $\mu$ L de una mezcla de nucleótidos 10 mM, 0.5  $\mu$ L de enzima a 5U/ $\mu$ L, 4  $\mu$ L de cada cebador 10  $\mu$ M (dos oligonucleótidos para cada gen) y 44 mL de agua Millipore estéril (todos los reactivos utilizados se encontraban incluidos en el Taq PCR Core Kit, de Qiagen; excepto los oligonucleótidos). Cada mezcla de reacción fue suficiente para preparar cuatro reacciones independientes; una vez divididas, a cada fracción se le agregaron 3  $\mu$ L de ADN genómico (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L), de cada una de las cepas a probar, con un volumen de reacción final de 25  $\mu$ L. Se introdujeron las muestras al termociclador, programado previamente con el tiempo y número total de ciclos para cada etapa. Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización inicial a 95°C durante 7 minutos (*mecA* y *vanA*) y 94°C durante 5 minutos (*catA*, *tetM* y *tetS*), seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C (*mecA* y *vanA*) y 94°C (*catA*, *tetM* y *tetS*) durante 30 segundos, alineamiento o hibridación 50°C (*catA* y *tetS*), 55°C (*mecA* y *tetM*), 58°C (*vanA*) durante 30 segundos y polimerización o extensión a 72°C durante 2 minutos; en todos los casos se realizó una extensión final a 72°C durante 10 minutos. El tamaño de los productos de PCR se determinó mediante electroforesis en agarosa 1.5% (p/v) con buffer TAE 1X y se comparó con los tamaños reportados en la literatura (tabla 4).



**Tabla 4.** Cebadores utilizados para la detección de genes de resistencia.

| Gen         | Cebador*           | Secuencia 5' – 3'  | Tamaño del producto (pb) |
|-------------|--------------------|--|--------------------------|
| <i>tetM</i> | Tet M-F<br>Tet M-R | ACA GAA AGC TTA TTA TAT AAC<br>TGG CGT GTC TAT GAT GTT CAC | 171                      |
| <i>tetS</i> | Tet S-F<br>Tet S-R | GAA AGC TTA CTA TAC AGT AGC<br>AGG AGT ATC TAC AAT ATT TAC | 169                      |
| <i>catA</i> | Cat A-F<br>Cat A-R | GGA TAT GAA ATT TAC CCC TC<br>CAA TCA TCT ACC CTA TGA AT   | 486                      |
| <i>mecA</i> | Mec A-F<br>Mec A-R | CTT TGC TAG AGT AGC ACT CG<br>GCT AGC CAT TCC TTT ATC TTG  | 500                      |
| <i>vanA</i> | Van A-F<br>Van A-R | GGC TGC GAT ATT CAA AGC TC<br>CCG GCT TAA CAA AAA CAG GA   | 157                      |

\*Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por Invitrogen-Accesolab.

#### 6.8.4 Determinación de la actividad amino-descarboxilasa

La capacidad aminogénica de los aislados se determinó cultivando a las cepas un medio de cultivo que promueve la actividad descarboxilasa descrito por Bover-Cid y Holzapfel (1999), el cual utiliza un medio base con los siguientes compuestos: triptona, extracto de carne, extracto de levadura y glucosa (0.5% de cada uno); cloruro de sodio (0.25%); sulfato de manganeso (0.005%); sulfato de hierro (0.004%); sulfato de magnesio (0.02%); citrato de amonio y fosfato de potasio (0.2%), carbonato de calcio (0.01%); Tween 80<sup>®</sup> (0.1%); agar bacteriológico (2%), piridoxal 5'-fosfato como cofactor de la reacción de descarboxilación y violeta de bromocresol como indicador de pH. Se utilizaron diferentes aminoácidos precursores (L-tirosina base libre, monoclóhidrato de L-histidina, monoclóhidrato de L-ornitina y monoclóhidrato de L-lisina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. EE.UU) en una concentración del 1%. El pH fue ajustado a 5.3 y el medio fue esterilizado a 121°C durante 10 minutos, para evitar la hidrólisis del agar en condiciones ácidas.

Antes de realizar la prueba, y para promover la inducción de la enzima descarboxilasa, las cepas de enterococos en estudio se cultivaron tres veces sucesivas en caldo CGB adicionado con 0.1% de cada aminoácido precursor y 0.005% de piridoxal 5'-fosfato. Un volumen (5  $\mu$ L) de cada cultivo de *Enterococcus* sp. fue colocado por duplicado sobre el medio descarboxilasa, gelificado previamente con y sin aminoácidos (como control). Los medios fueron incubados a 37°C durante 4 días (revisando las cajas cada 24 horas) bajo condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas.

## **6.9 PURIFICACIÓN DE LA BACTERIOCINA**

La semipurificación del compuesto antimicrobiano se llevó a cabo mediante la técnica de adsorción-desorción dependiente del pH (Yang y col. 1992), con algunas modificaciones (Schneider, 2005). Los cultivos de 16 horas de *Enterococcus* sp. fueron sometidos a un calentamiento a 70°C durante 30 minutos, para la inactivación de las proteasas (Katla y col., 2003) que pudieran estar presentes en el medio. Posteriormente, se ajustó el pH del cultivo a 5 con una solución 10 M de NaOH y se mantuvo en agitación moderada durante 4 horas a 4°C para permitir la adsorción del compuesto antimicrobiano a la membrana celular bacteriana. Pasado este tiempo, los cultivos se centrifugaron a  $3100 \times g$  durante 20 minutos a 4°C y se recuperó el precipitado celular, que se lavó dos veces con amortiguador de fosfatos (5 mM fosfato de sodio, pH 6.5). Finalmente, las células se resuspendieron (5 % del volumen original) en una solución 100 mM de NaCl, pH 2 (ajustada con ácido fosfórico al 5%); este valor de pH favoreció la desorción del compuesto antimicrobiano desde la membrana celular de las bacterias hacia el medio. Las células se mantuvieron en agitación a 4°C durante 10 horas. Posteriormente se sometieron a centrifugación a  $3100 \times g$  durante 20 minutos a 4°C para descartar las células y retener el sobrenadante con la bacteriocina. El extracto libre de células se dializó 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. El extracto se filtró a través de membranas estériles Millipore (Durapore® Membrane Filters, 0.22  $\mu$ m GV, Irlanda) y se liofilizó. Este liofilizado fue etiquetado como extracto de bacteriocina (EB) y se almacenó a -80°C hasta su uso. Finalmente se determinó la concentración de

proteína en un gramo de EB por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el Kit Protein Assays (Bio-Rad) y un biofotómetro (Eppendorf).

## **6.10 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA BACTERIOCINA**

En esta sección se describe la identificación a nivel molecular de la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* MXVK29. Las razones para continuar solamente con esta bacteriocina se basaron fundamentalmente en los resultados obtenidos en la sección 6.8, además de que las cepas de *Enterococcus faecium* tienen mayor aceptación en la industria de alimentos, ya sea como probióticos y/o cultivos iniciadores, que las cepas de *Enterococcus faecalis* (consideradas habitualmente como un indicativo de contaminación fecal).

### **6.10.1 Identificación del extremo amino terminal**

El EB fue analizado con el sistema de electroforesis Tris-tricina-SDS-PAGE, de acuerdo a Schägger y Von Jawon (1987). Una vez separados los péptidos, la mitad del gel se utilizó para medir la actividad antimicrobiana de la bacteriocina atrapada en el gel (Bhunja y col., 1987) utilizando a *Listeria innocua* como microorganismo sensible y la otra mitad se tiñó con azul de Coomasie R-250 (0.03% p/v) para la visualización de las bandas. Finalmente se compararon ambos geles (teñido y actividad) para determinar que banda correspondía al compuesto antimicrobiano (banda de actividad).

Una vez realizada la separación electroforética y visualizada la banda de interés, las proteínas se inmovilizaron en una membrana de fluoruro de polivinilideno (Sequi-Blot PVDF Membrane, Bio-Rad Laboratorios, Hércules, California) siguiendo las indicaciones del fabricante. La transferencia se llevó a cabo en una cámara de transferencia Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) a 90 V durante 40 minutos a 5°C, usando el Buffer Towbin (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol, pH 8.3). Pasado este tiempo se procedió al desarmado del estuche y a la tinción de la membrana con azul de Coomasie R-250 al 0.025% en metanol al 40%, sin añadir ácido acético, durante 30 minutos. Para desteñir la membrana se utilizó una solución de metanol al 50%.

La banda de interés fue cortada de la membrana y aplicada a un secuenciador Procise 491 Protein-Sequencing System (Applied Biosystem, Inc., Foster City, CA, EUA). La secuencia obtenida fue comparada con la base de datos de proteínas de la NCBI para determinar similitudes con otras bacteriocinas previamente reportadas.

Una vez obtenido el extremo amino terminal de la proteína se continuó con la caracterización molecular de la bacteriocina, para lo cual se plantearon una estrategia secuencial: por una parte se identificó el gen estructural, ya que el extremo amino por sí sólo no permite asegurar con exactitud el tipo de bacteriocina al que pertenece, y una vez identificado éste, se realizó una PCR inversa para identificar algunos de los genes que ayudan a la biosíntesis de este antimicrobiano (ya que como se indicó anteriormente, estos péptidos normalmente se encuentran codificados en grupos de operones).

#### **6.10.2 Identificación del gen estructural**

El gen estructural fue obtenido por medio de la PCR y secuenciación directa del producto. El ADN genómico fue extraído como se indicó en el apartado 6.8.1 y fue usado como diana para la reacción de PCR con ocho pares de cebadores de genes estructurales que codifican para diferentes bacteriocinas: enterocina A, enterocina B, enterocina P, enterocina Q, enterocina AS-48, enterocina L50A/B, enterocina 1071A/B y bacteriocina 31. Los oligonucleótidos utilizados se especifican en la tabla 5.

Las reacciones de la PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ , usando 10  $\mu\text{L}$  de ADN genómico (0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de cada cebador 20  $\mu\text{M}$  (dos oligonucleótidos para cada gen), 5  $\mu\text{L}$  de buffer 10X sin color, 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 1  $\mu\text{L}$  de mezcla de nucleotidos 10 mM y 0.3  $\mu\text{L}$  de Go Taq-DNA polimerasa 5 U/ $\mu\text{L}$  (todos los reactivos de la mezcla fueron adquiridos en Promega, excepto los cebadores). Se realizó una mezcla para nueve reacciones (sin agregar los oligonucleótidos), se mezcló y se dividió en nueve partes iguales; a cada fracción se le agregaron 2  $\mu\text{L}$  de cada uno de los cebadores correspondientes. La novena reacción es el control de reacción. Las muestras se introdujeron al termociclador, programado previamente con el tiempo y número total de ciclos para cada etapa.

**Tabla 5.** Cebadores utilizados para identificar bacteriocinas del género *Enterococcus* y sus características.

| <b>Cebadores de enterocinas<br/>Secuencias 5'-3'</b>   | <b>Tamaño de<br/>fragmento<br/>(aminoácidos)</b> | <b>Clasificación</b> | <b>Referencia</b>                            |
|--|--|----------------------|--|
| <b>Enterocina L50 A/B (<i>ent L50A/B</i>)</b><br>F: TGGGAGCAATCGCAAAATTAG<br>R: ATTGCCCATCCTTCTCCAAT     | Ent L50A: 44<br>Ent L50B: 36                     | ClassIIb             | Cintas y col., 2000                          |
| <b>Enterocina AS-48 (<i>entAS-48</i>)</b><br>F: GAGGAGTITCATGITTAAGA<br>R: CATATTGTAAATTACCAAGCAA        | 67   | Class III            | Martinez-Bueno y col., 1994                  |
| <b>Enterocina A (<i>entA</i>)</b><br>F: AAATATTATGGAAATGGAGTGTAAT<br>R: GCACTTCCCTGGAATTGCTC             | 47   | ClassIIa             | Du Toit y col., 2000                         |
| <b>Enterocina 1071AB (<i>ent 1071AB</i>)</b><br>F: CCTATTGGGGGAGAGTCGGT<br>R: ATACATTCTTCCACTTATTTTT     | Ent L1071A: 39<br>Ent L1071B: 35                 | ClassIIb             | Ben Omar y col., 2004                        |
| <b>Bacteriocina 31 (<i>bac31</i>)</b><br>F: TATTACGGAAATGGTTTATATTGT<br>R: TCTAGGAGCCCAAGGGCC            | 43   | ClassIIc             | Tomita y col., 1996                          |
| <b>Enterocina P (<i>entP</i>)</b><br>F: TATGGTAATGGTGTTTATTGTAAT<br>R: ATGTCCCATACCTGCCAAAC              | 44   | ClassIIc             | Cintas y col., 1997;<br>Du Toit y col., 2000 |
| <b>Enterocina Q (<i>entQ</i>)</b><br>F: TTAACAAGAAATTTTTTCCCATGGCAA<br>R: ATGAATTTTCTTCTTAAAAATGGTATCGCA | 50   | ClassIIb             | Cintas y col., 2000                          |
| <b>Enterocina B (<i>entB</i>)</b><br>F: GAAAATGATCACAGAATGCCTA<br>R: GTTGCATTTAGAGTATACATTTG             | 53   | ClassIIc             | Du Toit y col., 2000                         |

\*Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por Invitrogen-Accesolab

Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, alineamiento o hibridación (la temperatura dependió del par de cebadores utilizados) durante 1 minuto y polimerización o extensión a 72°C durante 1 minuto; en todos los casos se realizó una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Las temperaturas de alineamiento utilizadas fueron: 60°C (*ent Q*), 56°C (*ent L50A/B*), 54°C (*bac31*), 52°C (*entPy entA*), 50°C (*ent 1071AB* y *entB*) y 49°C (*ent AS-48*).

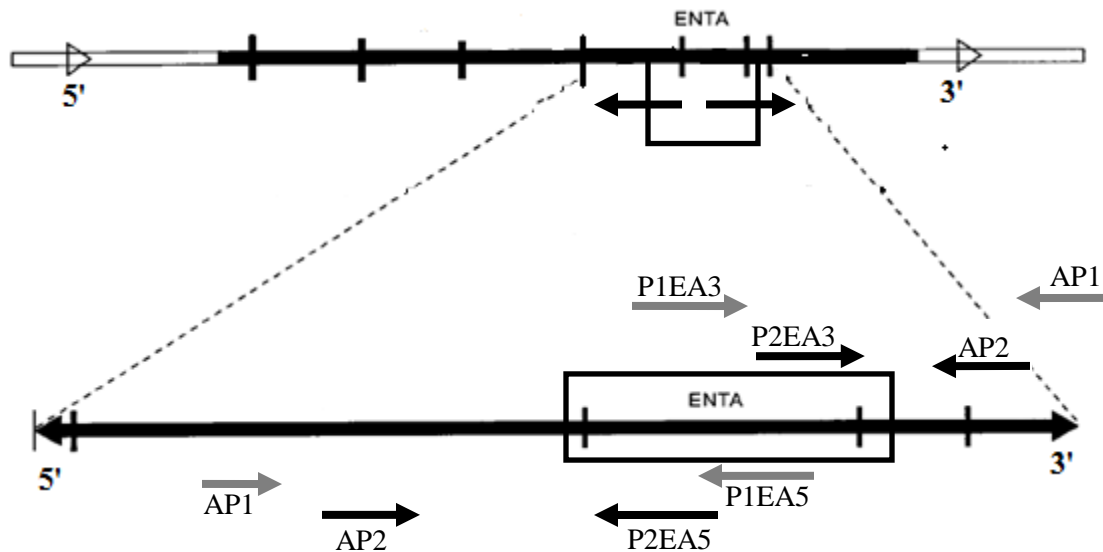
Después de la amplificación, los productos de PCR fueron examinados mediante electroforesis en agarosa al 1.5% (p/v), seguida por una tinción con bromuro de etidio. Los productos amplificados fueron purificados usando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up (Promega) y los fragmentos purificados fueron secuenciados en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Finalmente, las secuencias obtenidas fueron comparadas usando la base de datos de NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).


### **6.10.3 Genes involucrados en la biosíntesis de la bacteriocina**

#### **6.10.3.1 Diseño de cebadores**

El diseño de cebadores se realizó de acuerdo al esquema presentado en la figura 6. Una vez conocida la secuencia del gen estructural, se diseñó a partir de ésta un par de oligonucleótidos orientados al revés de lo habitual (*forward* basado en la cadena de abajo y *reverse* en la de arriba), con el objetivo de tener una amplificación divergente desde la secuencia conocida, que permitiera conocer qué genes se encontraban en la proximidad del gen estructural. El manual del kit Genome Walker<sup>TM</sup> indica que se deben de diseñar dos cebadores: el primero debe ser diseñado lo más cercano al extremo contrario hacia donde se desea amplificar (5' o 3') y el segundo debe ser un cebador anidado, el cual no debe sobreponerse con el primer oligonucleotido. Además de estas consideraciones, se debe considerar la temperatura media de fusión (T<sub>m</sub>) de cada primer, ya que los etiquetados como P1 (EA3 o EA5) deben tener la misma T<sub>m</sub> que el cebador 1 del adaptador (AP1;

$T_m = 59^\circ\text{C}$ ) y los P2 (EA3 o EA5) deben tener la misma  $T_m$  que el cebador dos del adaptador (AP2;  $T_m = 71^\circ\text{C}$ ).



**Figura 6.** Esquema del diseño de cebadores para secuenciar los genes involucrados en la biosíntesis de la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* MXVK29. AP1 y AP2: cebadores de los adaptadores; P1 (EA3 o EA5) y P2 (EA3 o EA5) cebadores diseñados. Gen estructural de la bacteriocina 

### 6.10.3.2 Construcción de librerías genómicas

Para obtener los genes que acompañan al gen estructural de la bacteriocina (gen de inmunidad, genes del sistema de transporte ABC, genes que codifican en proteínas accesorios-inducción) se realizó una PCR inversa de acuerdo al protocolo del kit Genome Walker<sup>TM</sup> Universal Kit (Clontech). El ADN genómico fue extraído como se indicó en el apartado 6.8.1 y la calidad de éste fue analizada en un gel de agarosa al 0.8%, cargando 1  $\mu\text{L}$  de ADN genómico. Un ADN de buena calidad e íntegro debe ser mayor de 50 kb, con un barrido casi nulo.

Una vez obtenido el ADN de la calidad requerida, se realizó una digestión con la enzima de restricción *EcoRV* (10 unidades/ $\mu\text{L}$ , incluida en el kit) con los siguientes volúmenes de reacción: 25  $\mu\text{L}$  de ADN genómico (0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 8  $\mu\text{L}$  de enzima de restricción, 10  $\mu\text{L}$  de buffer de enzima de restricción 10X y 57  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q estéril. Se incubó la mezcla de reacción en un baño de agua a 37°C durante 2 horas. Pasado este tiempo, se agitó la reacción a baja velocidad durante 5-10 segundos y se regresó la reacción a 37°C durante toda la noche (16-18 horas). La digestión se corroboró en un gel de agarosa al 0.8%, cargando 5  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción. A 95  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción digerida se les adicionó un volumen igual de fenol, agitándose a baja velocidad de 5 a 10 segundos y centrifugándose a  $3500 \times g$  durante 10 segundos a temperatura ambiente para lograr la separación de la fase acuosa de la orgánica. La fase acuosa (superior) se transfirió a un microtubo nuevo de 1.5 mL y se agregó a cada tubo un volumen igual de cloroformo (95  $\mu\text{L}$ ), repitiéndose el paso anterior hasta lograr la separación de las fases. Se transfirió nuevamente la fase superior a un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 mL y se agregaron 2 volúmenes (190  $\mu\text{L}$ ) de etanol al 95% a -20°C, una décima parte del volumen de acetato de sodio 3 M pH 4.5 (9.5  $\mu\text{L}$ ) y 20  $\mu\text{g}$  de glucógeno. Se agitó 5-10 segundos y se centrifugó a  $3500 \times g$  durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó y el precipitado se lavó en 100  $\mu\text{L}$  de etanol al 80% a -20°C. Se centrifugó nuevamente durante 10 minutos y se decantó el sobrenadante, secándose el precipitado y resuspendiéndose en 20  $\mu\text{L}$  de TE a pH 7.5 (Tris 10 mM; EDTA 0.1 mM). La calidad del producto digerido purificado se corroboró en un gel de agarosa al 0.8%, cargando 1  $\mu\text{L}$  de la muestra.

Una vez obtenido el ADN digerido y purificado se realizó la ligación de éste con los adaptadores del kit Genome Walker<sup>TM</sup> (tabla 6), con los siguientes volúmenes de reacción: 4  $\mu\text{L}$  de ADN digerido y purificado, 1.9  $\mu\text{L}$  de adaptadores 25  $\mu\text{M}$ , 1.6  $\mu\text{L}$  de buffer de ligación 10X, 0.5  $\mu\text{L}$  de ADN-ligasa T4 6 U/ $\mu\text{L}$ . Se incubó a 4°C durante 24 horas, y pasado este tiempo se detuvo la reacción incubándola a 70°C durante 5 minutos. Finalmente, se agregaron a cada tubo de reacción 72  $\mu\text{L}$  de TE pH 7.5 (10 mM; EDTA 1 mM).



### **6.10.3.3 Amplificación de genes adyacentes al gen estructural**

Para obtener fragmentos adyacentes al gen estructural, se realizaron dos reacciones de PCR por separado con los diferentes oligonucleótidos diseñados. La primera reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  con los siguientes reactivos: 40  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q esteril, 5  $\mu\text{L}$  de buffer de enzima 10X, 1  $\mu\text{L}$  de mezcla de nucleótidos 10 mM, 1  $\mu\text{L}$  del cebador AP1 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{L}$  de ADN molde (0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y 1  $\mu\text{L}$  de ADN polimerasa termoestable (Elongasa, Invitrogen). Se realizó una mezcla para tres reacciones, se mezcló y se dividió en tres partes iguales; a las dos primeras fracciones se le agregó 1  $\mu\text{L}$  de cada uno de los cebadores correspondientes (P1EA3 y P1EA5; tabla 6). Las mezclas de reacción se introdujeron al termociclador, programado previamente con el tiempo y número total de ciclos para cada etapa. Las condiciones de la reacción fueron 45 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 25 segundos, alineamiento o hibridación a 60°C durante 30 segundos y polimerización o extensión a 68°C durante 3 minutos; en todos los casos se realizó una extensión final a 68°C durante 7 minutos. Una vez terminada la reacción, se analizaron 5  $\mu\text{L}$  de la reacción de PCR en un gel de agarosa al 1.5%. Se consideró una reacción positiva si en la imagen tomada del gel se observa un pequeño barrido, múltiples bandas o una banda no definida. La segunda reacción de PCR se llevó a cabo con las mismas concentraciones de la primera reacción de PCR, pero utilizando en esta ocasión los cebadores P2 (EA3 o EA5) y AP2 (tabla 6) y como ADN molde el producto diluido (1:50) del primer PCR. Las condiciones de la reacción fueron 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineamiento o hibridación a 68°C durante 4 minutos y una extensión final a 68°C durante 7 minutos. Una vez terminada la reacción, se analizaron 5  $\mu\text{L}$  de la segunda reacción de PCR en un gel de agarosa al 1.5%. Los productos amplificados fueron purificados usando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up (Promega) y fueron secuenciados en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Finalmente las secuencias obtenidas fueron comparadas usando la base de datos de NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).

**Tabla 6.** Cebadores utilizados para identificar genes involucrados en la biosíntesis de la bacteriocina (gen de inmunidad, genes del sistema de transporte ABC, genes que codifican en proteínas accesorios-inducción) mediante una PCR inversa.

| <b>Cebador</b> | <b>Secuencia 5' – 3'</b> | <b>Tm (°C)**</b> |
|----------------|--------------------------|------------------|
| AP1            | GTAATACGACTCACTATAGGGC   | 59               |
| AP2            | ACTATAGGGCACGCGTGGT      | 71               |
| P1EA3*         | AGGAATGTCTATAGGTGGTTTTTT | 59.7             |
| P2EA3*         | GGTGGAGCAATTCCAGGGAAGTG  | 71.51            |
| P1EA5*         | CAAATCCATCCTTTTTTAAACC   | 60.06            |
| P2EA5*         | GCTCCACCTAAAAAACCACCACCT | 70.98            |

\*Sintetizados en la unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

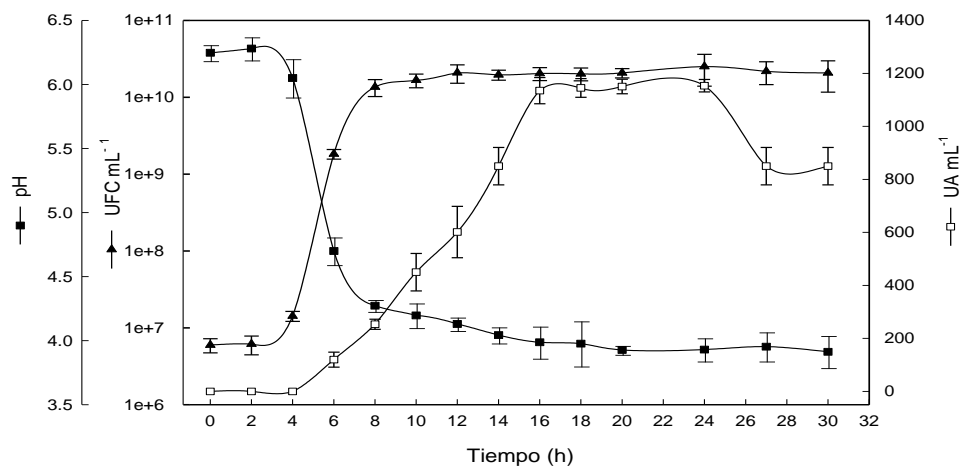
\*\* Las Tm fueron calculadas en la página [www.sigma-genosys.com/calc/DNACalc.asp](http://www.sigma-genosys.com/calc/DNACalc.asp)

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE ENTEROCINAS

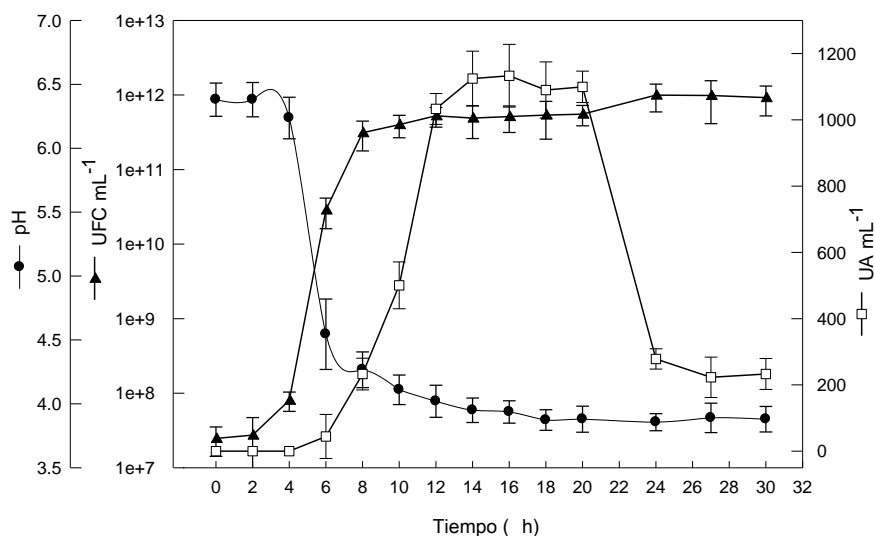
El perfil de producción de bacteriocinas se determinó en el medio de cultivo CGB, rico en nutrientes como extracto de levadura y compuestos nitrogenados que ayudan al crecimiento celular y a la producción de bacteriocinas (Aasen y col., 2000; Mataragas y col., 2004).

La actividad antimicrobiana fue detectada en el extracto crudo de bacteriocina después de 6 horas de fermentación, cerca del final de la fase logarítmica de crecimiento (figuras 7 y 8). La máxima actividad (1100 UA/mL) de la enterocina producida por *E. faecium* MXVK29 fue observada a las 16 horas de incubación, la cual corresponde a la mitad de la fase estacionaria, y se mantuvo constante hasta las 24 horas, disminuyendo posteriormente (850 UA/mL) y manteniéndose casi constante hasta el final de la fermentación (30 horas). Durante el crecimiento bacteriano el pH del medio de cultivo disminuyó desde 6.4 hasta 3.7; la producción de bacteriocina se inició a un pH aproximado de 4.6 (figura 7).



**Figura 7.** Perfil de la fermentación del cultivo de *Enterococcus faecium* MXVK29. Promedio de tres replicas con su desviación estándar.

En la figura 8 se observa el perfil de la bacteriocina producida por *E. faecalis* MXVK22. La máxima actividad (1133 UA/mL) fue observada a las 14 horas de incubación, la cual corresponde a la mitad de la fase estacionaria, y se mantuvo casi constante hasta las 22 horas, disminuyendo posteriormente hasta 233 UA/mL (27 horas) y manteniéndose casi constante hasta el final de la fermentación (30 horas). Durante el crecimiento bacteriano, el pH del medio de cultivo disminuyó de 6.4 a 3.9, y la producción de bacteriocina se inició a un pH aproximado de 4.7.



**Figura 8.** Perfil de la fermentación del cultivo de *Enterococcus faecalis* MXVK22. Promedio de tres replicas con su desviación estándar.

El perfil observado para ambas bacteriocinas puede ser considerado el de un metabolito primario (De Vuyst y col., 1996; Ray, 2004), que durante la fase de latencia es adsorbido a la célula y es desadsorbido poco a poco a medida que el pH disminuye (6-4).

Los resultados obtenidos son similares a los reportados en la literatura (Marekova y col., 2003; Kang y Lee, 2005; Criado y col., 2006; García-Almendárez y col., 2008; Shin y col., 2008; Dimov y col., 2010), quienes describen una máxima actividad al final de la fase exponencial y un decaimiento en la actividad después de un tiempo inespecífico durante la fase estacionaria. Esta reducción en la actividad de la bacteriocina puede ser atribuida a diferentes factores, como son re-adsorción a la célula productora por un bajo pH (<4),

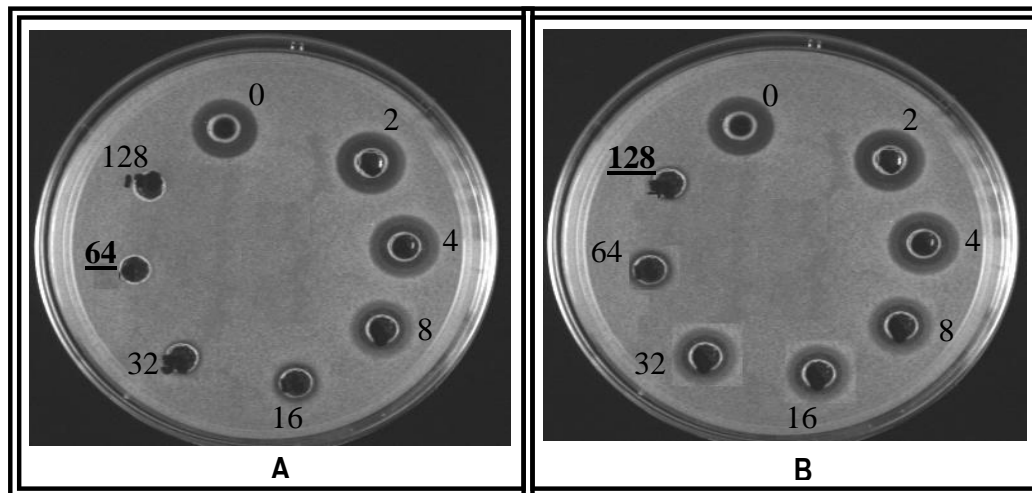
formación de agregados de bacteriocina o degradación de la enterocina por proteasas extracelulares (De Vuyst y col., 1996; Parente y Ricciardi, 1999; Aasen y col., 2000; Yamamoto y col., 2003; Criado y col., 2006; Dimov y col., 2010).

## 7.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

### 7.2.1 Actividad antimicrobiana

Una vez obtenido el extracto crudo de la bacteriocina se determinó la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos crudos liofilizados, las soluciones fueron preparadas diluyendo 500 mg de extracto crudo liofilizado en agua estéril y realizando diluciones seriadas a partir de éste.

La bacteriocina producida por *E. faecalis* MXVK22 originó halos de inhibición hasta la dilución 64, lo que equivale a 2133.33 UA/mL de extracto diluido ó 4266.66 UA/g de extracto liofilizado (figura 9A); y la enterocina producida por *E. faecium* MXVK29 presentó una dilución crítica de 128 que equivale a 4266.66 UA/mL de extracto diluido ó 8533.32 UA/g de extracto crudo liofilizado (figura 9B).



**Figura 9.** Actividad antimicrobiana de la bacteriocina producida por *E. faecalis* MXVK22 (A) y *E. faecium* MXVK29 (B) utilizando a *Listeria innocua* ATCC33090 como microorganismo sensible. Los numeros subrayados representan la dilución crítica base 2 con la cual se determina la actividad antimicrobiana.

Debido a que ambos extractos presentan actividades antimicrobianas diferentes, se decidió utilizar la actividad mas baja reportada (2133 UA/mL), para poder estandarizar los perfiles de crecimiento de las cepas de *Listeria* sp.

### 7.2.2 Perfil de crecimiento de *Listeria* sp. en presencia de bacteriocina

Una vez determinada la actividad de los extractos crudos, se prosiguió a realizar cinéticas de crecimiento de las cepas de *Listeria* en presencia de diferentes concentraciones de bacteriocina, para observar el efecto antimicrobiano y determinar así la concentración mínima inhibitoria.

En las figuras 10 y 11 se observan los perfiles de crecimiento de las diferentes cepas de *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes* con diferentes concentraciones de extracto de bacteriocina (2133, 1066, 533, 267 y 134 UA/mL). Se puede observar que se trabajó con una alta concentración inicial de inóculo, con el objetivo de evitar la formación de cepas resistentes (López-Malo y col., 2005), además de simular el efecto de una alta contaminación en los alimentos. En todas las cepas, a excepción de *Listeria monocytogenes* LMB 911204/47 (que no presentó un efecto inhibitorio comparado con el control sin bacteriocina) la bacteriocina demostró tener un efecto bacteriostático en las concentraciones de estudio.

Los cultivos de *Listeria innocua* ATCC33090 en presencia de ambas bacteriocinas a las diferentes concentraciones redujeron la cuenta microbiana de 9 unidades logarítmicas (control) a 5.6 unidades para la concentración mas alta (2133 UA/mL). Además, como se observa en las figuras 10A y 11A, la inhibición bacteriostática se presentó hasta las 12 horas de crecimiento. Transcurrido este tiempo se observa que a las 24 horas de fermentación ya no hay un efecto inhibitorio contra *Listeria innocua* de la bacteriocina producida por *E faecium* MXVK29, con excepción de la concentración más alta, que presentó un tiempo de adaptación de 18.1 horas (tabla 7). La bacteriocina producida por *E. faecalis* MXVK22, sin embargo, provocó una disminución en la velocidad de crecimiento de la cepa de *L. innocua*, en comparación con su control (tabla 7), en todas las concentraciones estudiadas. Aún con 24 horas de fermentación se observa una disminución de casi 3 unidades logarítmicas en la concentración mas baja de bacteriocina utilizada (134 UA/mL).

*Listeria monocytogenes* LM82 fue inhibida por la bacteriocina producida por *E. faecium* MXVK29 en todas las concentraciones utilizadas, hasta las 12 horas de fermentación. Pasado este tiempo las concentraciones más bajas (533, 267 y 134 UA/mL) permitieron el crecimiento de la bacteria hasta alcanzar la cuenta del control. Por otra parte, se observó que las dos concentraciones más altas (1066 y 2133 UA/mL) produjeron un efecto bactericida durante 24 horas, ya que en este tiempo no se detectó inicio de la fase logarítmica (tabla 7); a las 48 horas ya se observó una elevada cuenta microbiana (dato no mostrado). También se puede observar que la concentración más baja (134 UA/mL) presenta un efecto inhibitorio hasta las 6 horas, prolongando la fase de adaptación a 3.2 horas (tabla 7) y logrando una reducción de 3 unidades logarítmicas con respecto al control (0.88 horas; figura 10B). Cuando esta cepa fue estudiada en presencia de la bacteriocina producida por *E. faecalis* MXVK22 se observó un perfil diferente (figura 11B), en el cual sólo la concentración de 2133 UA/mL produjo un efecto inhibitorio importante, aumentando la fase de adaptación (6.38 horas; tabla 7) y reduciendo la carga microbiana 1.5 unidades logarítmicas a las 12 horas de fermentación, en comparación con las demás concentraciones y con el control, que en el mismo tiempo presentaron aproximadamente la misma carga microbiana ( $\approx 9$  unidades logarítmicas). Finalmente, en la tabla 7 se observa un comportamiento similar en la velocidad de crecimiento y la fase lag a lo observado para *Listeria innocua*, con la única diferencia de que en las concentraciones más bajas utilizadas de la bacteriocina de *E. faecalis* MXVK22 no se detectó la fase de adaptación (una vez comenzada la fermentación inicia la fase logarítmica, debido a que el inóculo se tomó de un cultivo adaptado al medio), lo que indica que el efecto inhibitorio es nulo en estas concentraciones.

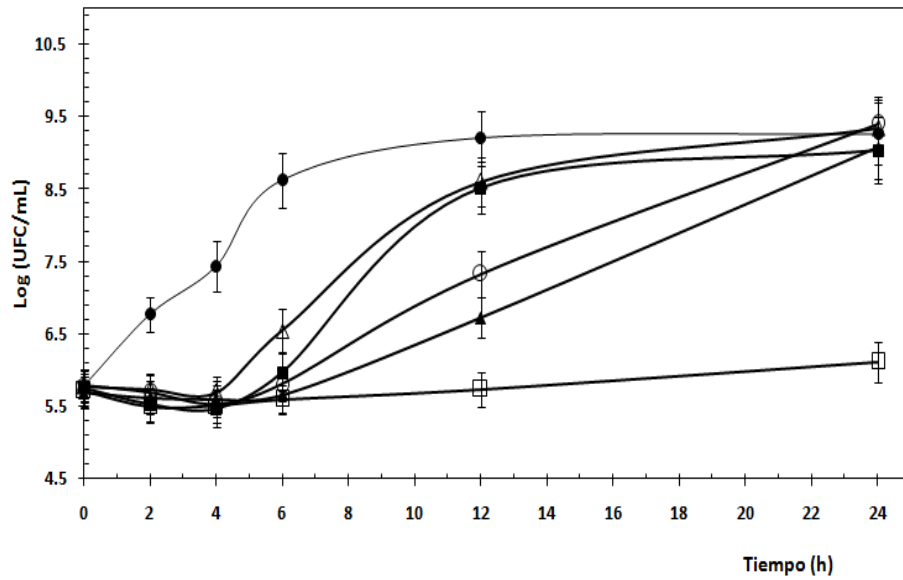
En estudios previos se ha demostrado que *Listeria monocytogenes* LM82 presenta resistencia intrínseca a algunos antimicrobianos cuyo mecanismo de acción se da a través de la membrana citoplasmática (Marín y col., 1999; Marín, 2002; Minor-Pérez y col., 2005; Alquicira, 2006) como las bacteriocinas. Esto es contrario a los resultados obtenidos en este trabajo, ya que se observó un mayor efecto inhibitorio a mayor concentración de enterocina.

*Listeria monocytogenes* Scott A fue inhibida por la bacteriocina producida por *E. faecium* MXVK29 en todas las concentraciones utilizadas hasta las 6 horas de fermentación, pasado este tiempo sólo la concentración de 2133 UA/mL presentó un efecto inhibitorio hasta casi las 24 horas, siendo este efecto más marcado a las 12 horas, con una reducción de casi 3 unidades logarítmicas con respecto al control (figura 10C). También se pudo observar que con esta concentración de bacteriocina la bacteria presentó una fase de adaptación de 9.01 horas (por 1.89 horas del control); además, la velocidad de crecimiento disminuyó de  $1.89 \text{ h}^{-1}$  a  $0.62 \text{ h}^{-1}$  (tabla 7). Cuando esta cepa fue estudiada en presencia de la bacteriocina producida por *E. faecalis* MXVK22 se observó un perfil similar al de la bacteriocina de *E. faecium* MXVK29 (figura 11C): sólo la concentración de 2133 UA/mL mostró un efecto inhibitorio, aumentando la fase de adaptación a 6.58 horas (tabla 7); a las 12 horas de fermentación el efecto inhibitorio es todavía marcado, reduciéndose la carga microbiana 2 unidades logarítmicas en comparación con las demás concentraciones usadas y con el control. Finalmente, en la tabla 7 se observa un comportamiento similar, en cuanto a la velocidad de crecimiento y la fase lag, que el mostrado para *Listeria innocua*.

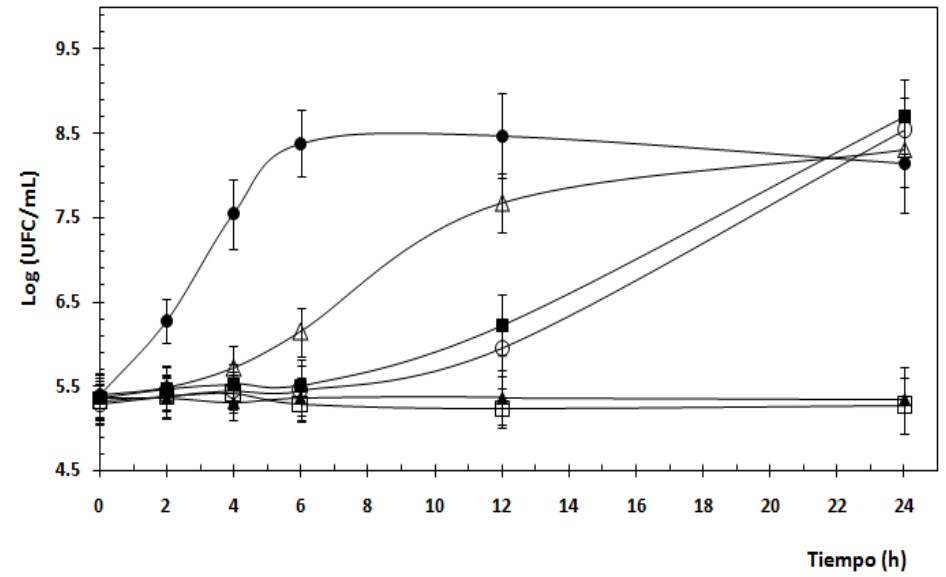
*Listeria monocytogenes* LMB 911204/47 presentó inhibición por la bacteriocina producida por *E. faecium* MXVK29 a las concentraciones más altas (533 1066 y 2133 UA/mL) hasta las 6 horas de fermentación; pasado este tiempo, sólo la concentración de 2133 UA/mL mostró un efecto inhibitorio hasta las 12 horas, con una reducción de casi 2 unidades logarítmicas con respecto al control (figura 10D). Además, en este caso se observa un incremento en la fase de adaptación de 0.97 (control) a 4.88 horas y una disminución de la velocidad de crecimiento de  $0.97 \text{ h}^{-1}$  a  $0.38 \text{ h}^{-1}$  (tabla 7). Cuando esta cepa fue estudiada en presencia de la bacteriocina producida por *E. faecalis* MXVK22 se observó que las dos concentraciones más altas (1066 y 2133 UA/mL) produjeron un efecto inhibitorio hasta las 6 horas de fermentación, reduciendo de 1.5 a 2 unidades logarítmicas el crecimiento de la cepa y mostrando velocidades de crecimiento más bajas ( $0.14$  y  $0.2 \text{ h}^{-1}$ ). A las 12 horas de fermentación se observó una inhibición de hasta 3 unidades logarítmicas para la concentración de 2133 UA/mL. Finalmente, no se apreciaron tiempos de latencia para ninguna de las concentraciones utilizadas, al igual que ocurría con la cepa *Listeria monocytogenes* LM82 (tabla 7).



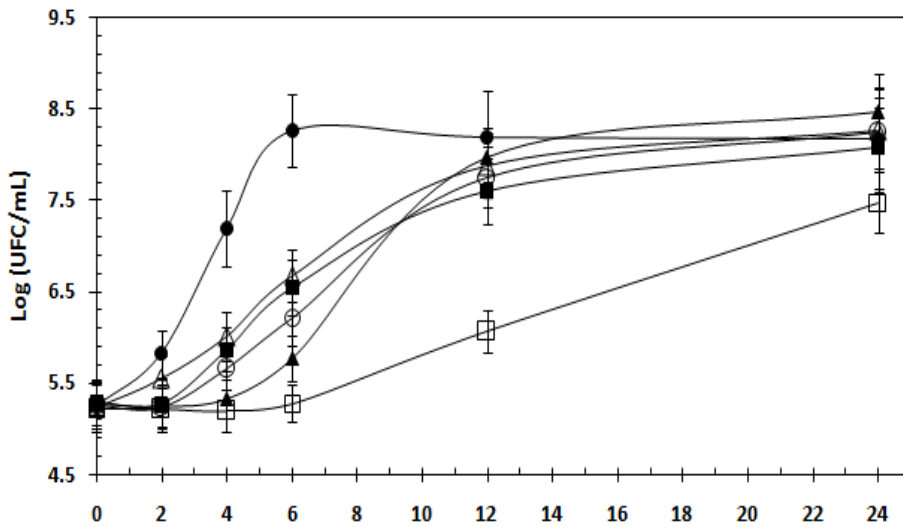
**A. *Listeria innocua* ATCC33090**



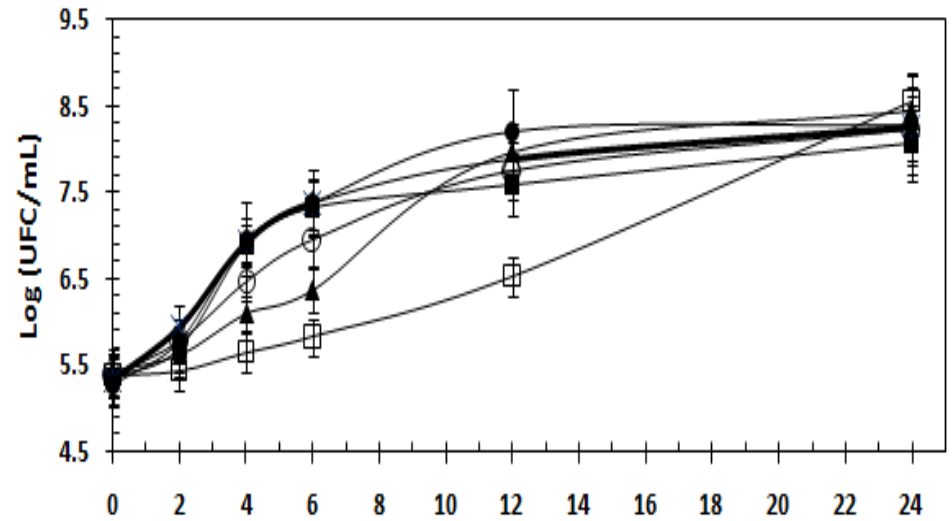
**B. *Listeria monocytogenes* LM82**



**C. *Listeria monocytogenes* ScottA**

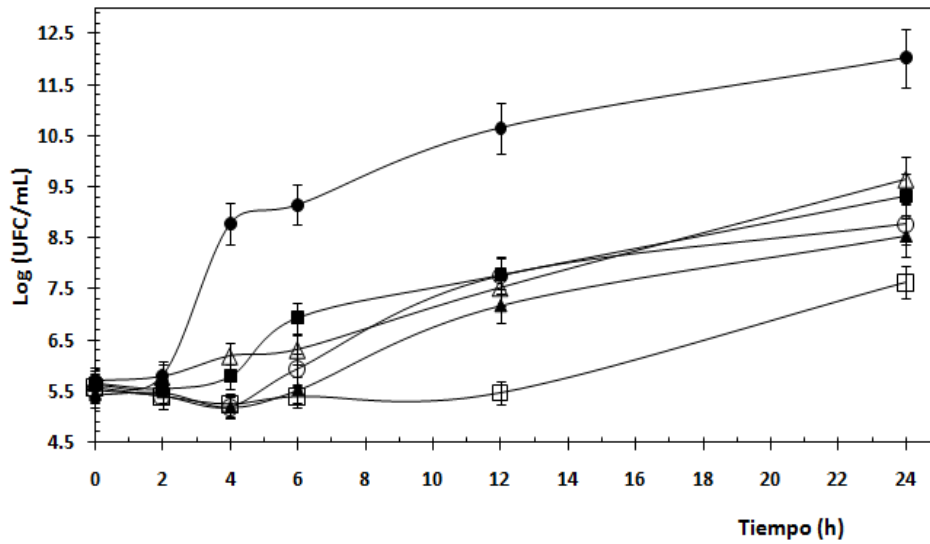


**D. *Listeria monocytogenes* LMB 911204/47**

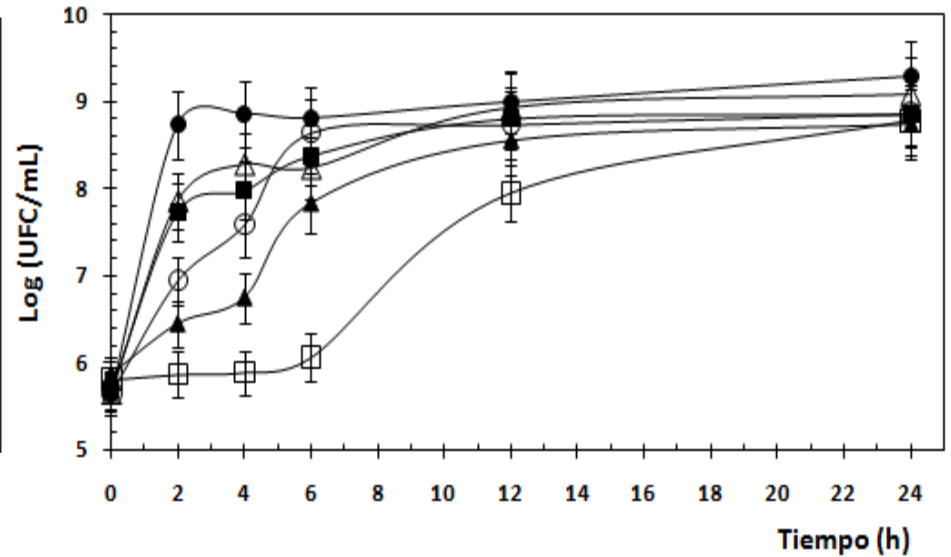


**Figura 10.-** Curvas de crecimiento de *Listeria innocua* ATCC33090 (A) y *Listeria monocytogenes* (B, C y D) en presencia de varias (h) concentraciones de bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* MXVK29.   
 —□— 2133 UA/mL —▲— 1066 UA/mL —○— 533 UA/mL  
 —■— 267 UA/mL —△— 134 UA/mL —●— control (sin bacteriocina)

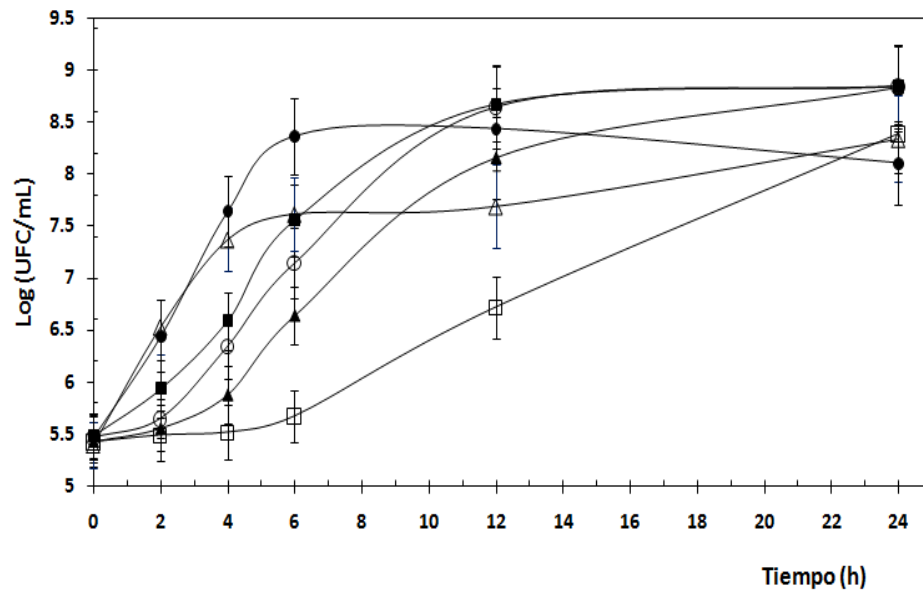
**A. *Listeria innocua* ATCC33090**



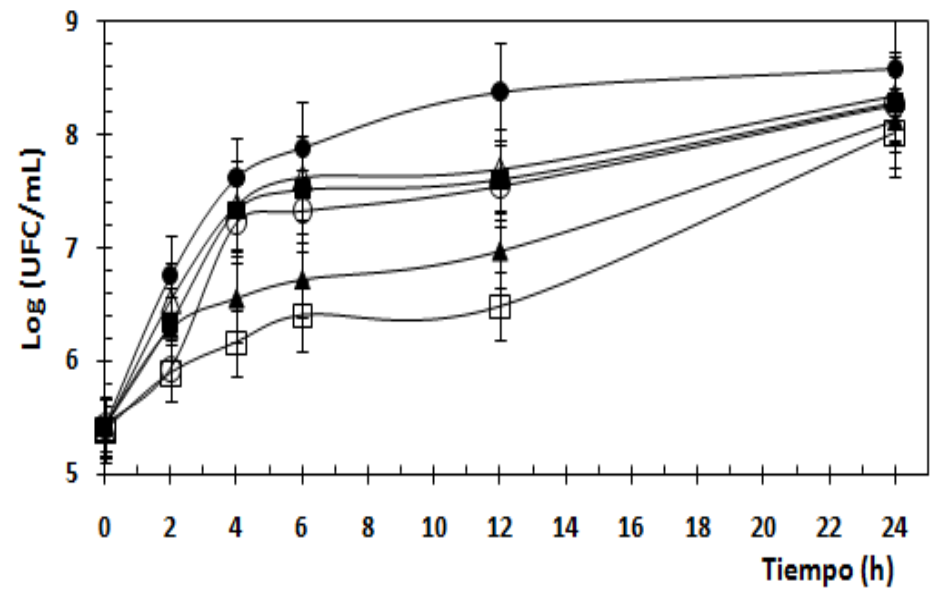
**B. *Listeria monocytogenes* LM82**



**C. *Listeria monocytogenes* ScottA**



**D. *Listeria monocytogenes* LMB**



**Figura 11.-** Curvas de crecimiento de *Listeria innocua* ATCC33090 (A) y *Listeria monocytogenes* (B, C y D) en presencia de varias concentraciones de bacteriocina producida por *Enterococcus faecalis* MXVK22.  $\square$  2133UA/mL  $\blacktriangle$  1066 UA/mL  $\circ$  533 UA/mL

$\blacksquare$  267 UA/mL  $\triangle$  134 UA/mL  $\bullet$  control (sin bacteriocina)

**Tabla 7.** Parámetros estimados de las curvas de crecimiento de *Listeria* sp. en presencia de diferentes concentraciones de las bacteriocina producidas por *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Enterococcus faecalis* MXVK22.

$\mu_{\max}$  = velocidad máxima de crecimiento específico ( $h^{-1}$ ); t-lag = tiempo de fase de latencia (h).

| Microorganismo                                 | Parámetro*         | Control           | Concentraciones de bacteriocina (UA/mL) |                   |                   |                   |                    |
|--|--------------------|-------------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
|  |                    |                   | 134                                     | 267               | 533               | 1066              | 2133               |
| <i>Listeria innocua</i><br>ATCC33090           | $\mu_{\max}^1$     | 1.13 <sup>a</sup> | 0.42 <sup>b</sup>                       | 0.48 <sup>c</sup> | 0.98 <sup>d</sup> | 0.88 <sup>e</sup> | 0.16 <sup>f</sup>  |
|  | t-lag <sup>1</sup> | 0.24 <sup>a</sup> | 3.71 <sup>b</sup>                       | 5.22 <sup>c</sup> | 7.68 <sup>d</sup> | 9.53 <sup>e</sup> | 18.1 <sup>f</sup>  |
|  | $\mu_{\max}^2$     | 2.97 <sup>a</sup> | 1.99 <sup>b</sup>                       | 1.92 <sup>c</sup> | 1.95 <sup>d</sup> | 0.91 <sup>e</sup> | 0.22 <sup>f</sup>  |
|  | t-lag <sup>2</sup> | 2.00 <sup>a</sup> | 3.94 <sup>b</sup>                       | 4.33 <sup>c</sup> | 5.9 <sup>d</sup>  | 7.43 <sup>e</sup> | 11.92 <sup>f</sup> |
| <i>Listeria monocytogenes</i><br>ScottA        | $\mu_{\max}^1$     | 1.89 <sup>a</sup> | 0.63 <sup>b</sup>                       | 0.63 <sup>b</sup> | 0.71 <sup>c</sup> | 0.68 <sup>d</sup> | 0.62 <sup>b</sup>  |
|  | t-lag <sup>1</sup> | 1.54 <sup>a</sup> | 1.05 <sup>b</sup>                       | 1.67 <sup>c</sup> | 2.93 <sup>d</sup> | 4.31 <sup>e</sup> | 9.01 <sup>f</sup>  |
|  | $\mu_{\max}^2$     | 1.6 <sup>a</sup>  | 1.25 <sup>b</sup>                       | 1.05 <sup>c</sup> | 0.98 <sup>d</sup> | 0.7 <sup>e</sup>  | 0.54 <sup>f</sup>  |
|  | t-lag <sup>2</sup> | 0.67 <sup>a</sup> | 1.98 <sup>a</sup>                       | 1.51 <sup>a</sup> | 2.04 <sup>a</sup> | 2.39 <sup>a</sup> | 6.58 <sup>a</sup>  |
| <i>Listeria monocytogenes</i><br>LM82          | $\mu_{\max}^1$     | 1.67 <sup>a</sup> | 0.49 <sup>b</sup>                       | 0.58 <sup>c</sup> | 0.52 <sup>d</sup> | 0.34 <sup>e</sup> | 0.31 <sup>f</sup>  |
|  | t-lag <sup>1</sup> | 0.88 <sup>a</sup> | 3.2 <sup>b</sup>                        | 8.61 <sup>c</sup> | 9.91 <sup>d</sup> | ND                | ND                 |
|  | $\mu_{\max}^2$     | 1.08 <sup>a</sup> | 0.97 <sup>b</sup>                       | 0.95 <sup>b</sup> | 0.92 <sup>c</sup> | 0.32 <sup>d</sup> | 0.25 <sup>e</sup>  |
|  | t-lag <sup>2</sup> | ND                | ND                                      | ND                | ND                | 1.58 <sup>a</sup> | 6.38 <sup>b</sup>  |
| <i>Listeria monocytogenes</i><br>LMB 911204/47 | $\mu_{\max}^1$     | 0.97 <sup>a</sup> | 0.86 <sup>b</sup>                       | 1.22 <sup>c</sup> | 0.63 <sup>d</sup> | 0.47 <sup>e</sup> | 0.38 <sup>f</sup>  |
|  | t-lag <sup>1</sup> | 0.45 <sup>a</sup> | 1.31 <sup>b</sup>                       | 1.33 <sup>b</sup> | 2.24 <sup>c</sup> | 2.37 <sup>d</sup> | 4.88 <sup>e</sup>  |
|  | $\mu_{\max}^2$     | 0.86 <sup>a</sup> | 0.74 <sup>b</sup>                       | 0.67 <sup>c</sup> | 0.66 <sup>c</sup> | 0.14 <sup>d</sup> | 0.2 <sup>e</sup>   |
|  | t-lag <sup>2</sup> | ND                | ND                                      | ND                | ND                | ND                | ND                 |

<sup>1</sup>Parámetros obtenidos con la bacteriocina producida por *E. faecium* MXVK29.

<sup>2</sup>Parámetros obtenidos con la bacteriocina producida por *E. faecalis* MXVK22.

ND= Parámetro no detectado por el programa.

\* Datos obtenidos del programa MicroFit© v.1.0.

Letras diferentes indican diferencia significativa  $p \leq 0.05$

Letras iguales indican que no hay diferencia significativa  $p \geq 0.05$

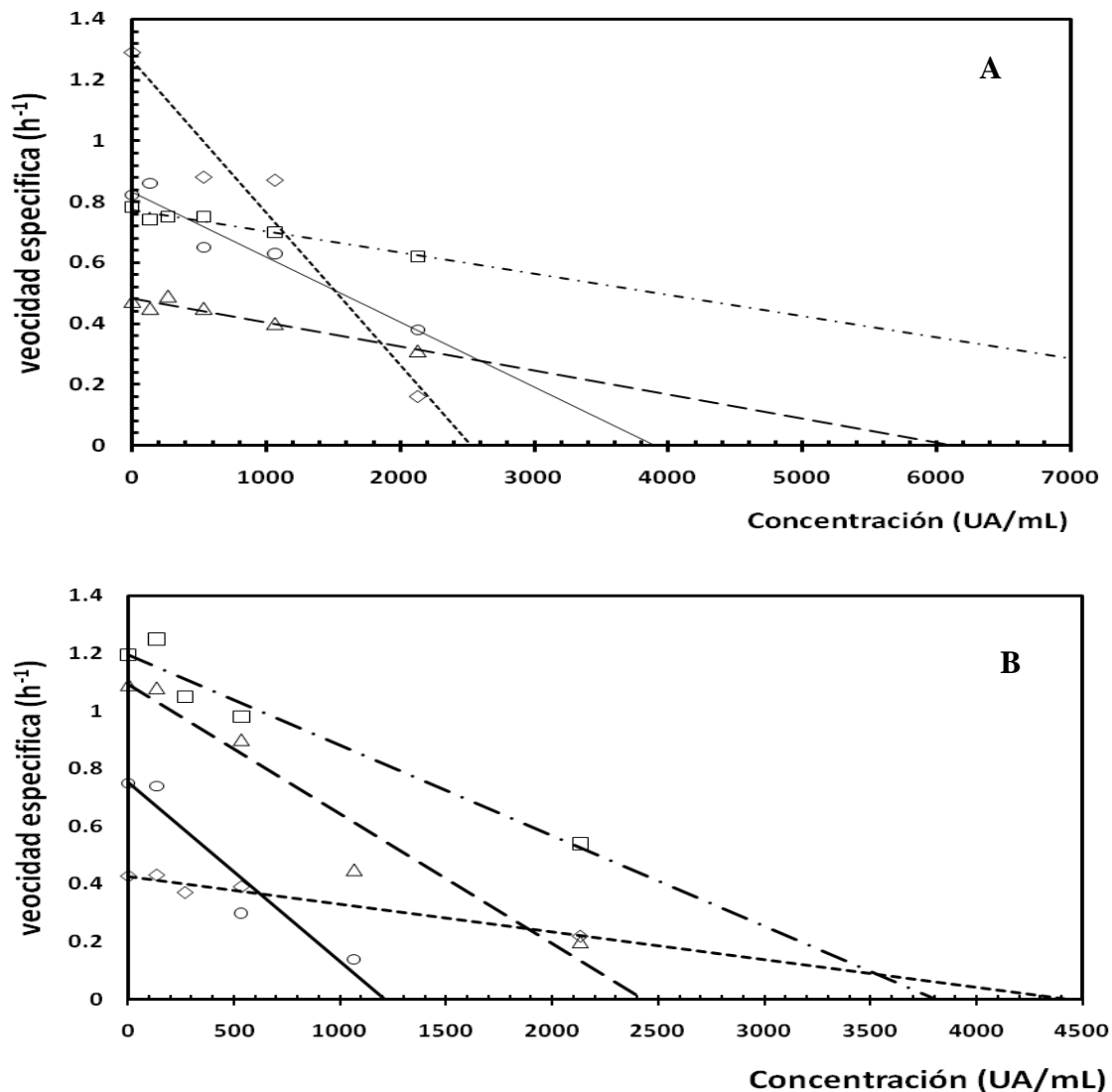
En la tabla 7 se observa que hay diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) tanto en las velocidades de crecimiento máxima ( $\mu_{max}$ ) como en la fase de adaptación (t-lag) de los cultivos de *Listeria innocua*. La velocidad de crecimiento reportada para las diferentes concentraciones desciende conforme aumenta la concentración de bacteriocina, por el contrario la fase de adaptación aumenta a mayores concentraciones, lo cual es similar a lo reportado por algunos autores como López-Malo y col. (2005), quienes indicaron que la inhibición total de algunos microorganismos patógenos o de descomposición no siempre es requerida en los productos destinados a la alimentación, y sólo es necesario que estos nuevos antimicrobianos incrementen la fase de adaptación o disminuyan la velocidad de crecimiento durante la fase logarítmica, bajo condiciones de abuso (altas concentraciones de inóculo  $\geq 5$  unidades logarítmicas).

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por otros autores (Martín-Platero y col., 2006; Izquierdo y col., 2008; Tadesse y col., 2009), quienes reportan la alta actividad anti-listeria que presentan las bacteriocinas de la clase IIa. Tominaga y Hatakeyama (2006) mencionan que la actividad antimicrobiana frente a cepas del género *Listeria* de esta clase de bacteriocinas se debe principalmente a la alta cantidad de cisteínas próximas al extremo amino, lo que representa una mayor cantidad de puentes disulfuro que facilitan el mecanismo de acción de estas bacteriocinas.

### **7.2.3 Obtención de un modelo matemático para determinar la concentración mínima inhibitoria**

Los progresos en el modelaje de las cinéticas de crecimiento de microorganismos permiten mejorar los análisis estadísticos de las curvas de crecimiento e inhibición en presencia de nuevos antimicrobianos. Algunos modelos basados en el análisis de regresión proporcionan una forma útil de describir el límite entre el crecimiento y no crecimiento de los microorganismos, incluyendo el efecto de la concentración de un antimicrobiano seleccionado (López-Malo y col., 2000; Alzamora y López-Malo, 2002).

Esta metodología se planteó con la finalidad de definir la concentración mínima inhibitoria (CMI) necesaria de la bacteriocina para inhibir el crecimiento de cepas de *Listeria* bajo las condiciones de estudio seleccionadas. Los modelos de regresión extrapolados y los valores de la CMI estimadas para las bacteriocinas producidas por *E. faecium* MXVK29 y *E. faecalis* MXVK22 se detallan en la figura 12 y en la tabla 8.



**Figura 12.** Determinación gráfica de la concentración mínima inhibitoria estimada para el extracto crudo de bacteriocina producido por *Enterococcus faecium* MXVK29 (A) y *Enterococcus faecalis* MXVK22 (B), extrapolando en las abscisas ( $\mu = 0$ ) de acuerdo al modelo matemático  $\mu = \mu_T - K \times C$ .

◇ *Listeria innocua* ATCC33090    △ *Listeria monocytogenes* LM82    □ *Listeria monocytogenes* Scott A  
 ○ *Listeria monocytogenes* LMB 911204/47

**Tabla 8.** Parámetros estimados del modelo matemático utilizado para determinar la concentración mínima inhibitoria de extracto crudo de la bacteriocina contra cepas de *Listeria* sp.

| Parámetro                |   | <i>L. innocua</i><br>ATCC33090 | <i>L. monocytogenes</i><br>LM 82 | <i>L. monocytogenes</i><br>LMB 911204/47 | <i>L. monocytogenes</i><br>Scott A |
|--------------------------|---|--------------------------------|----------------------------------|--|------------------------------------|
| <b>K</b>                 | a | 0.0005                         | 0.00008                          | 0.00021                                  | 0.00007                            |
|                          | b | 0.000096                       | 0.00045                          | 0.000621                                 | 0.000314                           |
| <b>μ<sub>T</sub></b>     | a | 1.267                          | 0.4832                           | 0.8334                                   | 0.7715                             |
|                          | b | 0.426                          | 1.0912                           | 0.7514                                   | 1.1953                             |
| <b>R<sup>2</sup></b>     | a | 0.947                          | 0.93                             | 0.941                                    | 0.947                              |
|                          | b | 0.951                          | 0.944                            | 0.923                                    | 0.9505                             |
| <b>CMI</b>               | a | 2535                           | 6040                             | 3969                                     | 11021                              |
|                          | b | 4263                           | 2425                             | 1209                                     | 3810                               |
| <b>CMI<sub>50%</sub></b> | a | 1405                           | 2622                             | 1659                                     | 5310                               |
|                          | b | 2000                           | 1869                             | 680                                      | 1260                               |

a. Parámetros obtenidos con el extracto de bacteriocina producido por *E. faecium* MXVK29.

b. Parámetros obtenidos con el extracto de bacteriocina producido por *E. faecalis* MXVK22.

K = velocidad de inhibición específica (mL x μg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>); μ<sub>T</sub>=velocidad de crecimiento en cultivo libre de bacteriocina (min<sup>-1</sup>); R<sup>2</sup>= coeficiente de linealidad; CMI = concentración mínima inhibitoria de bacteriocina (UA x mL<sup>-1</sup> de bacteriocina); CMI<sub>50%</sub>= concentración mínima inhibitoria al 50% (UA x mL<sup>-1</sup> de bacteriocina)

De acuerdo a los resultados mostrados, se observó que para eliminar el 100% de microorganismos (μ=0) es necesario adicionar al medio 2535, 6040, 3969 y 11021 UA/mL de la bacteriocina producida por *E. faecium* MXVK29 para las diferentes cepas probadas (Tabla 8; *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* LM82, LMB 911204/47 y Scott A, respectivamente) y 4263, 2425, 1209 y 3810 UA/mL, respectivamente, de la bacteriocina producida por *E. faecalis* MXVK22. Además, se observó que la CMI de la bacteriocina de *E. faecium* MXVK29 es casi el doble para todas las cepas (excepto para *L. innocua*, cuya CMI es menor) que la CMI de la bacteriocina producida por *E. faecalis* MXVK22. Los resultados obtenidos para *L. innocua* difieren de los reportados por otros autores, los cuales

muestran una mayor actividad anti-listeria de las bacteriocinas producidas por cepas de *E. faecium*, que las bacteriocinas de *E. faecalis* (Du Toit y col., 2000; Foulquié y col. 2003), algo que también se aprecia en los resultados obtenidos en este trabajo con las otras cepas de *Listeria* probadas. Esta mayor actividad se puede deber a que la mayoría de las bacteriocinas caracterizadas producidas por *E. faecium* se agrupan dentro de la clase IIa, y éstas se caracterizan por tener una alta actividad anti-listeria, una región conservada (YGNGVXC) y dos o cuatro residuos de cisteína (Franz y col., 2007).

Como se observa en la tabla 8, las CMI para cada microorganismo son diferentes, a pesar de haber utilizado en cada grupo de cepas (*Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* LM82, LMB 911204/47 y Scott A) la misma bacteriocina. Esto puede deberse a que la determinación de la CMI depende de muchos factores, como pH, temperatura, género y especie del microorganismo, composición del medio de cultivo, antimicrobiano y ambiente del cual el microorganismo fue aislado (Chipley, 2005). Además, la comparación de CMI entre conservadores no es fácil, ya que no existe una nomenclatura universal que describa a este valor, y puede reportarse en cualquier unidad de concentración (molaridad o ppm), existen pocos conservadores reconocidos como GRAS que se reporten en CMI (ácido benzoico, diacetato de sodio, lactato de sodio, etc.) ya que esta denominación se utiliza más con los antibióticos, con los cuales sí se desea la inhibición total del microorganismo.

En el área de alimentos, como ya se mencionó en la sección anterior, no se busca la inhibición total del microorganismo (López-Malo y col. 2005), y en particular con el uso de bacteriocinas, ya que éstas siempre se han considerado como parte de una tecnología de barreras y no como un conservador único (Gálvez y col., 2007). Por lo anterior, se pueden utilizar como parámetros comparativos las CMI<sub>50%</sub> (reducción de la población microbiana en un 50%) obtenidas para las diferentes cepas de *Listeria*. Como se observa en la tabla 8, el valor más alto de la CMI<sub>50%</sub> (5130 UA/mL) se obtuvo para la bacteriocina producida por *E. faecium* MXVK29 contra *Listeria monocytogenes* Scott A, y la CMI<sub>50%</sub> más baja fue la obtenida por la bacteriocina producida por *E. faecalis* MXVK22 (680 UA/mL) contra *Listeria monocytogenes* LMB 911204/47. Los valores de CMI<sub>50%</sub> obtenidos para ambas bacteriocinas no se pueden relacionar con los valores permitidos de conservadores, para así

poder decidir si son o no concentraciones altas para ser utilizados en alimentos, pero sí se pueden referir a la nisina, que es la única bacteriocina reconocida como GRAS y que es utilizada como un conservador natural (Anónimo, 1969). Y esto a pesar que que la legislación es variable en cada país y existen diferentes límites (Thomas y Delves-Broughton, 2005) entre países (por ejemplo, 3 a 12.5 µg/g en la Unión Europea y 5-25 µg/g en Estados Unidos). De acuerdo a la legislación mexicana, no existe un límite para poder utilizar este tipo de conservador, por lo tanto los valores de bacteriocinas correspondientes a las CMI y CMI<sub>50%</sub> obtenidas en el presente trabajo podrían utilizarse para ser aplicadas en algún alimento.

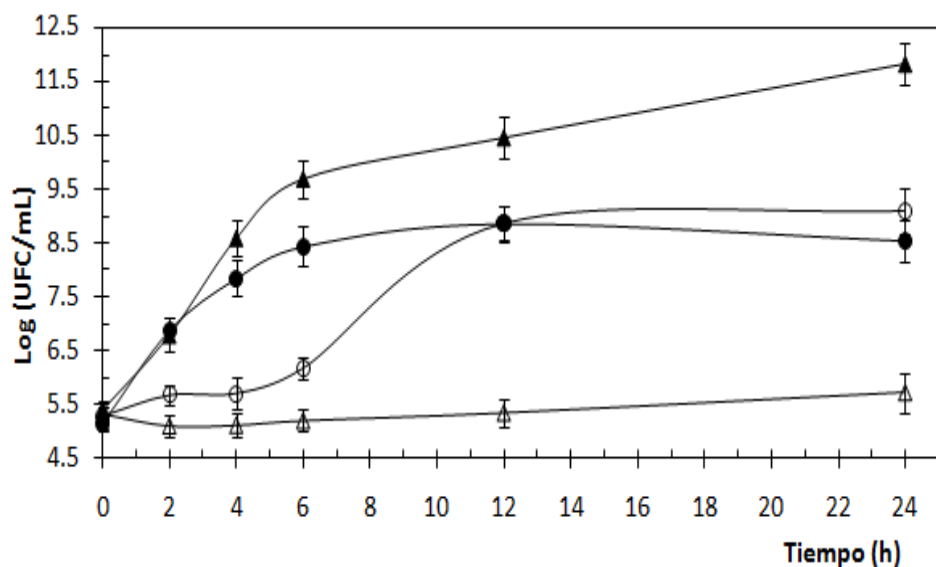
### 7.3 OBTENCIÓN DE CEPAS RESISTENTES A LA BACTERIOCINA

Este experimento se realizó con la finalidad de identificar si las bacteriocinas en estudio generan resistencia en cepas de *Listeria*, lo cual no es deseable en alimentos ya que las bacteriocinas se consideran uno de los métodos de conservación más eficientes contra *Listeria monocytogenes*. Una vez que las cepas de *Listeria* fueron sometidas a altas concentraciones de bacteriocina (como se menciona en el apartado 6.7) y se comprobó que las bacteriocinas no tenían actividad antimicrobiana contra la cepas resistentes, se verificó que estos microorganismos fueran resistentes reales a la bacteriocina y no resistentes temporales. Para ello, se estudiaron las cepas resistentes en un caldo de cultivo con una concentración de 1066 UA/mL de bacteriocina.

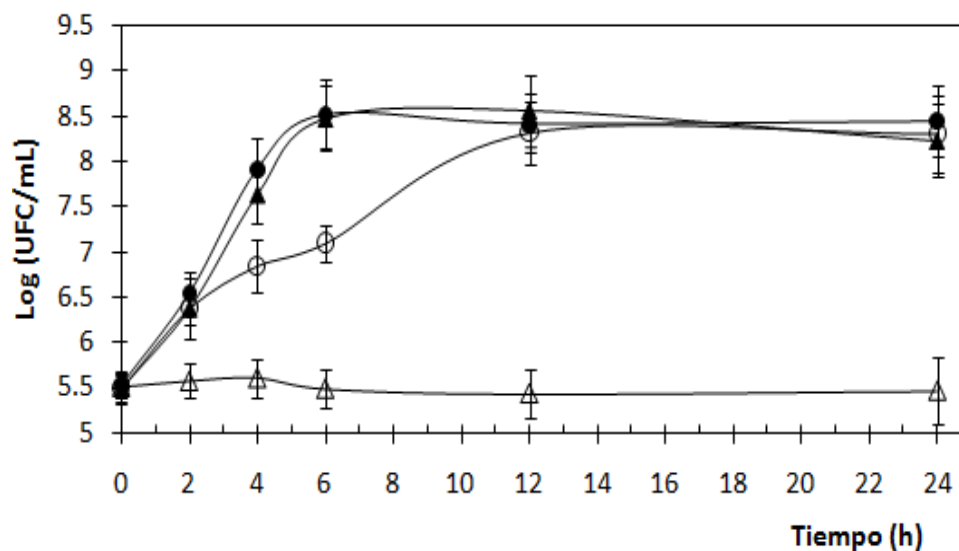
En las figuras 13 y 14 se observan las curvas de crecimiento obtenidas de las cepas de *Listeria* resistentes en presencia de la bacteriocina. Los resultados mostraron que todas las cepas inoculadas en medio con bacteriocina presentaron una fase lag menor que la que presentaron sus respectivas cepas testigo. Además la bacteriocina adicionada en el medio ya no presentó ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las cepas de *Listeria*, como sí hizo con la cepa testigo.



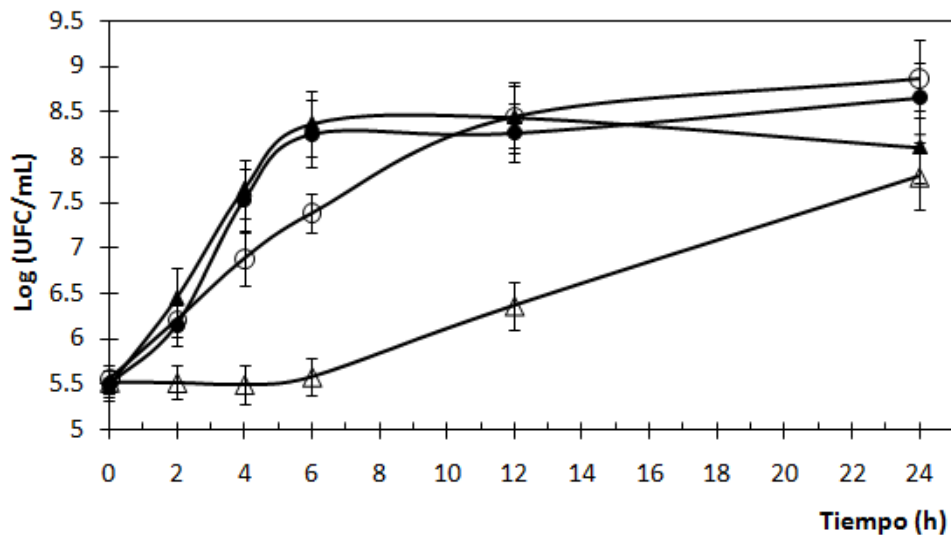
**A. *Listeria innocua* ATCC33090**



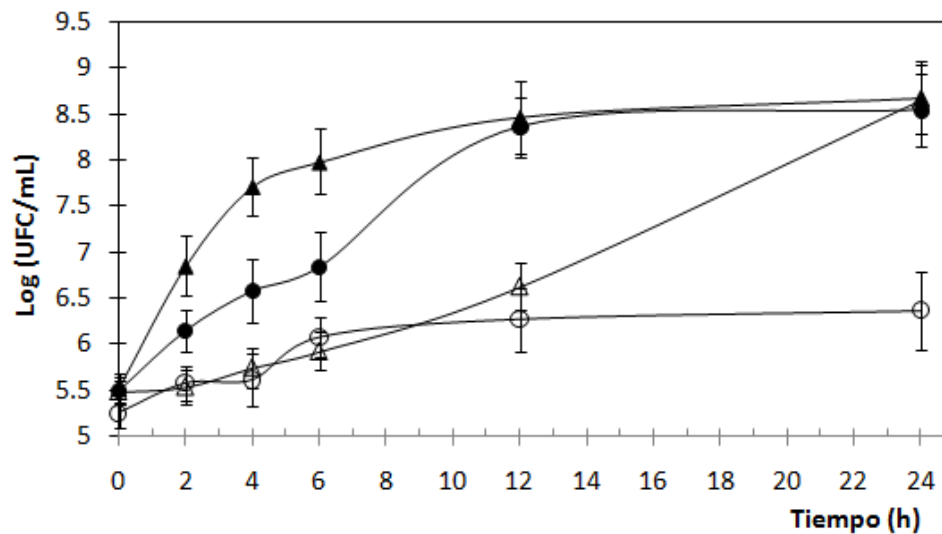
**B. *Listeria monocytogenes* LM 82**



**C. *Listeria monocytogenes* ScottA**



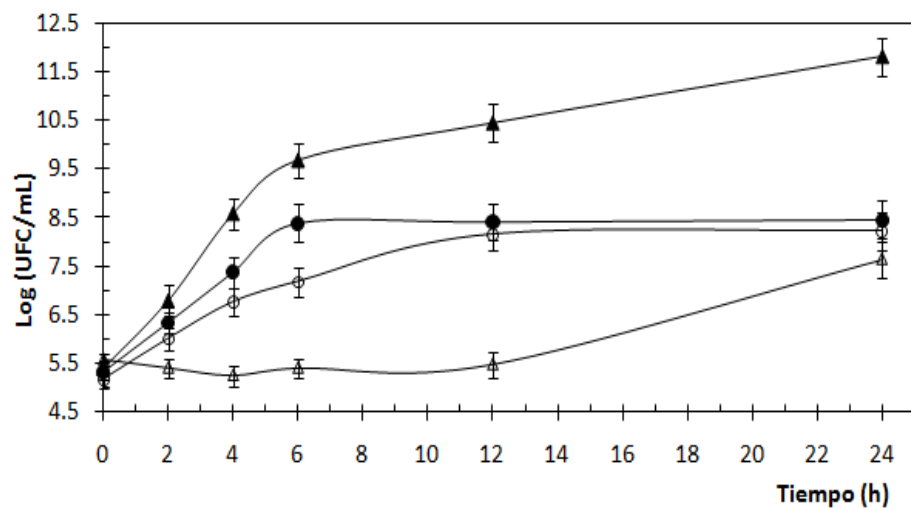
**D. *Listeria monocytogenes* LMB 911204/47**



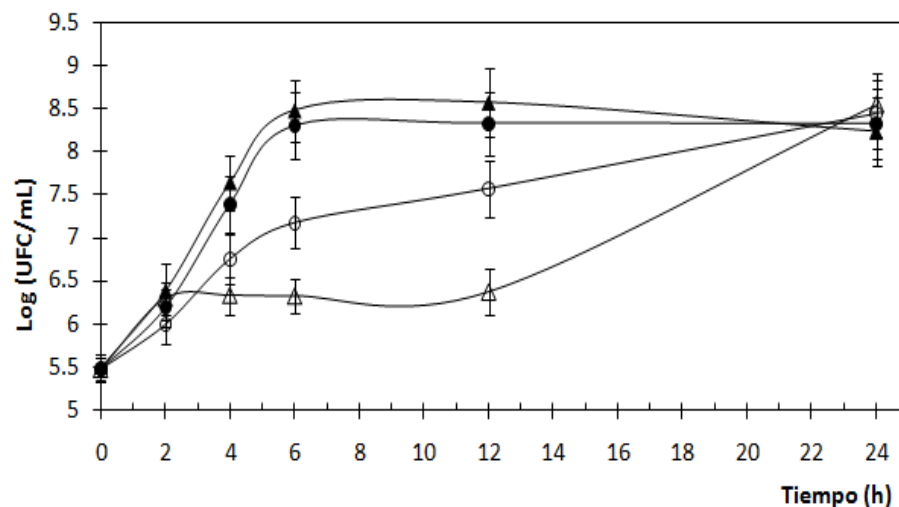
**Figura 13.-** Curvas de crecimiento de cepas silvestres y resistentes de *Listeria innocua* ATCC33090 (A) y *Listeria monocytogenes* (B, C y D) en medio TSB en presencia de 1066 UA/mL de la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* MXVK29.

 Testigo (sin bacteriocina)  
  Testigo (con bacteriocina)  
  Resistente (sin bacteriocina)  
  Resistente (con bacteriocina)

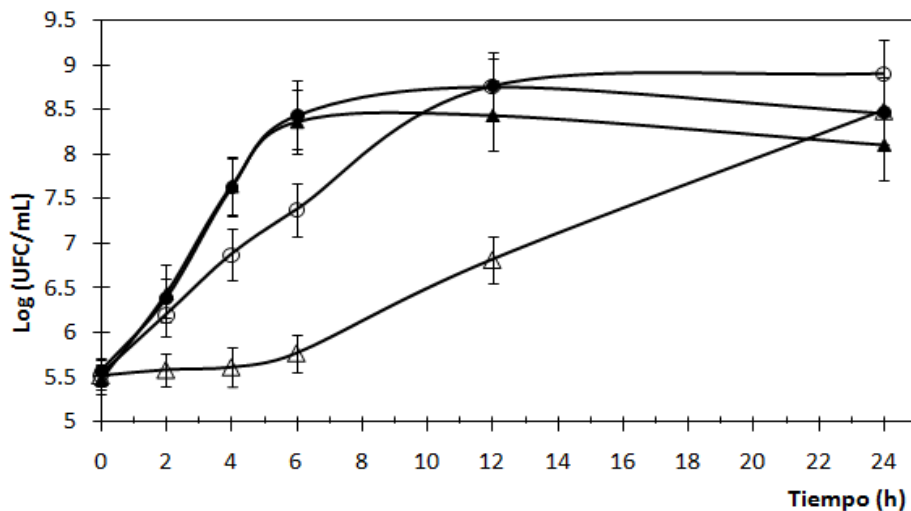
**A. *Listeria innocua* ATCC33090**



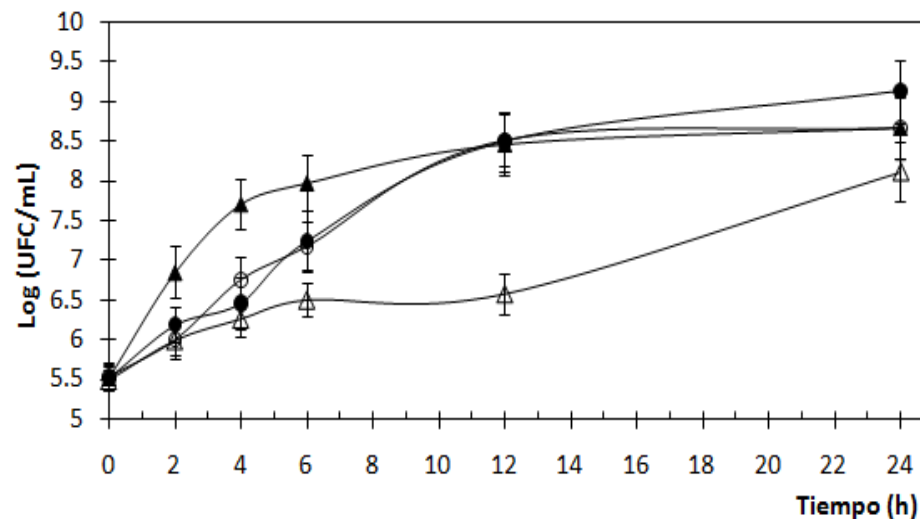
**B. *Listeria monocytogenes* LM 82**



**C. *Listeria monocytogenes* ScottA**



**D. *Listeria monocytogenes* LMB 911204/47**



**Figura 14.-** Curvas de crecimiento de cepas silvestres y resistentes de *Listeria innocua* ATCC33090 (A) y *Listeria monocytogenes* (B, C y D) en medio TSB en presencia de 1066 UA/mL de la bacteriocina producida por *Enterococcus faecalis* MXVK22.

 Testigo (sin bacteriocina)  
  Testigo (con bacteriocina)  
  Resistente (sin bacteriocina)  
  Resistente (con bacteriocina)

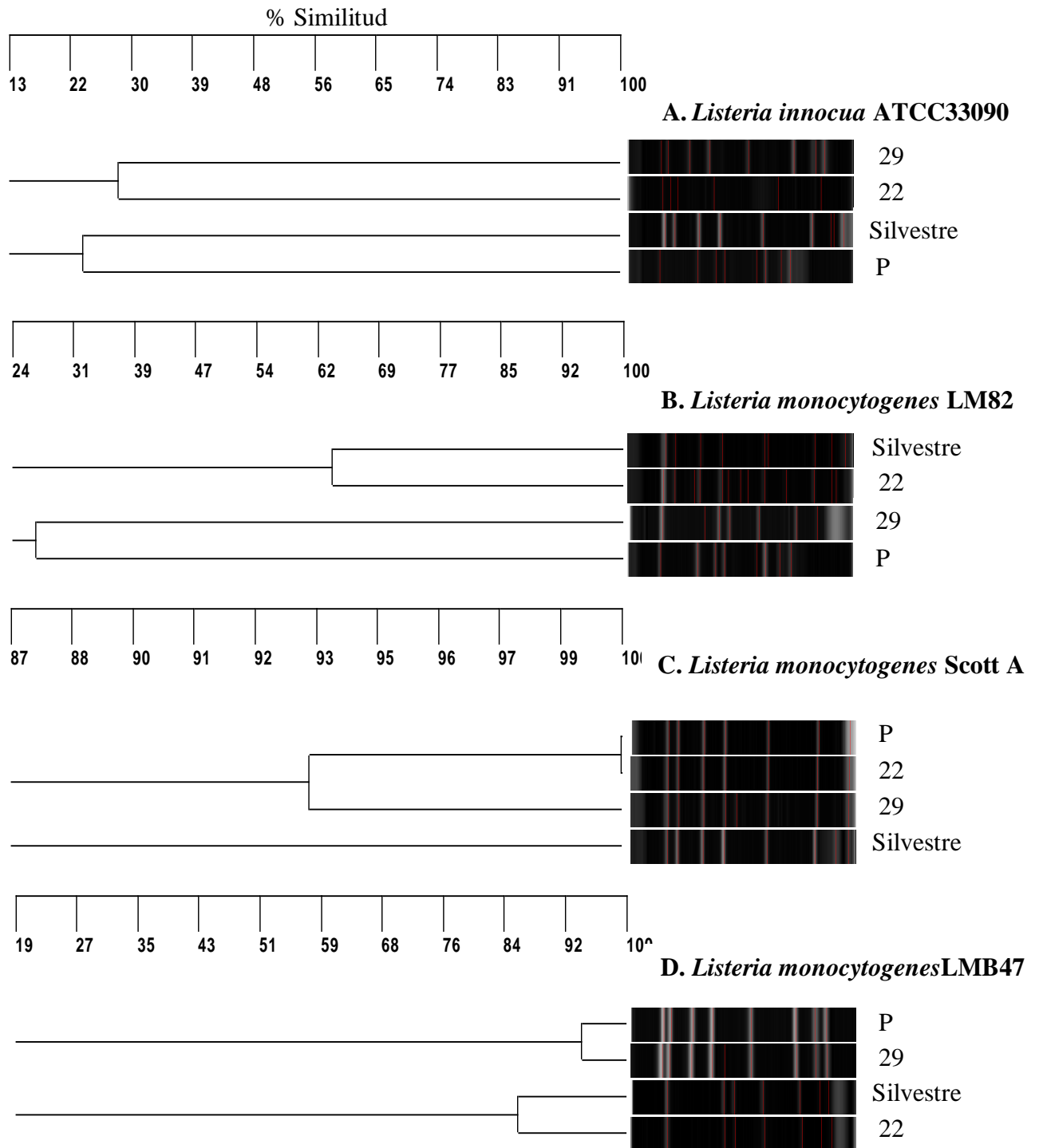
La alta concentración utilizada de inóculo nos ayuda a identificar mejor el efecto antimicrobiano del péptido, aunque el efecto observado probablemente se deba a que la resistencia generada hace que las bacteriocinas ya no presenten los mismos efectos antimicrobianos. Con estos resultados, se puede afirmar que la resistencia obtenida no es temporal, ya que de ser así al inocular nuevamente las cepas obtenidas debería haberse presentado un cierto efecto inhibitorio en la fase lag, o bien la inhibición completa del crecimiento. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (Gravesen y col., 2002a; Gravesen y col., 2002b; Chikindas y col., 2004) quienes obtuvieron cepas resistentes generadas con una alta concentración de nisina y algunas bacteriocinas de la clase IIa.

Algunas de los mecanismos propuestos que justifiquen la formación de cepas resistentes en bacteriocinas de la clase IIa son los propuestos por Vadivaloo y col. (2002, 2004a y 2004b) quienes describen células de *L. monocytogenes* resistentes que contienen niveles superiores de fosfatidilglicerol con cadenas acilo cortas, lo que les proporciona una membrana más fluida. Por otra parte, estos autores también han propuesto un mecanismo de resistencia que consiste en un cambio en el metabolismo fermentativo.

### 7.3.1 Perfil genómico de cepas silvestres y resistentes de *Listeria* sp

Este experimento se realizó con la finalidad de comprobar si la resistencia de las cepas obtenidas en la sección anterior se aprecia a nivel genómico con algún cambio en el ADN de la cepa resistente en comparación con la cepa silvestre (no resistente).

En la figura 15 se observan los dendrogramas obtenidos a partir del PFGE de cepas silvestres y resistentes de *Listeria innocua* ATCC33090, *Listeria monocytogenes* LM82, Scott A y LMB47 digeridas con la enzima *AscI*. Las cepas resistentes fueron obtenidas en la sección anterior con las bacteriocinas producidas por *E. faecalis* MXVK22 y *E. faecium* MXVK29. Como control positivo se utilizaron cepas resistentes obtenidas con la pediocina PA-1 producida por *P. acidilactici* y estudiada previamente por Alquicira (2006).



**Figura 15.** Dendrogramas obtenidos a partir del PFGE de cepas silvestres y resistentes de *Listeria innocua* ATCC33090 (A) y *Listeria monocytogenes* (B, C y D) digeridas con la enzima *AscI*. 22: Cepa resistente a la bacteriocina producida por *E. faecalis* MXVK22; 29: Cepa resistente a la bacteriocina producida por *E. faecium* MXVK29; P: Cepa resistente a la pediocina PA-1 producida por *P. acidilactici* (control positivo).

Para el caso de *Listeria innocua* ATCC33090 se puede observar que existe una similitud del 13% entre las cuatro cepas en estudio (3 resistentes y una silvestre), de acuerdo a su perfil de ADN. Además se observan dos grupos: uno que incluye a las resistentes producidas por la enterocina 22 y la 29, con una similitud del 29% entre ellas, y otro formado por la cepa silvestre y la resistente producida por la pediocina PA-1, con una similitud del 25% entre ellas. De acuerdo a Tenover y col. (1995) la cepa sensible y las resistentes obtenidas con esta cepa de *Listeria* se consideran no relacionadas debido al bajo porcentaje de similitud (< 65%), además de la diferencia de 5 bandas entre las cepas. En estos casos pudo haber existido alguna inserción o eliminación de ADN que se tradujera en una ganancia o pérdida de sitios de restricción.

Para *Listeria monocytogenes* LM82 se puede observar una similitud del 24% entre las cepas en estudio, con la formación también de dos grupos: el primero incluiría la cepa silvestre y la resistente producida con la bacteriocina 22, con una similitud del 63% entre ellas, y el segundo grupo estaría formado por la cepa resistente producida con la bacteriocina 22 y la resistente producida por la pediocina PA-1, con una similitud del 25% entre ellas. De los resultados se puede deducir que la cepa resistente de la bacteriocina 22 es más parecida a la cepa silvestre, pero se consideran posiblemente relacionadas porque existe una diferencia de 6 bandas entre ellas (Tenover y col., 1995).

Las cepas silvestre y resistentes de *Listeria monocytogenes* Scott A tienen una similitud del 87% entre ellas, lo cual indica que no son tan diferentes, pero a pesar de este porcentaje de similitud, se observan tres grupos: el primero incluye las cepas resistentes obtenidas con la enterocina 22 y la pediocina PA-1, con una similitud del 100% entre ellas, el segundo grupo está formado por el grupo 1 y la cepa resistente producida con la enterocina 29, con una similitud del 93%, y el tercer grupo está formado por la cepa silvestre, 87% similar a las cepas resistentes. En este caso, se puede concluir que las cepas resistentes obtenidas con las diferentes bacteriocinas (22, 29 y PA-1) están cercanamente relacionadas con la cepa sensible, ya que existe una diferencia de sólo 2 bandas entre ellas (Tenover y col., 1995).

Finalmente, las cepa silvestre y resistentes de *Listeria monocytogenes* LMB47 tienen una similitud del 19% entre ellas, observándose dos grupos: el primero agrupa las cepas resistentes obtenidas con la enterocina 29 y la pediocina PA-1, con una similitud del 94% entre ellas, y el segundo grupo está formado por la cepa resistente producida con la enterocina 22 y la cepa silvestre, con una similitud entre ellas del 85%. La cepa resistente obtenida con la bacteriocina 22 está posiblemente relacionada con la cepa sensible, ya que existe una diferencia de sólo 2 bandas entre ellas (Tenover y col., 1995).

En general todas las cepas resistentes muestran cambios en los perfiles genómicos con respecto a sus cepas sensibles, lo que indica que la resistencia inducida por las bacteriocinas tiene un reflejo a nivel genómico, pudiéndose realizar otros estudios para saber cuál es el mecanismo de generación de esta resistencia. Algunos autores, por ejemplo, han realizado pruebas a nivel proteómico para determinar qué proteínas se dejan de codificar en cepas resistentes a bacteriocinas de la clase IIa (Gravesen y col., 2002a; Katla y col., 2003).

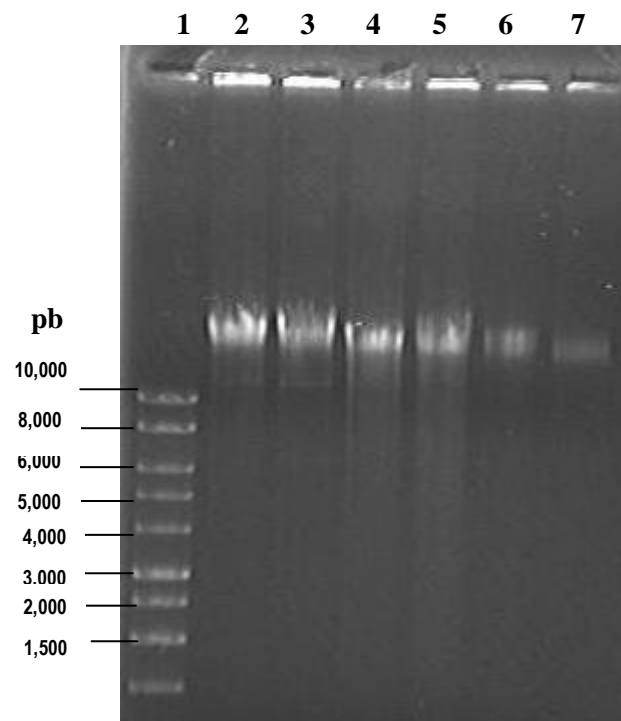
Las bacteriocinas son consideradas para ser utilizadas como conservadores naturales en muchos sistemas de alimentos (cárnicos y lácteos), sin embargo por la generación de cepas resistentes, no deben ser consideradas como un único método de conservación, sino como parte de un sistema de barreras múltiples (Katla y col., 2003; Foulquie y col., 2006; Galvez y col., 2007).

## **7.4 ASPECTOS DE SEGURIDAD DE CEPAS DE ENTEROCOCOS**

### **7.4.1 Obtención de ADN genómico**

La extracción de ADN total es un paso muy importante para realizar la amplificación de algún gen de interés. La utilización de kits comerciales ayuda a realizar extracciones más rápidas y, en algunos casos, con mejores rendimientos. Estos kits están basados en protocolos de extracción que utilizan los pasos básicos para obtener ADN: lisis celular (rotura de la pared), purificación (fenolización) y concentración por precipitación.

En la figura 16 se observa el perfil electroforético del ADN total extraído de seis cepas (*E. faecalis* MXVK22, *E. faecium* MXVK29 y cuatro cepas control). Como se aprecia en la figura, el carril 1 corresponde al marcador comercial de ADN 1 kpb (Promega). Durante la extracción es deseable obtener fragmentos completos de ADN, en la figura 16 se observa que en todos los casos obtenemos bandas mayores a 10,000 pb lo que indica que tenemos la concentración y el tamaño suficiente de pb para realizar una amplificación de los genes de interés.



**Figura 16.** ADN total extraído de diferentes cepas. Carril 1: marcador comercial de 1 kpb. Carril 2: *E. faecalis* MXVK22. Carril 3: *E. faecium* MXVK29. Carril 4-7 (controles): *P. acidilactici*, *E. faecium* SF68, *E. faecalis* NCIMB-700585 y *E. faecalis* ATCC29212.

## 7.4.2 Detección de factores de virulencia por PCR

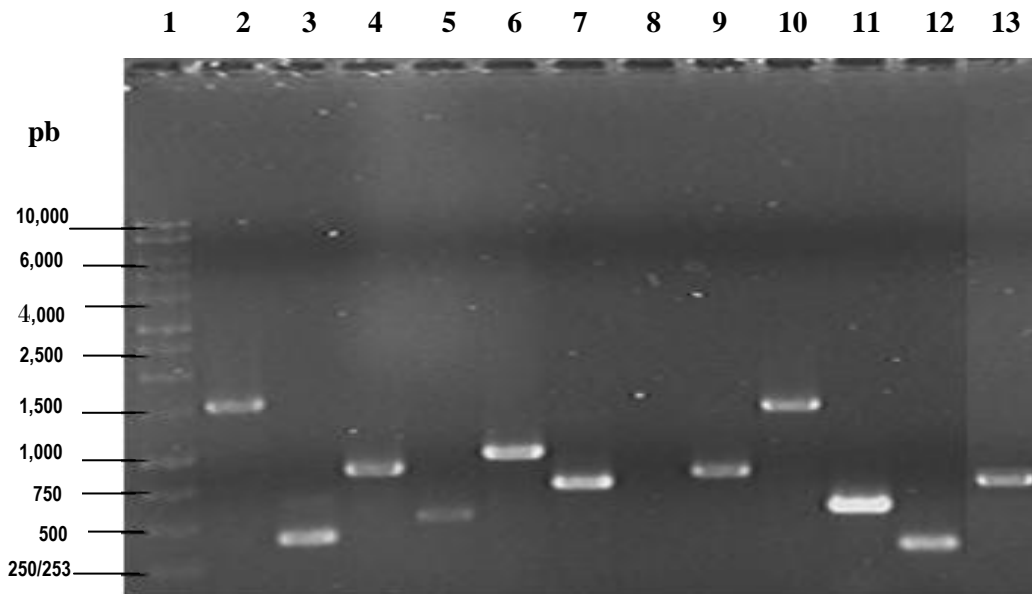
### 7.4.2.1 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)

La amplificación de los genes *cylA*, *cylB* y *cylM*, *agg*, *gelE*, *esp*, *efaA<sub>fs</sub>*, *efaA<sub>fm</sub>*, *cpd*, *cob*, *ccf* y *ace*; se realizó por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), utilizando los cebadores de la tabla 3, que corresponden a los diferentes factores de virulencia.

En primer lugar se realizó un PCR para todos los genes y con el ADN de las cepas control para estandarizar los controles positivos y negativos. Para obtener las condiciones de amplificación se utilizó la temperatura de hibridación más baja descrita en la literatura para estos genes (Dutka-Malen y col., 1995; Eaton y Gasson, 2001; Vankerckhoven y col., 2004; Pérez-Pulido y col., 2006; Abriouel y col., 2008), que es de 54°C, respetando todas las demás condiciones de temperatura, tiempo y concentración en la mezcla de PCR.

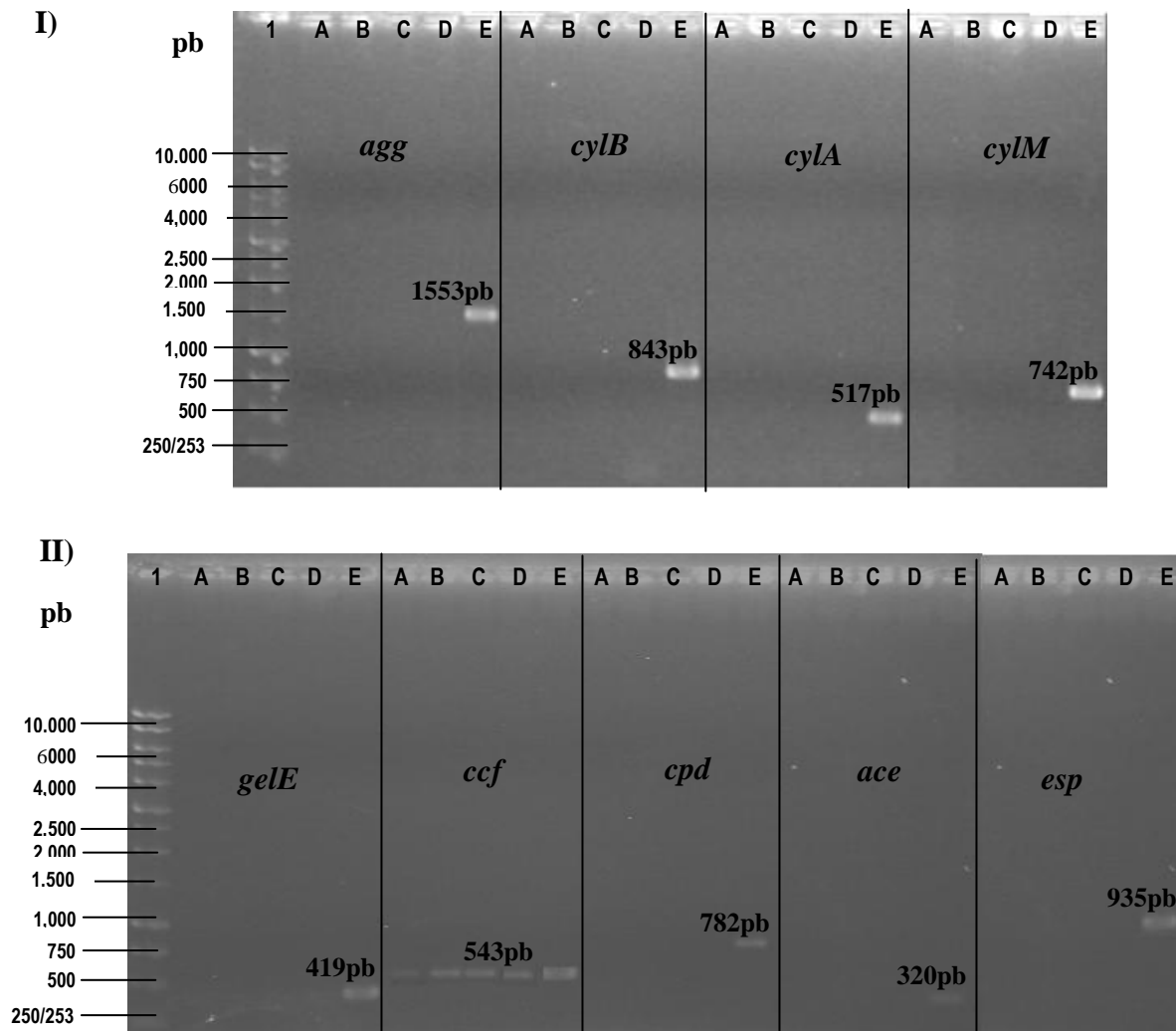
En la figura 17 se muestra el perfil electroforético de los productos de PCR obtenidos del ADN de la cepa *E. faecalis* NCIMB-700585 utilizada como control positivo para todos los genes. *E. faecium* SF68 se utilizó como control positivo para el gen *efaA<sub>fm</sub>* (dato no mostrado), con una temperatura de hibridación de 54°C. Para corroborar que se habían obtenido los fragmentos de interés, se compararon los tamaños de los productos obtenidos con los indicados en las referencias (Dutka-Malen y col., 1995; Eaton y Gasson, 2001; Pérez-Pulido y col., 2006). Como controles negativos se utilizaron *E. faecium* SF68 (para todos los genes excepto *esp*, *efaA<sub>fm</sub>* y *cob* y *ccf*), *E. faecalis* ATCC29212 (*esp*, *cob* y *ace*) y *E. faecalis* NCIMB-700585 (*efaA<sub>fm</sub>*). Para el gen *ccf* no se encontró ningún control negativo. Una vez obtenidos los controles positivos y negativos para cada gen a amplificar (*agg*, *gelE*, *cylMBA*, *esp*, *efaA<sub>fs</sub>*, *efaA<sub>fm</sub>*, *cpd*, *cob*, *ccf* y *ace*) se realizaron las PCR para las dos cepas de estudio (*E. faecalis* MXVK22 y *E. faecium* MXVK29).





**Figura 17.** Perfil electroforético de los fragmentos amplificados por PCR a 54°C de *E. faecalis* NCIMB-700585. Carril 1: marcador comercial de 1kpb. Carril 2: *agg*. Carril 3: *gelE*. Carril 4, 5 y 13: *cylMBA*. Carril 6: *esp*. Carril 7: *efaAfs*. Carril 8: *efaAfm*. Carril 9: *cpd*. Carril 10: *cob*. Carril 11: *ccf*. Carril 12: *ace*.

En la figura 18 se observan los genes amplificados para las cepas *E. faecalis* MXVK22 y *E. faecium* MXVK29, así como sus respectivos controles. Como se muestra, los genes *agg*, *cylMBA*, *gelE*, *cpd*, *ace* y *esp* no fueron detectados para ninguna de las cepas probadas y sólo se amplificaron en *E. faecalis* NCIMB-700585 (control positivo). Los resultados encontrados para la cepa *Enterococcus faecium* MXVK29 son parecidos a los reportados por otros autores (Pérez-Pulido y col., 2006; Ben Belgacem y col., 2010); pero los resultados obtenidos para *Enterococcus faecalis* MXVK22 difieren con los reportados en la bibliografía para cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas de alimentos (Eaton y Gasson, 2001; Canzek y col., 2005), las cuales presentan en su mayoría todos los genes que codifican para factores de virulencia (*agg*, *cylMBA*, *gelE*, *cpd*, *ace* y *esp*).



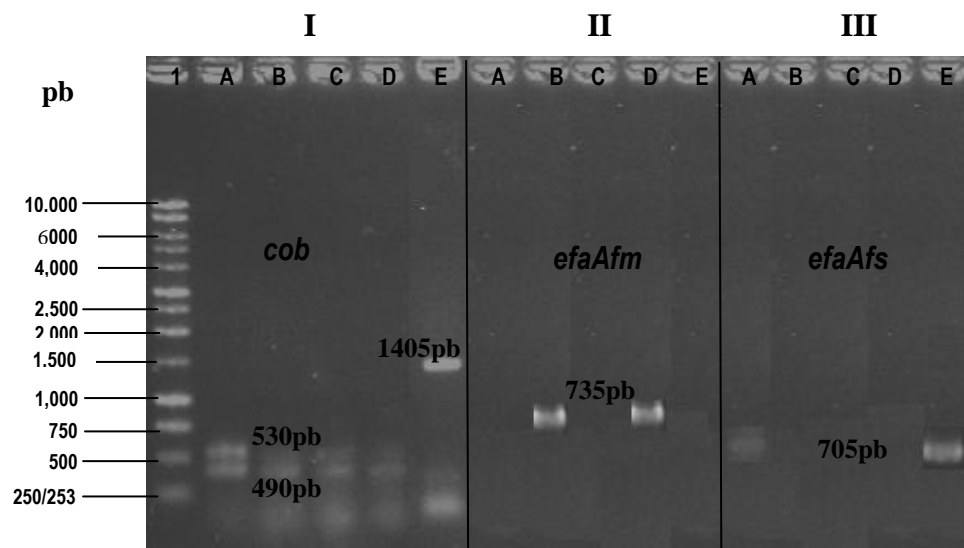
**Figura 18.** Perfil electroforético en gel de agarosa al 0.8% de los genes de virulencia amplificados por PCR. I) Genes *agg*, *cylMBA*. II) Genes *gelE*, *ccf*, *cpd*, *ace*, y *esp*. Carril 1: marcador comercial de 1kpb. Carril A: *Enterococcus faecalis* MXVK22. Carril B: *Enterococcus faecium* MXVK29. Carril C: *Pediococcus acidilactici*. Carril D: *E. faecium* SF68 (control negativo). Carril E: *E. faecalis* NCIMB-700585 (control positivo).

En la figura 18-II se observa la amplificación del gen *ccf* (feromona sexual) para todas las cepas probadas y control. La presencia de esta feromona es común en enterococos, y algunos autores han reportado la presencia de este gen en cepas aisladas de diferentes fuentes (cultivos iniciadores, alimentos y clínicos) (Eaton y Gasson, 2001; Canzek y col., 2005; Pérez-Pulido y col., 2006; Abriouel y col., 2008; Belgacem y col., 2010). Nuestros resultados incluyen la amplificación de este gen en la cepa *E. faecium* SF68, una cepa probiótica

comercializada actualmente en forma de liofilizado, lo que estaría de acuerdo con esas afirmaciones. Aunque las feromonas sexuales no son consideradas factores de virulencia, su producción podría favorecer la transferencia de genes de virulencia y de resistencia a antibióticos entre cepas, ya sea de forma horizontal o vertical, lo que ocasionaría un aumento en la patogénesis de algunos microorganismos; a pesar de esto estas feromonas son necesarias para los procesos de conjugación (Eaton y Gasson, 2001; Pérez-Pulido y col., 2006; Belgacem y col., 2010). La presencia de alguna feromona sexual no supone, por lo tanto, un problema de patogénesis, sobre todo si no se amplifican adicionalmente otros genes que codifiquen para factores de virulencia.

En la figura 19, se observa el perfil electroforético de los fragmentos amplificados de los genes *cob*, *efaAfm* y *efaAfs*. Como se muestra, el gen *cob* sólo se amplificó en la cepa de control positivo, con un tamaño de fragmento de 1405 pb. Se puede observar en la parte inferior del gel dos bandas amplificadas de menos tamaño (530 y 490 pb), por lo que se procedió a realizar una PCR en gradiente modificando la temperatura de hibridación hasta 58°C, para mejorar la especificidad de los oligonucleótidos. Con esta temperatura sólo se consiguió mejorar la amplificación de estas bandas pequeñas (dato no mostrado). Algunos autores indican que la presencia de estas feromonas no son factores de virulencia graves, mientras no se presente el gen *agg* (proteína de agregación), además se ha observado la presencia de esta feromona en cultivos iniciadores como *E. faecalis* F27 y *E. faecalis* F41 (aislados de queso manchego español y leche comercial, respectivamente) y en cepas aisladas de alimentos (Eaton y Gasson, 2001; Pérez-Pulido y col., 2006).

Por otra parte, también se muestra la amplificación de fragmentos correspondientes a los genes *efaAfm* y *efaAfs*, los cuales son adhesinas de la pared celular características de *E. faecium* y *E. faecalis*, respectivamente. Algunos autores mencionan que es común encontrar este tipo de adhesinas en cepas de enterococos aisladas de alimentos (Eaton y Gasson, 2001; Canzek y col., 2005). El gen *efaAfs* ha demostrado una influencia de patogenicidad en modelos animales, a diferencia de *efaAfm*, que no ha mostrado ser un factor de patogenicidad en los estudios realizados hasta el momento (Eaton y Gasson, 2001).



**Figura 19.** Perfil electroforético de los fragmentos amplificados por PCR para los genes *cob*, *efaAfm* y *efaAfs*. Carril 1: marcador comercial de 1kpb. Carril A: *Enterococcus faecalis* MXVK22. Carril B: *Enterococcus faecium* MXVK29. Carril C: *Pediococcus acidilactici*. Carril D: *E. faecalis* ATCC29212 (I), *E. faecium* SF68 (II y III). Carril E: *E. faecalis* NCIMB-700585.

Con los resultados obtenidos hasta el momento, podemos decir que ambas cepas de enterococos (*Enterococcus faecium* MXVK29 y *Enterococcus faecalis* MXVK22) pueden ser considerados libres de genes que contribuyan a la patogenicidad de las cepas en estudio, aunque contienen los genes de algunas adhesinas (*efaAfm* y *efaAfs*) y de la feromona *ccf*, que hasta el momento no se consideran factores de virulencia y también están presentes en la cepa probiótica de uso comercial (*Enterococcus faecium* SF68).

#### 7.4.3 Determinación de la susceptibilidad a antibióticos

Una característica importante a evaluar en el género *Enterococcus* es la resistencia que presenta a ciertos antibióticos, lo cual es un parámetro importante para determinar su patogénesis (debido a la transferencia horizontal o vertical de genes de resistencia que se puede presentar entre diferentes microorganismos). Para realizar esta determinación se utilizaran dos técnicas diferentes: la primera es el método de difusión en agar utilizado ampliamente por el CLSI (2006) y la segunda la amplificación de genes que codifican para la

resistencia a antibióticos. Ambas técnicas se utilizan como un complemento, debido a que el método de difusión es poco discriminativo y en ocasiones puede producir falsos negativos.

#### 7.4.3.1 Método de difusión en agar

En la tabla 9 se puede observar la sensibilidad a diferentes clases de antibióticos que presentaron las cepas testigo (*E. faecalis* MXVK22 y *E. faecium* MXVK29). Los resultados se interpretan como resistente, sensible e intermedia, de acuerdo al CLSI (2006). *E. faecium* MXVK29 fue sensible a todos los antibióticos probados, excepto a eritromicina que obtuvo una sensibilidad intermedia (aunque esta sensibilidad también podría interpretarse como una resistencia al antibiótico, considerando la desviación obtenida, de  $\approx 13$  mm). Con respecto a *E. faecalis* MXVK22, sólo mostró resistencia a tetraciclina y vancomicina, mientras que con los demás antibióticos se observó un efecto de sensibilidad.

**Tabla 9.** Resistencia a antibióticos por el método de difusión en disco.

| Antibiótico              | Diámetro del halo (mm) <sup>a</sup> |       |     | Interpretación de resultados <sup>a</sup> |                          |                           |                          |
|--------------------------|-------------------------------------|-------|-----|---|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
|                          | R                                   | I     | S   | <i>E. faecalis</i> MXVK22                 | <i>E. faecium</i> MXVK29 | <i>E. faecalis</i> MXVK22 | <i>E. faecium</i> MXVK29 |
| Penicilina               | ≤14                                 | 15-16 | ≥17 | 25±0.707                                  | 19±0.707                 | S                         | S                        |
| Tetraciclina             | ≤14                                 | 15-18 | ≥19 | 13±2.121                                  | 26±2.121                 | R                         | S                        |
| Vancomicina              | ≤14                                 | 15-16 | ≥17 | ND  | 18±1.121                 | R                         | S                        |
| Eritromicina             | ≤13                                 | 14-22 | ≥23 | 30±0.707                                  | 15±2.121                 | S                         | I                        |
| Cloranfenicol            | ≤12                                 | 13-17 | ≥18 | 22±0.707                                  | 20±0.707                 | S                         | S                        |
| Gentamicina              | ≤6                                  | 7-9   | ≥10 | 22±2.828                                  | 11±0.707                 | S                         | S                        |
| Neomicina <sup>b</sup>   | ≤6                                  | 7-9   | ≥10 | 23±1.414                                  | 14±1.414                 | S                         | S                        |
| Kanamycin <sup>b</sup>   | ≤6                                  | 7-9   | ≥10 | 14±0.707                                  | 11±0.707                 | S                         | S                        |
| Netilmicina <sup>b</sup> | ≤6                                  | 7-9   | ≥10 | 27±0.707                                  | 13±1.414                 | S                         | S                        |

<sup>a</sup> Diámetro del halo (incluyendo el disco de antibiótico) e interpretación de resultados de acuerdo al NCCLS (2006); R(resistente), I (intermedio) y S (sensible).

<sup>b</sup> Se consideran los mismos límites de resistencia utilizados para gentamicina, ya que pertenecen al mismo grupo de antibióticos (aminoglicósidos).

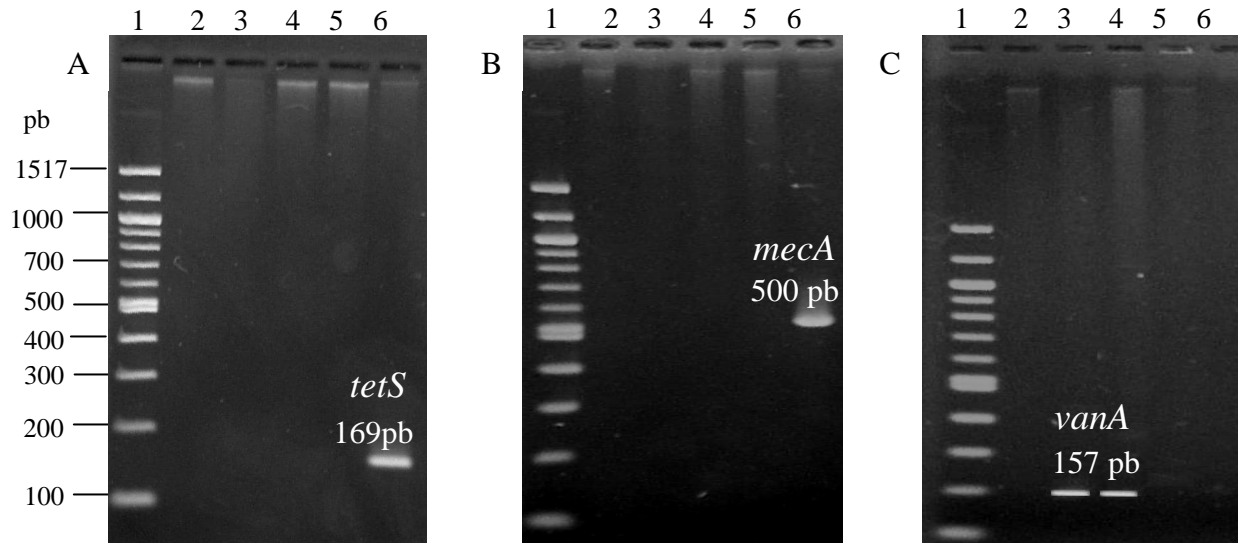
ND (No hay halo de inhibición)

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por algunos autores (Duprè y col., 2003; Martin y col., 2005; Pérez-Pulido y col., 2006; Ben Belgacem y col., 2010), quienes indican que un gran porcentaje de cepas de enterococos aisladas de alimentos presenta resistencia a ciertos antibióticos, como la eritromicina. La presencia de esta resistencia en *E. faecium* MXVK29 se podría explicar como una resistencia adquirida por plásmidos o transposones, de acuerdo a estudios realizados por Murray (1990) y no una resistencia intrínseca (lo que explicaría por qué *E. faecalis* MXVK22 no la presenta también).

#### 7.4.3.2 Determinación de genes de resistencia por PCR

Como ya se mencionó la técnica de PCR es un complemento al método de difusión en agar, para poder confirmar la presencia de ciertas resistencias de interés; la PCR principalmente se utiliza para confirmar la presencia de genes de resistencia a vancomicina, ampicilina, penicilina y gentamicina, por ser antibióticos de mayor relevancia clínica para curar infecciones con resistentes múltiples a los antibióticos (Ben Belgacem y col., 2010).

Para el desarrollo de este trabajo se analizaron por PCR la presencia de los genes que codifican para enzimas que están involucradas en la resistencia a ciertos antibióticos como: tetraciclina (*tesS* y *tetM*), cloranfenicol (*catA*), penicilinas (*mecA*) y vancomicina (*vanA*). En la figura 20 se muestra el perfil electroforético de la amplificación de los genes *tesS*, *mecA* y *vanA*. Como se observa, las cepas en estudio (*E. faecium* MXVK29 y *E. faecalis* MXVK22) no amplificaron los genes *tesS*, *mecA*, *catA* y *tetM* (no se presentan los perfiles de estos últimos dos genes debido a que no se obtuvieron controles positivos), sin embargo *E. faecalis* MXVK22 presentó un fragmento amplificado de aproximadamente 157 pb para el gen *vanA* lo que nos indica que esta cepa adquirió el material genético para desarrollar cierta resistencia (Murray, 1990). El fenotipo Van A se caracteriza por presentar resistencia a vancomicina y a teicoplanina, además este tipo de resistencia es transferible ya que se encuentra en un plásmido y es común encontrarlo en cepas de *E. faecium* y, principalmente, *E. faecalis* (Yean y col., 2007).



**Figura 20.** Perfil electroforético de los fragmentos amplificados por PCR para los genes *tetS* (A), *mecA* (B) y *vanA* (C). Carril 1: marcador comercial de 100 pb (Bio-Labs). Carril 2: *Enterococcus faecium* MXVK29. Carril 3: *Enterococcus faecalis* MXVK22. Carril 4A y 4B: *Pediococcus acidilactici* (control negativo *tetS* y *mecA*). Carril 4C: *Pediococcus acidilactici* (control positivo *vanA*). Carril 5: *Enterococcus faecium* SF68 (control negativo A, B y C). Carril 6A: 8Sc (control positivo *tetS*). Carril 6B: *Staphylococcus aureus* (control positivo *mecA*). Carril 6C: 8Sc (control negativo *vanA*);

En la tabla 10 se presentan los resultados obtenidos por las dos metodologías utilizadas. Para el caso del antibiótico vancomicina se observa que la resistencia presentada por *E. faecalis* MXVK22 fue corroborada, ya que para el antibiograma se observó un halo cuyo diámetro indica una resistencia de la cepa al antibiótico y por PCR se obtuvo la amplificación del gen *vanA*. Estos resultados son diferentes a los reportados para cepas aisladas de alimentos (Dupré y col., 2003; Canzek y col., 2005; Sparo y col., 2008) debido a que en esos trabajos no se presentó resistencia a vancomicina. Sin embargo, los aislados clínicos de enterococos presentan un elevado porcentaje de resistencia al antimicrobiano (Dutka-Malen y col., 1995; Vankerckhoven y col., 2004; Martin y col., 2005). Al ser ésta una resistencia adquirida puede ser transferida por plásmidos a microorganismos presentes en alimentos, principalmente enterococos que se consideran una flora nativa del ser humano (Kang y Lee, 2005).

**Tabla 10.** Comparación entre PCR y antibiogramas para determinar la resistencia a antibióticos.

| Microorganismo                               | PCR         |              |            | Antibiogramas |              |            |
|--|-------------|--------------|------------|---------------|--------------|------------|
|  | Vancomicina | Tetraciclina | Penicilina | Vancomicina   | Tetraciclina | Penicilina |
| <i>Enterococcus faecium</i><br>MXVK29        | -           | -            | -          | -             | -            | -          |
| <i>Enterococcus faecalis</i><br>MXVK22       | +           | -            | -          | +             | +            | -          |
| <i>Pediococcus acidilactici</i><br>(control) | +           | -            | -          | +             | +            | -          |
| <i>Enterococcus faecium</i><br>SF68(control) | -           | -            | -          | NR            | NR           | NR         |
| 8Sc (control)                                | -           | +            | NR         | NR            | NR           | NR         |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>(control)    | NR          | NR           | +          | NR            | NR           | NR         |

Resistencia (+); Sin resistencia (-); NR (Técnica no realizada para la cepa)

Los resultados obtenidos para las tetraciclinas son ambiguos, debido a que como se observa en el antibiograma se observó una resistencia de *E. faecalis* MXVK22 y de *Pediococcus acidilactici*, pero al realizar la búsqueda de genes (*tetS* y *tetM*) no se observó la amplificación de ningún gen para las cepas en estudio. Estos resultados se pueden explicar debido a que el mecanismo de resistencia de tetraciclinas es muy variado, Roberts (2005) ha descrito tres mecanismos principales de resistencia a tetraciclinas (flujo activo, protección ribosomal e inactivación enzimática) y cada mecanismo está conformado por diferentes genes. Los genes utilizados en este estudio codifican para proteínas que generan una protección ribosomal, impidiendo así que el antibiótico actúe sobre el ribosoma (Jara, 2007); si la cepa de *E. faecalis* MXVK22 no presenta este mecanismo de resistencia y posee alguno de los otros dos mecanismos, los genes *tetS* y *tetM* no se encontrarían en el genoma de la cepa. La literatura es también ambigua a este respecto: algunos autores han encontrado cepas aisladas de alimentos resistentes a este antibiótico y otras sensibles; por ejemplo, Martin y col. (2005) y Pérez-Pulido y col. (2006) encontraron resistencia a tetraciclinas en cepas de *E. faecalis*, al contrario que otros autores (Teuber y col., 1999; Franz y col., 2001; Dupré y col., 2003; Sparo y col., 2008). Por otra parte, Pavia y col. (2000) han descrito la alta frecuencia de resistencia a tetraciclinas en cepas de enterococos aisladas de productos cárnicos.



Shalini y col. (2005) y Hummel y col. (2007) han observado una gran incidencia de resistencia a diferentes antibióticos en cepas aisladas de productos alimenticios (leche, carne, pollo) o de cultivos iniciadores, por lo tanto es importante determinar este factor en cepas que se desea utilizar en la industria de los alimentos.

#### 7.4.4 Determinación de la actividad amino-descarboxilasa

La actividad amino descarboxilasa se evalúa midiendo la formación de aminas biogénicas, que son compuestos orgánicos nitrogenados alcalinos formados por enterobacterias, algunos microorganismos alterantes (*Pseudomonas* sp.) y bacterias ácido lácticas, (utilizadas principalmente como cultivos iniciadores, por lo cual se encuentran principalmente en alimentos fermentados como quesos, vinos, cerveza y embutidos). La presencia de altas concentraciones de histamina y tiramina en alimentos es un riesgo potencial para los consumidores, ya que pueden causar enfermedades como intoxicación histamínica, migraña e hipertensión entre otras; además la presencia de putrescina y cadaverina son consideradas indicadores de descomposición. Por lo anterior, es importante determinar la capacidad amino descarboxilasa de las cepas de enterococos con alto potencial para ser aplicada en alimentos, para que así no contribuyan a la formación de aminas adicionales al producto fermentado (Hugas y col., 2003; Suzzi y Gardini, 2003).

En la tabla 11 se presentan los resultados de la capacidad amino descarboxilasa de *E. faecium* MXVK29 y *E. faecalis* MXVK22. Como se observa, ninguna de las dos cepas presentó formación de aminas biogénicas (histamina, cadaverina y putrescina) en condiciones aeróbicas ni anaeróbicas; excepto *E. faecium* MXVK29 que presentó descarboxilación de tirosina a tiramina (en ambas condiciones de crecimiento). Por otra parte, se utilizó un control (sin aminoácidos) para garantizar que no se obtuvieran falsos positivos (Bover-Cid y Holzapfel, 1999).

**Tabla 11.** Producción de aminas biogénicas.

| MICROORGANISMOS                                    | CONDICIONES AEROBIAS |     |      |     |         | CONDICIONES ANAEROBIAS |     |     |     |         |
|--|----------------------|-----|------|-----|---------|------------------------|-----|-----|-----|---------|
|  | HIS                  | CAD | PUTR | TIR | CONTROL | HIS                    | LIS | ORN | TIR | CONTROL |
| <i>E. faecalis</i> MXVK22                          | -                    | -   | -    | -   | -       | -                      | -   | -   | -   | -       |
| <i>E. faecium</i> MXVK29                           | -                    | -   | -    | +   | -       | -                      | -   | -   | +   | -       |
| <i>P. acidilactici</i><br>(control negativo)       | -                    | -   | -    | -   | -       | -                      | -   | -   | -   | -       |
| <i>E. faecalis</i> ATCC29212<br>(control positivo) | +                    | +   | +    | +   | -       | +                      | +   | +   | +   | -       |

(-) No se observó vire de color en el medio (morado); (+) Se observó cambio en el color del medio de cultivo, en el caso de tirosina se observa un halo transparente.

HIS (histamina); CAD (cadaverina); PUTR (putrescina); TIR (tiramina); Control (caja control s/aminoácidos).

Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por varios autores (Bover-Cid y Holzapfel, 1999; Suzzi y Gardini, 2003; Pérez-Pulido y col., 2006; Sparo y col., 2008), que observaron la capacidad de *E. faecium* para descarboxilar tirosina en condiciones aerobias y anaerobias, aunque Pérez-Pulido y col. (2006) indicaron que es poco probable que la formación de tiramina se lleva a cabo en altas concentraciones en el producto fermentado donde se aplique el microorganismo de interés. Para aceptar esta afirmación sería necesario cuantificar la cantidad de tiramina producida por *E. faecium* MXVK29 con el objeto de decidir si puede ocasionar problemas de salud. Por otra parte, Sparo y col. (2008) determinaron que la cepa *E. faecalis* CECT7121 no producía ningún tipo de amina biogénica, lo cual es similar al resultado obtenido para *E. faecalis* MXVK22.

## 7.5 PURIFICACIÓN DE LA BACTERIOCINA

La purificación de las bacteriocinas producidas por *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Enterococcus faecalis* MXVK22 fue realizada con un método dependiente del pH, un proceso de diálisis (eliminación de sales) y una concentración mediante liofilización. El procedimiento de purificación se resume en la tabla 12.

**Tabla 12.** Recuperación de bacteriocina en los diferentes pasos de purificación.

| Bacteriocina recuperada                   | EB de <i>Enterococcus faecium</i> MXVK29 |                 | EB de <i>Enterococcus faecalis</i> MXVK22 |                 |
|---|--|-----------------|---|-----------------|
|   | Actividad (UA/mL)                        | Rendimiento (%) | Actividad (UA/mL)                         | Rendimiento (%) |
| Sobrenadante de cultivo <sup>a</sup>      | 2.6 x 10 <sup>5</sup>                    | 100             | 5.3 x 10 <sup>5</sup>                     | 100             |
| Adsorción de la bacteriocina <sup>a</sup> | 6.6 x 10 <sup>4</sup>                    | 25.4            | 1.3 x 10 <sup>5</sup>                     | 24.5            |
| Desorción de la bacteriocina <sup>b</sup> | 1.6 x 10 <sup>5</sup>                    | 61.5            | 4.1 x 10 <sup>5</sup>                     | 77.4            |
| Liofilizado total <sup>c</sup>            | 8.5 x 10 <sup>4</sup>                    | 32.7            | 1.7 x 10 <sup>5</sup>                     | 32.1            |
| UA/g de masa seca <sup>d</sup>            | 4.0 x 10 <sup>5</sup>                    |                 | 4.7 x 10 <sup>5</sup>                     |                 |
| UA/g de proteína <sup>d</sup>             | 1.7 x 10 <sup>9</sup>                    |                 | 4.3 x 10 <sup>9</sup>                     |                 |

<sup>a</sup>UA totales en un litro de medio de cultivo.

<sup>b</sup>UA totales en relación al volumen recuperado en cada paso.

<sup>c</sup>UA en el liofilizado (determinado al resuspender el liofilizado en 1 mL de agua estéril.

<sup>d</sup>Después de liofilizar, se determinó el valor de masa seca (211 mg para el EB de *Enterococcus faecium* MXVK29 y 365 mg para el EB de *Enterococcus faecalis* MXVK22) y el total de proteína (50 µg para el EB de *Enterococcus faecium* MXVK29 y 40 µg para el EB de *Enterococcus faecalis* MXVK22). EB (extracto de bacteriocina).

Los resultados son el promedio de tres extracciones.

Los resultados muestran que en el extracto de bacteriocina (EB) la actividad antimicrobiana, mostrada contra *Listeria innocua* ATCC33090, fue mayor para el EB obtenido para *Enterococcus faecalis* MXVK22 (5.3 x 10<sup>5</sup> UA/mL) que para el EB de *Enterococcus faecium* MXVK29. Este resultado coincide con lo obtenido por Álvarez-Cisneros (2007), quien además indicó un mayor espectro de inhibición contra microorganismos de deterioro para la bacteriocina producida por la cepa de *E. faecalis* MXVK22. Después del método de adsorción-desorción se recuperó el 61.5 y 77.4% de la actividad total (EB de *Enterococcus faecium* MXVK29 y EB de *Enterococcus faecalis* MXVK22, respectivamente). Estos rendimientos son mayores a los reportados por Yang y col. (1992) quienes reportaron rendimientos de tan sólo 2.0, 0.7, 0.6, y 2.3% utilizando el mismo método para la purificación de diferentes bacteriocinas (pediocina, nisina, sakacina y leucocina, respectivamente).

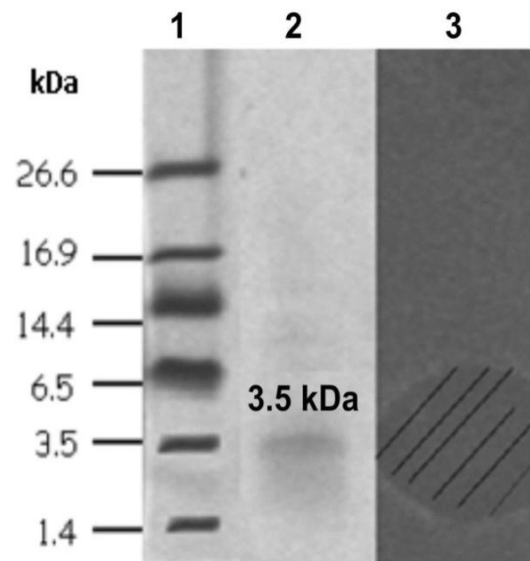
El rendimiento obtenido con el protocolo de purificación utilizado fue del 32.7% (EB de *Enterococcus faecium* MXVK29) y 32.1% (EB de *Enterococcus faecalis* MXVK22); estos rendimientos son similares a los reportados por otros autores (Aymerich y col., 1996; Cintas y col., 1998; Herranz y col., 1999; Ohmomo y col., 2000) quienes utilizaron protocolos más costosos que incluyen precipitación con sulfato de amonio y diferentes tipos de cromatografía.

Finalmente, la actividad específica obtenida del extracto purificado de ambas bacteriocinas, fue mayor para el EB de *Enterococcus faecium* MXVK29 ( $1.7 \times 10^9$  UA/g de proteína) y el EB de *Enterococcus faecalis* MXVK22 ( $4.3 \times 10^9$  UA/g de proteína) que para otras bacteriocinas reportadas en la bibliografía producidas por *Enterococcus* sp. (Herranz y col., 1999; Ohmomo y col., 2000; Moreno y col., 2002; Foulquie y col., 2003; Mareková y col., 2003).

## 7.6 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA BACTERIOCINA

### 7.6.1 Identificación del extremo amino terminal

Para realizar la identificación del extremo amino terminal se realizó una electroforesis no desnaturizante para péptidos del extracto de bacteriocina purificado obtenido de *Enterococcus faecium* MXVK29. El EB purificado mostró tener una banda con actividad antimicrobiana contra *L. innocua* ATCC33090 con un peso molecular aparente estimado de 3.5 kDa (figura 21). El peso molecular aparente obtenido concuerda con lo reportado en la bibliografía para otras enterocinas (Floriano y col., 1998; Du Toit y col., 2000; Yamamoto y col., 2003; Foulquié y col., 2003; Martín-Platero y col., 2006; Franz y col., 2007; Line y col., 2008; Izquierdo y col., 2008; Dimov y col., 2010).



**Figura 21.** Electroforesis desnaturalizante utilizando el sistema Tris-tricina de la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* MXVK29. Carriles 1: estándares de peso molecular para péptidos (Bio-Rad, trifosfato isomerasa 26.6 kDa; mioglobina 16.9 kDa;  $\alpha$ - lactoalbumina 14.4 kDa; aprotinina 6.5 kDa; cadena de insulina  $\beta$ -oxidada 3.5 kDa; bacitracina 1.4 kDa). Carril 2: extracto de bacteriocina purificado. Carriles 3: gel de actividad utilizando a *L. innocua* ATCC33090 como cepa sensible (///// Indica halo de inhibición).

Para la secuenciación del extremo amino terminal, se transfirió el gel de electroforesis a una membrana de PVDF, de la cual se recortaron los trozos de membrana con las bandas de interés. La secuenciación se realizó en un secuenciador automático de proteínas aplicando directamente los trozos de membrana. La secuencia del extremo amino terminal resultante de la degradación de Edman (16 ciclos) de la molécula de bacteriocina se presenta a continuación:

Y Y G N G V T C G S H H C S V D  
 Tyr-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Thr-Cys-Gly-Ser-His-His-Cys-Ser-Val-Asp

El extremo amino terminal del péptido producido por *Enterococcus faecium* MXVK29 está conformado por un 50% de aminoácidos polares (hidrofílicos; YNTCS), 31.3% de aminoácidos hidrofóbicos (GV) y 18.8% de aminoácidos cargados (DHH), de los cuales el 12.5% son básicos (cargados positivamente; HH) y el 6.3% son ácidos (cargados negativamente; D). De acuerdo a la secuencia de aminoácidos obtenida se puede afirmar que el extremo amino de la bacteriocina es una región anfifílica, algo similar a lo reportado por otros autores (Nes y Holo, 2000; Line y col., 2008). Lehninger y col. (2001) mencionan que el extremo amino terminal está conformado en su mayoría por aminoácidos hidrofílicos, que ayudan a la interacción inicial que tienen las bacteriocinas con las cabezas de los fosfolípidos aniónicos de la membrana durante su inserción en las células blanco, lo que a posteriori conduce a la despolarización y muerte; éste es un mecanismo de acción característico de las bacteriocinas de la clase II (Cotter y col., 2005).

La secuencia obtenida del extremo amino se introdujo a la base de datos NCBI para realizar una comparación de secuencias cortas de alta coincidencia y determinar si existía alguna similitud con secuencias de bacteriocinas reportadas anteriormente. Las secuencias que presentaron un mayor porcentaje de similitud con la bacteriocina 29 producida por *Enterococcus faecium* MXVK29 se presentan en la tabla 13. Como se observa en la tabla, ninguno de los alineamientos dio como resultado una similitud mayor al 88% y el valor E (la probabilidad de que el buscador de como mejor resultado otra cepa diferente) es alto, lo que indica que los alineamientos no son significativos o que no son de gran confianza. Posiblemente esto se debió a que la secuencia de aminoácidos analizada es muy corta (16 aminoácidos), lo cual disminuye la confiabilidad del alineamiento (Bownas, 2003).

**Tabla 13.** Bacteriocinas alineadas por similitud de aminoácidos con la bacteriocina 29 producida por *Enterococcus faecium* MXVK29

| Secuencias que producen alineamientos significativos:                 | Secuencia          | % Similitud | Score (Bits) | Valor E | N° de acceso |
|---|--------------------|-------------|--------------|---------|--------------|
| Bacteriocina 29 (en estudio)  | YYGNGVTCGSHHCSVD   | -----       | ----         | ----    | -----        |
| Pediocina PA-1 (bacteriocina de <i>Pediococcus acidilactici</i> )     | YYGNGVTCGKHS CSVD  | 88          | 45.6         | 8e-04   | AAB23877     |
| Enterocina HF (bacteriocina de <i>Enterococcus faecium</i> )          | YYGNGVSCNKKGCSVD   | 64          | 32.9         | 5.3     | P86183       |
| Enterocina CRL35 (bacteriocina de <i>Enterococcus mundtii</i> )       | YYGNGVSCNKKGCSVD   | 64          | 32.9         | 5.3     | AAQ95741     |
| Enterocina SE-K4 (bacteriocina de <i>Enterococcus faecium</i> TX1330) | YYGNGVYCN TQK CWVD | 63          | 29.9         | 42      | ZP_03980284  |
| Enterocina A (bacteriocina de <i>Enterococcus faecium</i> C68)        | YYGNGVYCTKNKCTVD   | 63          | 28.6         | 101     | ZP_05832849  |

Los aminoácidos marcados con sombra gris corresponden a los puntos de coincidencia entre las diferentes bacteriocinas.

Fuente: [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) diciembre de 2010.

Con los resultados obtenidos no se puede asegurar la bacteriocina con la cual tiene similitud el compuesto antimicrobiano en estudio, pero tampoco se puede afirmar que se trata de una bacteriocina no estudiada, ya que para realizar esta aseveración se necesitaría conocer la secuencia completa del péptido. Hasta este punto, sólo se puede concluir que el péptido producido por la cepa de *E. faecium* MXVK29 pertenece a la clase IIa de la clasificación de Klaenhammer (bacteriocinas tipo pediocinas). En la tabla 14 se enlistan las bacteriocinas con similitud con la bacteriocina 29 y se muestra que todas estas contienen una secuencia consenso hidrofílica y catiónica YGNGV(X)C(X)4C (X significa cualquier aminoácido) y dos residuos de cisteína en las posiciones 9 y 14, las cuales son características de los péptidos miembros de esta clase (Drider y col., 2006; Franz y col., 2007).

**Tabla 14.** Comparación de la secuencia del extremo amino terminal de bacteriocinas de la clase IIa con la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* MXVK29.

| Bacteriocina          | Secuencia de aminoácidos |
|-----------------------|--------------------------|
| bacteriocina 29       | XYYGNGVTCGSHHC SVD       |
| Enterocina A 4829     | TYYGNGVYCTKNKCTVD        |
| Enterocina CRL35 4289 | KYYGNGVSCNKKGC SVD       |
| Enterocina SE-K4 5356 | TYYGNGVYCNKQKC WVD       |
| Enterocina HP         | -YYGNGVSCNKKGC SVD       |
| Pediocina PA-1        | KYYGNGVTCGKHSC SVD       |

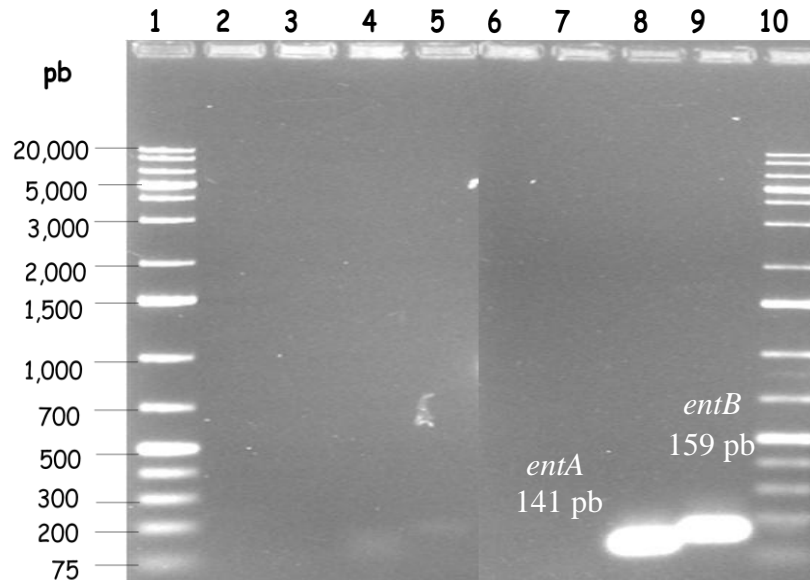
Secuencia consenso indicada con sombra gris.

El contenido de cisteínas parece estar relacionado con la eficacia antimicrobiana de las bacteriocinas (Jack y col., 1995; Tominaga y Hatakeyama, 2006); aquellas que contienen dos o más cisteínas son capaces de formar puentes disulfuro y tienen un espectro inhibitorio más amplio, mientras que las que no tienen cisteínas poseen un espectro inhibitorio reducido (Eijsink y col., 1998). Como ya se ha indicado, la secuencia aminoacídica del extremo amino terminal, el tamaño del péptido y otras características antes estudiadas (termoestabilidad y espectro inhibitorio) indican que la bacteriocina producida por *E. faecium* MXVK29 pertenece a la clase IIa, las cuales son péptidos antimicrobianos con amplias posibilidades para ser aplicados en alimentos. Para poder confirmar esto debe secuenciarse el gen estructural completo.

### 7.6.2 Identificación del gen estructural

Una vez identificada la clase a la que pertenecía la bacteriocina producida por *E. faecium* MXVK29, se realizó una PCR con ocho pares de oligonucleótidos que amplifican bacteriocinas de la clase II producidas por *Enterococcus* sp. (enterocina L50A/B, enterocina P, enterocina Q, bacteriocina 31, enterocina AS-48, enterocina 1071AB, enterocina A y enterocina B). En la figura 22 se observa que sólo dos de los pares de cebadores utilizados amplificaron (*entA* y *entB*), con tamaño de fragmentos de 141 y 159 pb, respectivamente. Estos tamaños de fragmentos corresponderían a proteínas de 47 y 53 aminoácidos, respectivamente.



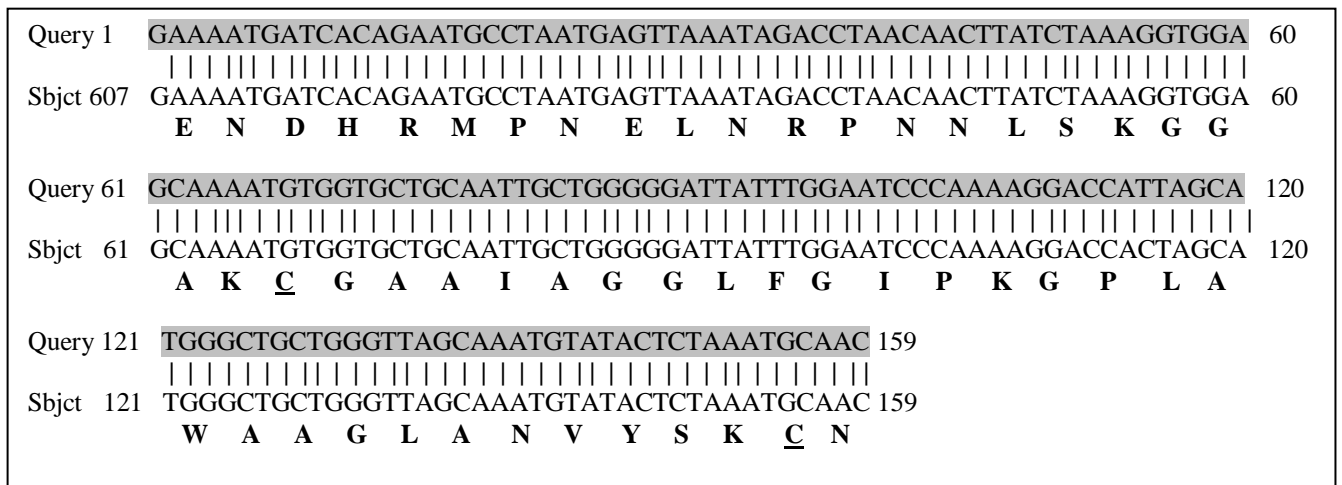


**Figura 22.** Electroforesis de agarosa de la amplificación de diferentes bacteriocinas por PCR utilizando el genoma de *E. faecium* MXVK29. Carril 1 y 10: marcador molecular de bajo rango (GeneRuler, lowrange, Fermentas). Carril 2: *ent L50A/B*. Carril 3: *entP*. Carril 4: *entQ*. Carril 5: *bac31*. Carril 6: *entAS-48*. Carril 7: *ent1071AB*. Carril 8: *entA*. Carril 9: *entB*.

Una vez obtenidos los fragmentos amplificados, estos fueron purificados y secuenciados para corroborar que se tratara de ADN para los péptidos antes mencionados. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos del NCBI, utilizando la opción Blastx (búsqueda en la base de datos de proteínas utilizando una secuencia de nucleótidos traducida). La secuencia de nucleótidos demostró tener una similitud del 100% con el péptido maduro de la enterocina A (figura 23; KYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTCIAGMSIGG FLGGAIPGKC) y de la enterocina B (figura 24; ENDHRMPNELNRPNNLSKGGAKCGA). Estas secuencias de proteínas corresponden a las reportadas previamente por otros autores para las enterocinas A y B (Aymerich y col., 1996; Casaus y col., 1997; Du Toit y col., 2000; Shin y col., 2008).



**Figura 23.** Comparación de la secuencia de nucleótidos de la enterocina producida por *Enterococcus faecium* MXVK29 (sombreada) con el gen estructural de la enterocina A; se incluye la predicción de la secuencia de amino ácidos (letras mayúsculas en negritas).



**Figura 24.** Comparación de la secuencia de nucleótidos de la enterocina producida por *Enterococcus faecium* MXVK29 (sombreada) con el gen estructural de la enterocina B; se incluye la predicción de la secuencia de amino ácidos (letras mayúsculas en negritas).

La enterocina A es una bacteriocina ampliamente descrita en cepas de *E. faecium* aisladas de embutidos fermentados (Aymerich y col., 1996; Du Toit y col., 2000; Ennahar y Deschamps, 2000; Herranz y col., 2001; Losteinkit y col., 2001). Esta bacteriocina se transcribe como un prepéptido que presenta un sitio de procesamiento Gly-Gly-X; este sitio no se observa en la secuencia obtenida en este trabajo, debido a que con los oligonucleótidos utilizados sólo se obtuvo la proteína madura, que contiene 42 aminoácidos con cuatro residuos de cisteína involucrados en la formación de puentes disulfuro intramoleculares

(Aymerich y col., 1996). Además, la secuencia del extremo N-terminal presenta una secuencia consenso que la clasifica dentro de la clase IIa. Muchas de las especies productoras de la enterocina A producen una segunda bacteriocina, denominada enterocina B.

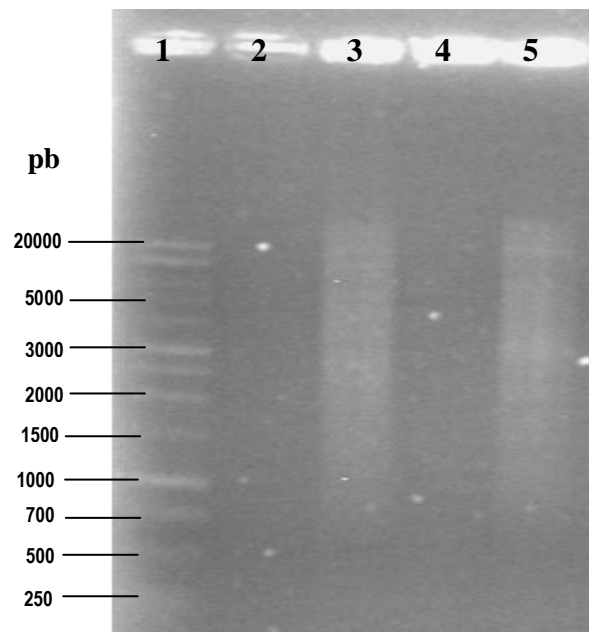
Por otra parte, la enterocina B también se sintetiza como un prepéptido con un sitio de procesamiento de doble glicina. El péptido maduro obtenido fue de 53 aminoácidos al igual que otras bacteriocinas obtenidas de cepas de *Enterococcus* (Casaus y col., 1997; Herranz y col., 2001). Además se observa que sólo presenta dos residuos de cisteínas, que pueden formar un puente disulfuro en la péptido maduro (Worobo y col., 1994; Franz y col., 1999) y no presenta en el extremo amino terminal la secuencia consenso típica de las bacteriocinas de la clase IIa. Por las características propias de este péptido ha sido difícil clasificarlo, por lo cual la mejor clasificación que lo describe es la dada por Franz y col. (2007) como una enterocina lineal que no pertenece a la familia de las pediocinas (IIc).

Casaus y col. (1997) demostraron que la enterocina A actúa de forma sinérgica con la enterocina B en algunos casos, pero no necesariamente se deben producir ambas bacteriocinas aunque la cepa contenga el gen que codifique para estos péptidos. En este estudio en particular, y de acuerdo con los resultados obtenidos en la sección 7.6.1, parece que, a pesar de contar con la presencia de ambos genes biosintéticos (*entA* y *entB*), sólo se produce la enterocina A: al realizar la separación de péptidos sólo se detectó la presencia de un péptido activo con un peso molecular entre 3.5 y 5 kDa, además el extremo amino secuenciado indica que se trata de una bacteriocina de la clase IIa. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que el método de separación utilizado no es tan sensible como para identificar la presencia de los dos péptidos, ya que en los reportes de cepas de *Enterococcus faecium* que presentan ambos péptidos se utiliza la espectrofotometría de masas para identificar el peso molecular de los péptidos (Casaus y col., 1997; Herranz y col., 2001; Ennahar y col., 2001).

### 7.6.3 Genes involucrados en la biosíntesis de la bacteriocina

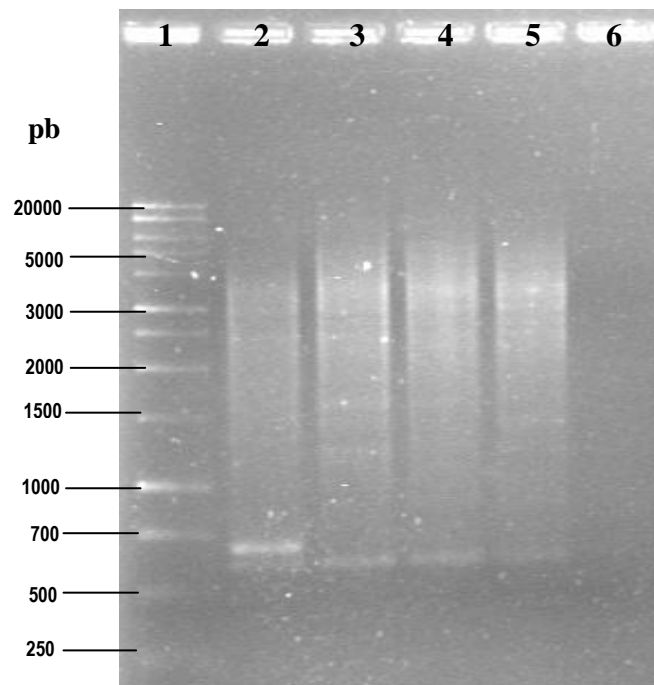
Una vez determinado el gen estructural de las bacteriocinas, se decidió identificar los genes accesorios que ayudan en la biosíntesis y transporte de la bacteriocina madura (gen de inmunidad, genes de procesado y secreción, y genes que intervienen en la autorregulación de su síntesis), además de identificar cuáles de estos genes comparten el operón con el gen estructural, ya que se ha demostrado que los genes de las bacteriocinas de la clase II suelen encontrarse agrupados en 1, 2 o hasta 3 operones (Ennahar y col., 2000; Drider y col., 2006).

Para poder obtener los genes del operón principal (aquel que contiene el gen estructural) se realizó una PCR inversa, utilizándose el kit Genome Walker. En primer lugar se extrajo el ADN total de *Enterococcus faecium* MXVK29; una vez verificado el tamaño e integridad del ADN se realizó una digestión con la enzima de restricción *EcoRV*, obteniéndose un barrido con fragmentos de 500 a 20,000 pb (figura 25).



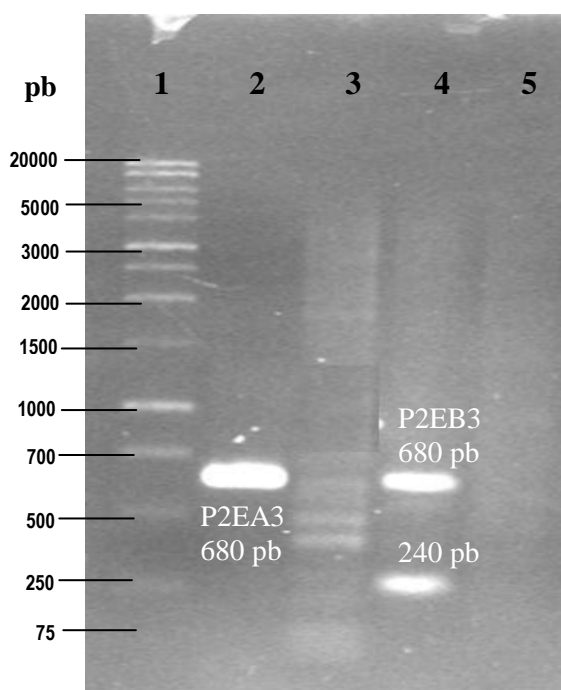
**Figura 25.** Electroforesis de agarosa de la digestión y purificación de ADN extraído de *Enterococcus faecium* MXVK29. Carril 1: marcador molecular de bajo rango (Gene-Ruler, low range, Fermentas). Carril 3: ADN digerido con la enzima de restricción *EcoRV*. Carril 5: ADN digerido y purificado.

A continuación se realizó la ligación con un fragmento de 48 pb de ADN (adaptadores), el cual nos ayuda a realizar una PCR utilizando los cebadores para los adaptadores que contiene el kit y los previamente diseñados (sección 6.10.3.2), en las condiciones marcadas en la metodología. En primer lugar se realizó una PCR con los cebadores AP1, P1EA3, P1EA5, P1EB3 y P1EB5, utilizando una temperatura de hibridación de 60°C. En este primer PCR, y de acuerdo al manual del kit, no se esperaba observar una sola banda definida, sino una serie de bandas en todos los carriles (excepto en el control negativo, sin ADN) o un barrido con algunas bandas marcadas que van de 500 a 5000 pb. Como se observa en la figura 26 los cuatro diferentes cebadores utilizados en la PCR 1 dan por resultado un barrido con algunas bandas que resaltan al barrido, siendo las más definidas las que se encuentran aproximadamente en torno a un tamaño de 500 pb. El segundo PCR es anidado y ocupó como molde los productos de la PCR 1 para encontrar bandas más específicas.



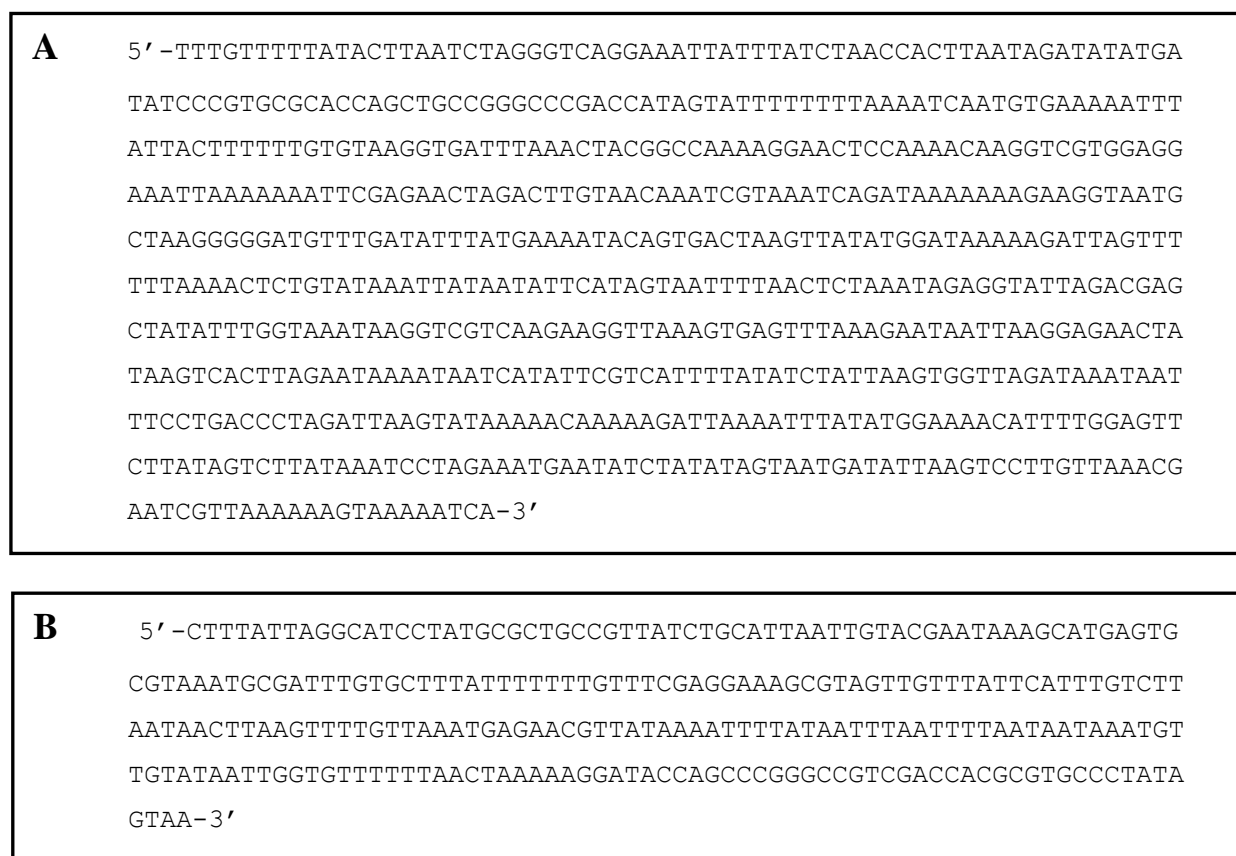
**Figura 26.** Electroforesis de agarosa de los genes involucrados en la biosíntesis de la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* MXVK29 (PCR 1). Carril 1: marcador molecular de bajo rango (GeneRuler, low range, Fermentas). Carril 2: amplificación con cebadores P1EA3 y AP1. Carril 3: amplificación con cebadores P1EA5 y AP1. Carril 4: amplificación con P1EB3 y AP1. Carril 5: amplificación con cebadores P1EB5 y AP1. Carril 6: control negativo.

Para realizar la PCR 2 se utilizaron los cebadores AP2, P2EA3, P2EA5, P2EB3 y P2EB5, utilizando una temperatura de hibridación de 68°C. Para este segundo PCR, el manual indica que en la mayoría de los casos se espera una banda definida para cada librería con un tamaño de 200 a 6000 pb. Como se observa en la figura 27, sólo se obtuvieron bandas definidas con los cebadores P2EA3 (680 pb) y P2EB3 (680 pb y 240 pb). Para el caso del cebador P2EB3 se observa que se amplificaron dos bandas: aunque el manual del kit comercial indica que la presencia de bandas múltiples indica poca especificidad, se decidió purificar ambos fragmentos al igual que el fragmento del carril 2. Para los oligonucleótidos P2EA5 y P2EB5 no se obtuvo ninguna amplificación, lo que pudo deberse a que el sitio de corte de la enzima de restricción usada estuviera muy cercano a la secuencia donde comienza el gen estructural, por lo cual sólo se amplificaría hacia el extremo contrario. Una vez obtenidos los fragmentos amplificados, estos fueron purificados y secuenciados.



**Figura 27.** Electroforesis de agarosa de los genes involucrados en la biosíntesis de la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* MXVK29 (PCR 2). Carril 1: marcador molecular de bajo rango (GeneRuler, low range, Fermentas). Carril 2: amplificación con cebadores P2EA3 y AP2. Carril 3: amplificación con cebadores P2EA5 y AP2. Carril 4: amplificación con P2EB3 y AP2. Carril 5: amplificación con cebadores P2EB5 y AP2.

La secuencia obtenida fue comparada con la base de datos del NCBI, utilizando la opción Nucleotide Blast (búsqueda en la base de datos de similitudes de nucleótidos mediante un algoritmo, utilizando una secuencia de nucleótidos). La secuencia obtenida del fragmento de 680 pb (figura 28A) con los cebadores P2EB3 y AP2 (enterocina B) significativa de acuerdo al Blast realizado en la base de datos del NCBI; y la secuencia obtenida del fragmento de 240 pb (figura 28B) fue alineada con genes que codifican para proteínas que no tienen relación con las proteínas accesorias de las bacteriocinas (dato no mostrado). Esto se puede deber a que algunos autores indican que el gen de inmunidad de la bacteriocina B (*entI*), a diferencia de otras bacteriocinas de la clase II, no se encuentra inmediatamente después del gen estructural o a que (aunque este no es el caso) alternativamente se encuentra en la cadena complementaria de ADN al término del gen estructural (Franz y col., 1999 y 2007).



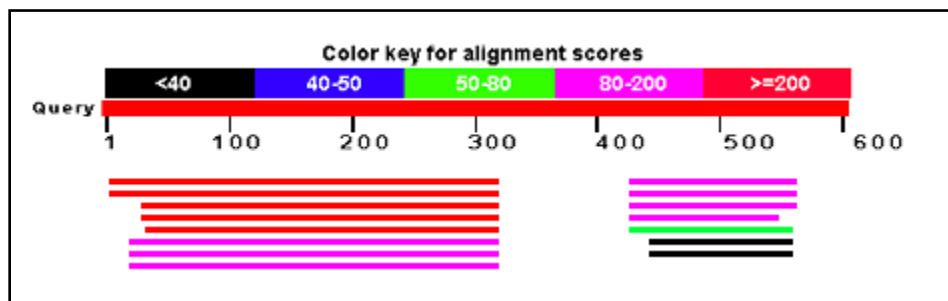
**Figura 28.** Secuencias obtenidas con los cebadores P2EB3 y AP2 utilizando el kit Genome Walker. Secuencias correspondientes a los fragmento de 680 (A) y 240 pb (B).

Por otra parte, la secuencia obtenida con los cebadores P2EA3 y AP2 resultó en una secuencia de 643 nucleótidos (figura 29), los cuales fueron separados por el programa BLAST en dos secuencias con alineamientos significativos para dos proteínas (figura 30), la primera secuencia va del nucleótido 3 al 338 y la segunda del nucleótido 445 al 588 cubriendo el 52 y 22% de la secuencia completa respectivamente. También se observa una región intergénica entre las dos proteínas obtenidas.

```

5' -TGGTGGAGCAATTCCAGGGAAGTGCTAAAATGAAAAAAAAATGCTAAGCAAATTTGTTTCATGAATTATAT
AATGATATATCTATAAGTAAAGATCCTAAATATTTCTGATATTTCTTGAGGTTTTACAAAAGGTATATTTAAA
ATTAGAAAAACAAAAATATGAATTAGATCCAGTCCTTTAATAAATAGATTGGTGAATTATCTATATTTTA
CTGCTTATACTAATAAAAAAAGATTCAGTGAATATCAAGAGGAATTAATAAGAAATTTGAGTGAAATTGGA
AGAAGTCTGGAATAAATGGTTTATATCGAGCAGATTATGGAGATAAATCTCAATTTTAATGATACTTATA
ATATTTAAATATGTCTCAAAAATTTTTTGATTAGAAAAATAGGTATATTGAATCAGTGACATAAAAAGTATTTA
TAGTTTGTAGGGGGAATCGTAATGGAAGAAAAAATAGACTAAATGCTAAACAATGTTTCAGATCAAGAGCT
TAAAAAAATTAAGGAGGTGCTGGAACAAAACCTCAAGGAAAACCGGCATCAAATTTAGTGGAATGTGTTT
TTTCATTATTTAAAAAGTGTAAGTAAAAATTTTTTTTATGATACCAGCCGGGCCGTCGACCACGCGTGCC
TATAGTA-3'
    
```

**Figura 29.** Secuencia obtenida con los cebadores P2EA3 y AP2 utilizando el kit Genome Walker.



**Figura 30.** Alineamientos obtenidos con la base de datos del NCBI del fragmento amplificado con el kit Genome Walker.

Fuente: [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) diciembre de 2010.

En la tabla 15 aparecen las proteínas con los alineamientos más significativos, para las dos secuencias detectadas por la base de datos: como se observa, la proteína de inmunidad de la enterocina A presenta el 99% de similitud con la primera secuencia que consta de 336 nucleótidos, y hay un 100% de similitud de la segunda secuencia con una proteína hipotética conservada que parece actuar como proteína señalizadora. La proteína de inmunidad confiere



inmunidad a la cepa productora contra la bacteriocina que produce, además de encontrarse en todas las bacterias productoras de bacteriocinas de la clase IIa estudiadas (Enanhar y col., 2000). Por otra parte, la proteína hipotética es descrita como una proteína secretada por la cepa productora que sirve como una señal extracelular y que causa la transcripción de los genes necesarios para la producción de la bacteriocina (Nilsen y col., 1998).

**Tabla 15.** Proteínas alineadas por similitud de aminoácidos con el fragmento amplificado con el kit Genome Walker.

| Secuencias que producen alineamientos significativos:                             | % Similitud | Score (Bits) | Valor E | Secuencia cubierta (%) | N° de acceso |
|---|-------------|--------------|---------|------------------------|--------------|
| Proteína de inmunidad de la enterocina A ( <i>Enterococcus faecium</i> E1039)     | 99          | 224          | 8e-57   | 52                     | ZP_06674599  |
| Proteína de inmunidad <i>entI</i> ( <i>Enterococcus faecium</i> U0317)            | 98          | 222          | 2e-56   | 52                     | ZP_06702010  |
| Proteína de inmunidad ( <i>Enterococcus faecium</i> DO)                           | 100         | 208          | 4e-52   | 48                     | ZP_00603732  |
| Proteína de inmunidad de la enterocina A ( <i>Enterococcus faecium</i> 1,231,502) | 99          | 206          | 1e-51   | 48                     | ZP_05661868  |
| Proteína de inmunidad de la enterocina A  | 98          | 202          | 2e-50   | 47                     | 2BL7_A       |
| Proteína hipotética conservada ( <i>Enterococcus faecium</i> 1, 231, 502)         | 100         | 102          | 3e-20   | 22                     | ZP_05661869  |
| Proteína hipotética conservada ( <i>Enterococcus faecium</i> 1, 231, 501)         | 97          | 100          | 1e-19   | 22                     | ZP_05665064  |
| Secuencia señal tipo-bacteriocina ( <i>Enterococcus faecium</i> TX0133a04)        | 91          | 92           | 5e-17   | 22                     | ZP_07847602  |
| Proteína hipotética conservada ( <i>Enterococcus faecium</i> 1, 230, 933)         | 100         | 90.5         | 1e-16   | 20                     | ZP_05660018  |

Las filas sombreadas de gris corresponden a las dos proteínas diferentes con mayor similitud y menor estimación (valor E) para las que codifican los nucleótidos de la secuencia obtenida con el kit Genome Walker.

Fuente: [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) diciembre de 2010.

Una vez identificada la secuencia como parte de los genes accesorios necesarios para la producción de la enterocina A, se procedió a fusionar las secuencias para el gen estructural, el gen de inmunidad y el gen de la proteína de inducción, utilizando el software DNASTAR-Lasergene; con la finalidad de comprobar si se tenía un único fragmento de ADN con estos genes. Drider y col. (2006) han reportado que los genes involucrados en la biosíntesis de las bacteriocinas de la clase IIa no están localizados necesariamente en un solo operón o en el mismo fragmento de ADN. Miller y col. (2005), encontraron que el gen estructural y el gen de inmunidad se encontraban en un operón, a diferencia de los genes de secreción encontrados en plásmidos individuales en cepas de *Pediococcus parvulus* y *Lactobacillus plantarum* WHE92.

La secuencia consenso obtenida (715 pb) se comparó en la base de datos del NCBI, utilizando la opción Nucleotide Blast, obteniéndose un 100% de similitud con el operón parcial de la enterocina A (*entAIFK* genes) producida por *Enterococcus faecium* MTCC5153 (tabla 16), utilizándose en la comparación el 94% de la secuencia consenso.

**Tabla 16.** Alineamientos con mayor similitud a nivel operón de bacteriocinas encontradas en la base de datos del NCBI.

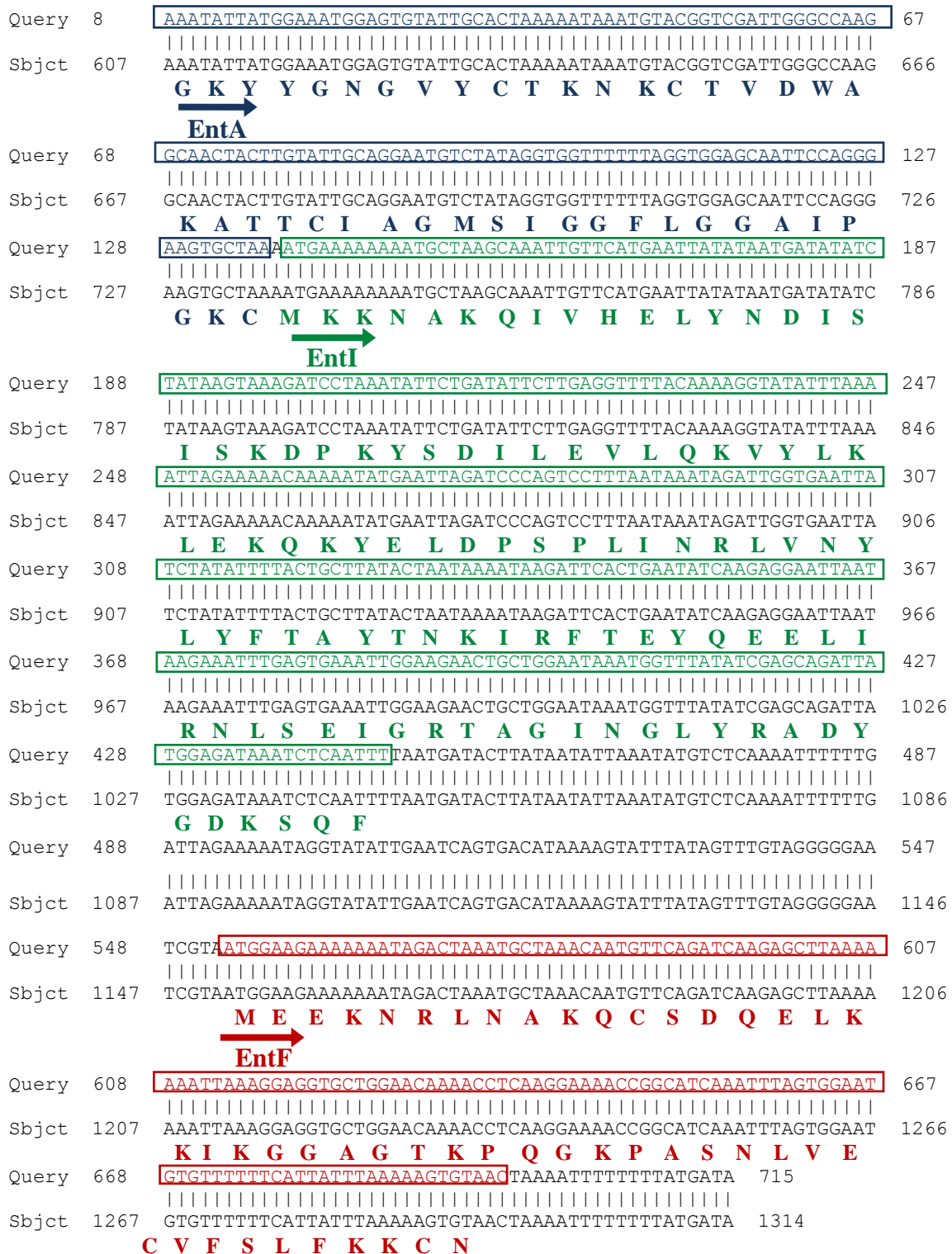
| Secuencias que producen alineamientos significativos:   | % Similitud | Score (Bits) | Valor E | Secuencia cubierta (%) | N° de acceso |
|---|-------------|--------------|---------|------------------------|--------------|
| Operón parcial de la enterocina A ( <i>entAIFK</i> genes), <i>Enterococcus faecium</i> MTCC 5153  | 100         | 1308         | 0.0     | 94                     | AM746970     |
| Genes completos del operón de la enterocina A ( <i>entA</i> , <i>entI</i> , <i>entF</i> , <i>entK</i> , <i>entR</i> , <i>orfA1</i> , <i>orfA2</i> , <i>orfA3</i> , <i>entT</i> , <i>entD</i> , <i>orfA4</i> , <i>orfA5</i> ), <i>Enterococcus faecium</i> | 99          | 1303         | 0.0     | 94                     | AB292463     |
| Genes del operón de la enterocina A ( <i>entA</i> ), EntI ( <i>entI</i> ), EntF ( <i>entF</i> ), EntK ( <i>entK</i> ), EntR ( <i>entR</i> ), EntT ( <i>entT</i> ), EntD ( <i>entD</i> ), <i>Enterococcus faecium</i>                                      | 99          | 1303         | 0.0     | 94                     | AF099088     |
| Secuencia parcial del operón de la enterocina producida por <i>Enterococcus faecium</i> LR/6  | 100         | 1297         | 0.0     | 94                     | GQ182975     |

Fuente: [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) diciembre de 2010.

La Figura 31 muestra la secuencia obtenida para la enterocina A producida por *Enterococcus faecium* MXVK29 (708 pb) alineada con una secuencia parcial del operón de la enterocina A reportada en la base de datos del NCBI con número de acceso AM746970. Como se observa en la comparación de secuencias, los genes estructural, de inmunidad y de inducción de la enterocina A (*entAIF*) son idénticos a los de la enterocina producida por *E. faecium* MXVK29.

En general, la enterocina A se transcribe como una pre-bacteriocina (61 aminoácidos) con un sitio de procesamiento de doble glicina presente en el péptido líder (18 aminoácidos, una extensión N-terminal unida a la bacteriocina madura) (Jack y col., 1995; Nes y col., 1996). Como se observa, la enterocina en estudio presentó el gen estructural (*entA*) a partir de la base 8 hasta la base 136, las cuales codifican para un péptido maduro de 43 aminoácidos; la secuencia obtenida no contiene el péptido líder que contribuye a la secreción de la bacteriocina mediante transportadores ABC (Håvarstein y col., 1995; Ennahar y col., 2000).

El gen que codifica para la proteína de inmunidad de la bacteriocina en estudio (*entI*) se encuentra a partir de la base 138 hasta la base 446, y codifica para una proteína de 103 aminoácidos (en su mayoría hidrofóbicos) que le sirven para anclarse a la membrana (Aymerich y col., 1996). Eijsink y col. (1998) y Ennahar y col. (2000) indican que las proteínas de inmunidad de cepas productoras de bacteriocinas de la clase IIa están formadas de 88 a 114 aminoácidos y algunos estudios indican que la proteína de inmunidad de la enterocina A tiene 46% de identidad con la leucocina AUL183 y 56% con la pediocina PA-1, lo cual indica que esta proteína no interactúa directamente con su bacteriocina, pero interactúa indirectamente con algunos receptores; cuya existencia ha sido sugerida para la proteína de inmunidad de la lactococina (Aymerich y col., 1996; Ennahar y col., 2000; Drider y col., 2006).



**Figura 31.** Comparación de la secuencia del operón de la enterocina A (*entAIFK* genes) con la secuencia obtenida de la bacteriocina producida por *E. faecium* MXVK29 (secuencia superior; query). Gen estructural de la enterocina A (Ent A ■); Gen de inmunidad (EntI ■); Gen de inducción (EntF ■). Se incluye la predicción de la secuencia de aminoácidos (letras mayúsculas en color).

Finalmente, el gen que codifica para la proteína que funciona como factor de inducción de la bacteriocina en estudio (*entF*) se encuentra a partir de la base 553 hasta la base 696, y codifica para una proteína de 48 aminoácidos. También se observa una región intergénica conformada de 105 nucleótidos, lo cual puede ser la división entre el operón de síntesis y el operón de regulación. Algunos autores (Nilsen y col., 1998; Enanhar y col., 2000; Nes y col., 2002) han descrito que el factor de inducción se localiza en un operón diferente adyacente al operón del gen estructural, llamado de regulación. Este operón contiene un promotor independiente y tres componentes de regulación que son: un factor de inducción (*entF*), la proteína sensora histidín-quinasa (*entK*) y la proteína reguladora de respuesta (*entR*). Ya no se logró secuenciar el resto del operón de regulación debido a que la enzima de restricción utilizada para obtener las librerías muy posiblemente cortó el ADN entre el gen *entF* y *entK*. Cuando se introdujo la secuencia completa tomada de la base de datos del NCBI que codifica para todos los genes necesarios para la síntesis, regulación y transporte de la enterocina A (N° acceso AB292463) y se sometió a una simulación de digestión con la enzima de restricción *EcoRV* (software DNASTAR-Lasergene-Seqbuilder); se corroboró que efectivamente esta enzima tiene un sitio de corte en la región intergénica entre estos dos genes (Anexo A).

## 8. SÍNTESIS DE RESULTADOS

- El perfil de producción observado para ambas bacteriocinas puede ser considerado el de un metabolito primario, que durante la fase de latencia es adsorbido a la célula y es desadsorbido paulatinamente a medida que el pH disminuye.
- La bacteriocina producida por *E. faecalis* MXVK22 presentó una actividad antimicrobiana de 2133.33 UA/mL en el extracto diluido ó 4266.66 UA/g en el extracto liofilizado. La enterocina producida por *E. faecium* MXVK29 presentó una actividad de 4266.66 UA/mL en el extracto diluido y 8533.32 UA/g en el extracto crudo liofilizado.
- Todas las concentraciones de bacteriocina estudiadas (2133, 1066, 533, 267 y 134 UA/mL) demostraron un efecto bacteriostático sobre las cepas de *Listeria sp.* (a excepción de *Listeria monocytogenes* LMB 911204/47, la cual no presentó efecto inhibitorio en ninguna de las concentraciones probadas). La actividad antimicrobiana frente a cepas del genero *Listeria* presentada por estas bacteriocinas se puede deber principalmente a la alta cantidad de cisteínas cercanas al extremo amino, lo que representa una mayor posibilidad de creación de puentes disulfuro, los cuales facilitan el mecanismo de acción de estas bacteriocinas.
- Los resultados obtenidos indican que para eliminar el 100% de microorganismos es necesario adicionar al medio 2535, 6040, 3969, y 11021 UA/mL de la bacteriocina producida por *E. faecium* MXVK29 y 4263, 2425, 1209 y 3810 UA/mL de la bacteriocina producida por *E. faecalis* MXVK22, para las diferentes cepas sensibles (*Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* LM82, LMB 911204/47 y Scott A, respectivamente).

- Todas las cepas resistentes obtenidas de *Listeria* muestran cambios en los perfiles genómicos con respecto a sus cepas sensibles, lo que indica que las bacteriocinas produjeron una resistencia con reflejo a nivel genómico. Debido a la generación de cepas resistentes en presencia de bacteriocinas, éstas deben ser consideradas como parte de una tecnología de barreras.
- De todos los factores de virulencia analizados, solo el gen *ccf* que codifica para una feromona sexual fue amplificado por PCR para todas las cepas testigo (*Enterococcus faecalis* MXVK22 y *Enterococcus faecium* MXVK29) y los controles (*E. faecium* SF68 y *E. faecalis* NCIMB-700585). La presencia de esta feromona es común en cepas de enterococos aisladas de diferentes fuentes (cultivos iniciadores, alimentos y clínicos) y no se considera un factor de virulencia mientras no se presente el gen *agg* (proteína de agregación).
- *Enterococcus faecium* MXVK29 fue sensible a todos los antibióticos probados, a diferencia de *Enterococcus faecalis* MXVK22, que presentó resistencia a vancomicina y tetraciclina utilizando dos métodos de detección (método de difusión en agar y PCR).
- *Enterococcus faecalis* MXVK22 no presentó formación de aminas biogénicas con el método utilizado, en contraste con *Enterococcus faecium* MXVK29 que tuvo actividad positiva descarboxilasa para la formación de tiramina. Es poco probable, sin embargo, que este compuesto se forme en altas concentraciones en el producto fermentado donde se aplique el microorganismo de interés.
- El rendimiento obtenido con el protocolo de purificación basado en un método de adsorción-desorción fue de 32.7% para el extracto de bacteriocina de *Enterococcus faecium* MXVK29 y 32.1% para el extracto de bacteriocina de *Enterococcus faecalis* MXVK22. Estos rendimientos son similares a los obtenidos con otros protocolos más costosos; sin embargo es necesario realizar mayores estudios que minimicen los costos de purificación y recuperación de grandes cantidades de bacteriocina.

- La secuencia del extremo amino terminal de la molécula de bacteriocina presentó una secuencia consenso hidrofílica y catiónica YGNGV(X)C(X)4C con dos residuos de cisteína en las posiciones 9 y 14. Puede afirmarse que pertenece a la clase IIa de la clasificación de Klaenhammer (bacteriocinas tipo pediocinas).
- La PCR realizada con oligonucleótidos de bacteriocinas de la clase II, resultó en la amplificación de dos fragmentos con un tamaño de 141 y 159 pb (con cebadores para los genes *entA* y *entB*, respectivamente). Al ser secuenciados y comparados en una base de datos se obtuvo una similitud del 100% con los péptidos maduro de la enterocina A y de la enterocina B.
- La secuencia obtenida para la PCR inversa de la enterocina A tuvo un tamaño de 643 nucleótidos, la cual codifica para dos regiones; la primera presenta el 99% de similitud con la proteína de inmunidad de la enterocina A y la segunda un 100% de similitud con una proteína hipotética conservada considerada un factor de inducción de la enterocina A.
- Se obtuvo una secuencia consenso de 708 pb de las secuencias obtenidas, que fue alineada con una similitud del 100% con una secuencia parcial del operón de la enterocina A (*entAIF*) que es producida por *Enterococcus faecium* MTCC 5153 reportada en la base de datos del NCBI.



## 9. CONCLUSIONES

Se obtuvieron cepas resistentes de *Listeria* al efecto antimicrobiano de las bacteriocinas producidas por *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Enterococcus faecalis* MXVK22, y se comprobó con la tipificación realizada con PFGE, que las resistencias pueden ser producidas por alguna mutación en el ADN, por lo tanto no se recomienda el uso de estas bacteriocinas para el control de *Listeria* como único método de preservación.

*Enterococcus faecium* MXVK29 podría ser usada como parte de un método de bioconservación (ya sea como cultivo iniciador, cultivo bioprotector o como conservador natural en alimentos) debido a que no presenta los factores de virulencia estudiados y no presenta tampoco resistencia a algunos de los antibióticos más usados; además de no producir aminas biogénicas como la histamina y de tener la capacidad de producir bacteriocinas.

Las características bioquímicas y moleculares de la bacteriocina (bajo peso molecular de 3.5 kDa, actividad anti-*Listeria*, y la presencia de una región conservada YGNGV(X)C(X)4C, así como la secuencia del gen estructural y las genes accesorios) indican que *Enterococcus faecium* MXVK29 produce por lo menos la enterocina A reportada en la base de datos del NCBI. Aunque presenta el gen estructural para la enterocina B, no se logró comprobar la producción de este compuesto. La enterocina A pertenece a la clase IIa de la clasificación de Franz, y tiene un gran potencial para ser usadas como conservador natural en alimentos, pero deben realizarse mayores estudios para desarrollar algunas aplicaciones de este péptido dentro de una tecnología de barreras, ya sea adicionado como un aditivo purificado o adicionado indirectamente (inoculando la cepa que lo produce) al alimento de interés.

## 10. PERSPECTIVAS

La tendencia de los consumidores al consumo de productos naturales, sin el uso de aditivos o sustancias sintéticas agregadas que pudieran causar algún efecto nocivo a corto o largo plazo en su salud, plantea una problemática respecto de la vida de anaquel de los alimentos. Las bacteriocinas, conservadores naturales utilizables como parte de un mecanismo de barreras, pueden prolongar la vida de anaquel del producto al evitar o retrasar la proliferación de microorganismos patógenos y/o de deterioro, por lo que podrían ser parte de la solución a este problema (son sustancias naturales, susceptibles de degradación por las enzimas del tracto digestivo y que no resultan tóxicas al ser ingeridas). Se han publicado muchos estudios sobre estos péptidos antimicrobianos y su aplicación eficaz como conservador natural en alimentos, tanto como sustancias purificadas o por aplicación directa de los cultivos productores de las mismas. Para el caso de la enterocina A y su cepa productora (*Enterococcus faecium* MXVK29) se deben realizar mayores estudios para buscar aplicaciones como cultivos iniciadores o aditivos, además de profundizarse aun más sobre sus características genético-moleculares para poder continuar con la sobreexpresión de la enterocina o la producción heteróloga en la misma cepa de dos o más bacteriocinas de interés y así ampliar el espectro inhibitorio de la cepa que las contiene. Por otra parte, se deben realizar más estudios sobre la enterocina B, ya que se debe comprobar si esta se produce junto con la enterocina A, y actúan de forma sinérgica, lo cual le daría un mayor valor a la cepa productora para ser usada como cultivo iniciador. La generación de cepas capaces de producir altas cantidades de estas sustancias resultaría de gran interés, ya que la cantidad de bacteriocina producida naturalmente por las cepas es muy baja. Finalmente, sería interesante identificar el mecanismo de resistencia de las cepas de *Listeria*, una bacteria importante para el control microbiológico de los alimentos.

---

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Aasen, I.M., Moreto, T., Katla, T., Axelsson, T. y Storro, I. (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocins production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53: 159-166.
- Abriouel, H., Ben, O.N., Cobo, A.M., Lucas, R.L., Grande, M.J., Martínez-Viedma, P., Ortega, E., Martínez-Cañamero, M. y Gálvez, A. (2008). Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology* 123: 38-49.
- ACNFP. (1996). Report on *Enterococcus faecium*, strain K77D. MAFF Advisory Committee on Novel Foods and Processes, Report, Ergon House c/o Nobel House, 17 Smith Square, London SW1 3JR, United Kingdom.
- Adams, M.R. (1999). Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology* 68: 171-178.
- Alquicira, L.P. (2006). Determinación del mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK133. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Distrito Federal, México.
- Álvarez-Cisneros, Y.M. (2007). Identificación de bacteriocinas producidas por enterococos aislados de productos cárnicos. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Distrito Federal, México.
- Alzamora, S.M. y López-Malo, A. (2002). Microbial behavior modeling as a tool in the design and control of minimally processed foods. En *Engineering and Food for the 21st Century*, Welti-Chanes, J., Barbosa-Cánovas, G.V. y Aguilera, J.M., Eds., CRC Press LLC, Boca Raton, FL, p.631.
- Andrewes, F.W. y Horder, T.J. (1906). A study of the streptococci pathogenic for man. *The Lancet* 2:708-713.
- Anónimo (1969). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 12th report, N° 45A.
- Arthur, M. y Quintiliani, R. (2001). Regulation of VanA and VanB type glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy* 45: 375-381.
- Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M. y Nes, I.F. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1676-1682.
- Aymerich, T., Garriga, M., Ylla, J., Vallier, J., Monfort, J.M. y Hugas, M. (2000a). Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *Journal of Food Protection* 63: 721-726.

- Aymerich, T., Artigas, M.G., Garriga, M., Monfort, J.M., Hugas, M., (2000b). Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of in vitro production and anti-listerial effect in dry fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* 88: 686–694.
- Aymerich, M.T., Garriga, M., Costa, S., Monfort, J.M. y Hugas, M. (2002). Prevention of ropiness in cooked pork by bacteriocinogenic cultures. *International Dairy Journal* 12: 239–246.
- Bardócz, S. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science and Technology* 6: 341-346.
- Bell, R.G. y DeLacey, K.M. (1984). Heat injury and recovery of *Streptococcus faecium* associated with the souring of chubpacked luncheon meat. *Journal of Applied Bacteriology* 57: 229-236.
- Bellomo, G., Mangiagle, A., Nicastro, L. y Frigerio, G. (1980). A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhoea in pediatrics. *Current Therapeutic Research* 28: 927-934.
- Ben Belgacem, Z., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R. Martínez-Canamero, M., Gálvez, A. y Manai, M. (2010). Antimicrobial activity, safety aspects and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control* 21: 462-470.
- Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N.M.K., Franz, C.M.A.P., Holzappel, W.H., Pérez-Pulido, R. (2004). Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods. *System Applied and Microbiology* 27: 118–130.
- Bhunja, A.K., Johnson, M.C. y Ray, B. (1987). Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *Journal of Industrial Microbiology* 2: 319-322.
- Bhunja, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. y Kalchayanad, N. (1991). Mode of action of pediocin AcH on sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Bacteriology* 70: 25-33.
- Bover-Cid, S. y Holzappel, W. H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 55: 33-41.
- Bownas, J. (2003) Sequence similarity searching using NCBI BLAST, [www.ncbi.nlm.nih.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/posters/chromosome/blast.shtml](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sci/techresources/Human_Genome/posters/chromosome/blast.shtml), fecha de consulta 23 de diciembre de 2010.
- Boyle, J. F., Soumakis, S.A., Rendo, A., Herrington, J.A., Gianarkis, D.G., Thurberg, B.E. y Painter, B.G. (1993). Epidemiologic analysis and genotypic characterization of a nosocomial outbreak of vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* 31:1280-1285.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brink, B.T., Damink, C., Joosten, H. y Huisin't Veld, J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology* 11: 73-84.
- Butaye, P., Van Damme, K., Devriese, L.A., Van Damme, L., Baele, M. y Slauwers, E. (2000). In vitro susceptibility of *Enterococcus faecium* isolated from food to growth-promoting and therapeutic antibiotics. *International Journal of Food Microbiology* 54: 181-187.

- Callewaert, R., Hugas, M. y De Vuyst, L. (2000). Competitiveness and bacteriocin production of enterococi in the production of Spanish-style dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 57: 33-42.
- Canganella, F., Gasbarri, M., Massa, S. y Trovatelli, L.D. (1996). A microbiological investigation on probiotic preparations used for animal feeding. *Microbiology Research* 151: 167-175.
- Canzek, M.A., Rogelj, I. y Perko, B. (2005). Enterococci from Tolmic cheese: Population structure, antibiotic susceptibility and incidence of virulence determinants. *International Journal of Food Microbiology* 102: 239-244.
- Casaus, F., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nest, I.F., Hernández, P.E. y Holo, H. (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* TI36 which act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143: 2287-2294.
- Chen, H. y Hoover, D.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Technology* 2: 82-99.
- 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.
- Chipley, J.R. (2005). Capítulo 2: Sodium Benzoate and Benzoic Acid, en *Antimicrobials in foods*, editado por Davison, P.M., Sofos, J.N. y Branen, A.L., tercera edición, CRC-Press pp 11-48.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Håvarstein, L.S., Hernández, P.E. y Nes, I.F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4321-4330.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Fernández, M.F. y Hernández, P.E. (1998). Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiology* 15: 289-298.
- Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Havarstein, L.S., Holo, H., Hernández, P.E., y Nes, I.F. (2000). Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *Journal of Bacteriology* 182: 6806-6814.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. y Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71: 1-20.
- Clewell, D.B. (1981). Plasmids, drug resistance and gene transfer in the genus *Streptococcus*. *Microbiology Reviews* 45: 409-436.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), (2006). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests (approved standards M2-A9). Ninth Edition, vol 26 (1), Wayne, Pa.
- Cocconcelli, P.S., Cattivelli, D. y Gazzola, S. (2003). Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 88: 315-323.
- Coppola, S., Parente, E., Dumonet, S. y Peccerella, A. (1988). The microflora of natural whey cultures utilized as starters in manufacture of Mozzarella cheese from water-buffalo milk. *Lait* 68: 295-310.

- Cotter, P.D., Hill, C. y Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Microbiology Reviews* 3: 777-788.
- Crandall, A.D. y Montville, T.J. (1998). Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC700302 is a complex phenotype. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 231-237.
- Criado, R., Gutiérrez, J., Martín, M., Herranz, C., Hernández, P. y Cintas, L. (2006). Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P, and enterocin Q by *Enterococcus faecium* L50. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7634-7643.
- De Vuyst, L., Callewaert, R. y Crabbe, K. (1996). Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology* 142: 817-827.
- De Vuyst, L., Foulquié, M.M.R. y Revets, H. (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology* 84: 299-318.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. y Ross, P. (2006). Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* 16: 1058-1071.
- Devriese, L.A y Pot, B. (1995). The genus *Enterococcus*. In Wood, B.J.B., Holzappel, W.H. (Eds.), the lactic acid bacteria. The genera of lactic acid bacteria, vol.2. Blackie Academic and Professional, London, United Kingdom, pp. 327-367.
- Diario Oficial de la Federación (1988). Reglamento de la ley general de salud en materia de control sanitario de actividades, establecimientos y servicios, capítulo noveno, artículo 674, Dirección General de Epidemiología, de la Secretaría de Salud, boletín epidemiológico CIE10a Rev.
- Dimov, S.G., Peykov, S., Raykova, D., Ivanova, P., Kirilov, N., Dalgalarrrondo, M., Chobert, J.M., Haertlé, T. y Ivanova, I. (2010). A newly discovered bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 3915. *Beneficial Microbes* 1: 43-51.
- Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud (2006). Boletín epidemiológico CIE10a Rev.
- Doyle, E. 1999. Control de *Listeria* in meat. Food Research Institute. <http://www.wisc.edu/fri/briefs.htm>
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L.M. y Prévost, H. (2006). The continuing story of Class IIa bacteriocins. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 70:564-582.
- Du Toit, M., Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.T. y Holzappel, W.H. (2000). Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *Journal of Applied Microbiology* 88: 482-494.
- Duprè, I., Zanetti, S., Schito, A. M., Fadda, G. y Sechi, L. A. (2003). Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated collected in Sardinia (Italy). *Journal of Medical Microbiology* 52: 491-498.
- Dutka-Malen, S., Evers, S. y Courvalin, P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 24-27.
- Eaton, T.J. y Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1628-1635.
- Eijsink, V.G.H., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M.B., y Nes, I. (1998). Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied and*

- Environmental Microbiology 64: 3275-3281.
- Eliopoulos, G.M., Farber, B.F., Murray, B.E. Wennersten, C. y Moellering, R.C. (1984). Ribosomal resistance of clinical enterococcal to streptomycin isolates. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy* 25: 398-399.
- Ennahar, S. y Deschamps, N. (2000). Anti-listeria effect of enterocin A, produced by chesse-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 88: 449-457.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. y Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 85-106.
- Ennahar, S., Asou, Y., Zendo, T., Sonomoto, K. y Ishizaki, A. (2001). Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *International Journal of Food Microbiology* 70: 291-301
- Floriano, B., Ruiz-Barba, J.L. y Jiménez-Díaz, R. (1998). Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4883-4890.
- Foulquié, M.R.M., Callewaert, R., Devreese, B., Beeumen, J.V. y De Vuyst, L. (2003). Isolation and biochemical characterization of enterocins produced by enterococci from different sources. *Journal of Applied Microbiology* 94: 214-229.
- Foulquié, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. y De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* 106: 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Worobo, R.W., Quadri, L.E.N., Schillinger, U., Holzapfel, W.H., Vederas, J.C. y Stiles, M.E. (1999). Atypical locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2170-2178.
- Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings, J. y Holzapfel, W.H. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4385-4389.
- Franz, C.M.A.P., Van Belkum, M.J., Holzapfel, W.H., Abriouel, H. y Gálvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews* 31: 293-310.
- Freitas, A.C., Pais, C., Malcata, F.X. y Hogg, T.A. (1995). Microbiological characterization of Picante de Beira Baixa cheese. *Journal of Food Protection* 44: 2086-2092.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66: 365-378.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L. y Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 120: 51-70.
- García-Almendárez, B.E., Martín, S.E., Guerrero-Legarreta, I. y Regalado, C. (2008). Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control* 19: 670-680.
- García de Fernando, G.D., Hernández, P.E., Burgos, J., Sanz, B. y Ordoñez, J.A. (1991). Extracellular proteinase from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. Partial purification and some technological important properties. *Folia Microbiologica* 36: 429-436.
- Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Conga, T.M., Condon, S. y Swings, J. (2002). Source of

- enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3560-3565.
- Giraffa, G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 163-171.
- Giraffa, G., Carminati, D. Neviani, E. (1997). Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *Journal of Food Protection* 60: 732-738.
- Graves, L.M. y Swaminathan, B. (2001). PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by microrestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 65: 55-62.
- Gravesen A., Ramnath M., Rechinger B., Andersen N., Jänsch L-. Héchard Y., Hastings J.W. y Knöchel S. (2002a). High – level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* 148: 2361-2369.
- Gravesen, A., Jydegaard, A.M., Mendes da Silva, J., Hansen, T.B. y Knöchel, S. (2002b). Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 756-764.
- Haas, W. y Gilmore, M.S. (1999). Molecular nature of a novel bacterial toxin: the citolysin of *Enterococcus faecalis*. *Medical Microbiology and Immunology* 187: 183-190.
- Håvarstein, L.S., Diep, D.B. y Nes, I.F. (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Molecular Microbiology* 16: 229-240.
- Healey, V.L., Lessard, I.A.D., Roper, D.I., Knox, J.R. y Walsh, C.T. (2000). Vancomycin resistance in enterococci: reprogramming of the D-Ala-D-Ala ligases in bacterial peptidoglycan biosynthesis. *Chemistry and Biology* 7: R109-R119.
- Heng, N.C.K. y Tagg, J.R. (2006). Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology* 4: 1-2
- Herranz, C., Mukhopadhyay, S., Casaus, P., Martínez, J., Rodríguez, J.M., Nes, I.F., Cintas, L.M. y Hernández, P.E. (1999). Biochemical and genetic evidence of enterocin P production by two *Enterococcus faecium*-like strains isolated from fermented sausages. *Current Microbiology* 39: 282–290.
- Herranz, C., Casaus, P., Mukhopadhyay, S., Martínez, J.M., Rodríguez, J.M., Nes, I.F., Hernández, P.E. y Cintas, L.M. (2001). *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. *Food Microbiology* 18: 115-131.
- Hopzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. Y Huis in't Veld, J.H.J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 41: 85-101.
- Hugas, M., Garriga, M. y Aymerich, M.T. (2003). Functionality of enterococci in meat products: Review. *International Journal of Food Microbiology* 88: 223-233.
- Hummel, A.S., Hertel, C., Holzappel, W.H. y Franz, C.M.A.P. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 730-739.
- Huycke, M.M., Sahm, D.F. y Gilmore, M.S. (1998). Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emergency Infections Diseases* 4: 239-249.
- Izquierdo, E., Bednarezyk, A., Schaeffer, C., Cai, Y., Marchioni, E., Dorsselaer, A.V. y Ennahar, S. (2008). Production of enterocins L50A, L50B and IT, a new enterocin, by *Enterococcus faecium* IT62, a strain isolated from Italian Ryegrass in Japan.



- Antimicrobial Agents and Chemotherapy 52: 1917-1923.
- Jack, R.W., Tagg, J.R., y Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Review* 59:171-200.
- Jara, O.M.A. (2007). Tetraciclinas: un modelo de resistencia antimicrobiana. *Avances en Ciencias Veterinarias* 22:49-55.
- Jarvis, B. (1967). Resistance to nisin and production of nisin-inactivating enzymes by several *Bacillus* species. *Journal of General Microbiology* 47: 33-48.
- Jay, J.M. (1987). *Modern Food Microbiology*, Van Nostrand Reinhold.
- Jett, B.D., Huycke, M.M. y Gilmore, M.S. (1994). Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* 7: 462-478.
- Kang, J.H. y Lee, M.S. (2005). Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. *Journal of Applied Microbiology* 98: 1169-1176.
- 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: 4431-4473.
- Klaenhammer, T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70: 337-349.
- Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12: 39-86.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2001). Capítulo 10, Membranas biológicas y transporte en: *Principios de Bioquímica*, Omega 3ª edición, pp 268-297.
- Leroy, F. y De Vuyst, L. (2002). Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. *International Journal of Food Microbiology* 72: 155-164
- Leroy, F. y De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology* 15: 67-78.
- Lewenstein, A., Frigerio, G. y Moroni, M. (1979). Biological properties of SF68, a new approach for the treatment of diarrhoeal diseases. *Current Therapeutic Research* 26: 967-981.
- Lilly, D.H. y Stillwell, R.H. (1965). Probiotics: growth promoting factors produced by microorganism. *Science* 147: 747-748
- Line, J.E., Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V. y Mitsevich, I.P. (2008). Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 1094-1100.
- López-Díaz, T.M., Santos, J.A., González, C.J, Moreno, B. y García, M.L. (1995). Bacteriological quality of tradicional Spanish blue cheese. *Milchwissenschaft* 50: 503-505.
- López-Malo, A., Guerrero, S. y Alzamora, S.M. (2000). Probabilistic modeling of *Saccharomyces cerevisiae* inhibition under the effects of water activity, pH and potassium sorbate. *Journal of Food Protection* 63: 91-95.
- López-Malo, A.V., Palou, E., Parish, M.E. y Davison, P.M. (2005). Capítulo 21: Methods for activity assays and evaluation of results, en *Antimicrobials in foods*, editado por Davison, P.M., Sofos, J.N. y Branen, A.L., tercera edición, CRC-Press pp 659-680.
- Losteinkit, C., Uchiyama, K., Ochi, S., Takaoka, T., Nagahisa, K. y Shioya, S. (2001). Characterization of bacteriocin J15 produced by *Enterococcus faecium* N15 and cloning of the related genes. *Journal of Bioscience and Biotechnology* 91: 390-395.

- Lowe, A.M., Lambert, L.M. y Smith, A.W. (1995). Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesions from some oral streptococci. *Infection and Immunity* 63: 703-706.
- 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.
- Majjala, R., Eerola, S., Lievonon, S., Hill, P. y Hirvi, T. (1995). Formation of biogenic amines during ripening of dry sausages as affected by starter culture and thawing time of raw materials. *Journal of Food Science* 60: 1187-1190.
- Makinen, P.L., Clewell, D.P., An, F., and Makinen, K.K. (1989). Purification and substrate specificity of a strong hydrophobic extracellular metalloendo-peptidase (gelatinase) from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10). *The Journal of Biological Chemistry* 264: 3325-3334.
- Mareková, M., Lauková, A., DeVuyst, L., Skaugen, M. y Nes, I.F. (2003). Partial characterization of bacteriocins produced by environmental strain *Enterococcus faecium* EK13. *Journal of Applied Microbiology* 94: 523-530.
- Marín, I.F. (2002). Comunicación personal. Universidad de Murcia, España.
- 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* subs *diacetylactis*. *Journal of Food Safety* 19: 161-170.
- Martin, B., Garriga, M., Hugas, M. y Aymerich, T. (2005). Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* 98: 1177-1190.
- Martín-Platero, A.M., Valdivia, E., Ruiz-Rodríguez, M., Soler, J.J., Martín-Vivaldi, M., Maqueda, M. y Martínez-Bueno, M. (2006). Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4245–4249.
- Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Galvez, A., Samyn, B. Van Beeumen, J., Coyette, J. y Valdivia, E. (1994). Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *Journal of Bacteriology* 176: 6334-6339.
- Mataragas, M., Drosinos, E.H., Tsakalidou, E. y Metaxopoulos, J. (2004). Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Antonie Van Leeuwenhoek* 85: 191-198.
- Miller, K.W., Ray, P., Steinmetz, T., Hanekamp, T. y Ray, B. (2005). Gene organization and sequences of pediocin AcH/PA-1 production operons in *Pediococcus* and *Lactobacillus* plasmids. *Letters in Applied Microbiology* 40: 56–62.
- Minor-Pérez, H., Ponce-Alquicira, E., Guerrero-Legarreta, I., Regalado-González, C., Farrés González, A. (2005). Effect of extrinsic parameters on the production of a bacteriocin by *Lactobacillus buchneri*, isolated from Mexican raw sausages. *International Journal of Food Properties* 8: 69-78.
- Moreno, M.R.F., Leisner, J.J., Tee, L.K., Ley, C., Radu, S., Rusul, G., Vancanneyt, M. y De Vuyst, L. (2002). Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Applied Microbiology* 92: 147-157.
- Morrison, D., Woodford, N. y Cooksen, B. (1997). Enterococci as emerging pathogens of humans. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 83: 89S-99S.

- Mundt, O.J., (1986). Enterococci. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1063-1065.
- Mundy, L.M., Sahm, D.F. y Gilmore, M. (2000). Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 513-522.
- Murray, B.E. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews* 3: 46-65.
- Murray, B.E., Tsao, J. y Panida, J. (1983). Enterococci from Bangkok, Thailand, with high-level resistance to currently available aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 23: 799-802.
- Nes, I.F. y Holo, H. (2000). Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers (Peptide Science)* 55: 50-61.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S. y Brurberg, M.B. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70: 113-128.
- Nes, I.F., Holo, H., Fimland, G., Hauge, H.H. y Nissen-Meyer, J. (2002). Unmodified peptide-bacteriocins (class II) produced by lactic acid bacteria. In *Peptide Antibiotics, Discovery, Modes of Action and Application*. Edited by C.J. Dutton, M.A. Haxell, H.A.I. McArthur and R.G. Wax. New York: Marcel Dekker. pp 61-87.
- Nettles, C.G. (1993). Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* 56: 338-356.
- Nicas, T.I., Cole, C.T., Preston, D.A., Schabel, A.A. y Nagarajan, R. (1989). Activity of glycopeptides against vancomycin-resistant Gram-positive bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33: 1477-1481.
- Nilsen, T., Nes, I.F. y Holo, H. (1998). An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. *Journal of Bacteriology* 180: 1848-1854.
- Noble, W.C., Virani, Z. y Cree, R.G. (1992). Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* 72: 195-198.
- Ohmomo, S., Murata, S., Katayama, N., Nitisinprasart, S., Kobayashi, M., Nakajima, T., Yajima, M. y Nakanishi, K. (2000). Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. *Journal of Applied Microbiology* 88: 81-89.
- Olivera, M., Zarelli, V., Pappano, N. y Debattista, N. (2001). A comparative study of bacteriostatic activity of synthetic hydroxylated flavonoids. *Brazilian Journal of Microbiology* 32: 229-232.
- Parente, E. y Ricciardi, A. (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Microbiological Biotechnology* 52: 628-638.
- Pavia, M., Nobile, C.G., Salpietro, L. y Angelillo, I.F. (2000). Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *Journal of Food Protection* 63: 912-915.
- Pechere, J.C. (2001). Macrolide resistance mechanism in Gram-positive cocci. *International Antimicrobial Agents* 18: S25-S28.
- Pérez-Pulido, R., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Martínez-Cañamero, M. y Gálvez, A. (2006). Safety and potential risks of enterococci isolated from traditional fermented capers. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 2070-2077.
- Quednau, M.S., Ahrné, S. y Molin, G. (1998). Antibiotic resistant strains of *Enterococcus* isolated from Swedish and Danish retailed chicken and pork. *Journal of Applied Bacteriology* 84: 1163-1170.

- Ray, B. (2004). Fundamental food microbiology, ed. CRC, New York, pp. 233-240.
- Roberts, M. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiology Letters 245: 195-203.
- Rubin, L.G., Tucci, V., Cercenado, E., Eliopoulos, G. y Isenberg, H.D. (1992). Vancomycin resistant *Enterococcus faecium* in hospitalized children. Infection Control and Hospital Epidemiology 13: 700-705.
- Salminen, S., Isolauri, E. y Salminen, E. (1996). Clinical uses of probiotics for establishing gut mucosal barrier, successful strains and future challengers. Antonie Van Leeuwenhoek 70: 347-358.
- Schägger, H. y Von Jawon, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polycrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 100 kDa. Analytical Biochemistry 166: 368-379.
- Schillinger, U. y Lucke, F.K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Applied and Environmental Microbiology 55: 1901-1906.
- Schleifer, P.M. y Kilpper-Balz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 34: 31-34.
- Schneider, R. (2005). Caracterización bioquímica y molecular de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas aisladas de productos cárnicos mexicanos. Tesis doctoral, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Distrito Federal, México.
- Semedo, T., Almeida, M.S., Martins, P., Silva, L.M.F., Figueiredo, M.J.J., Tereiro, R. y Barreto, C.M.T. (2003). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in Enterococci. Journal of Clinical Microbiology 41: 2569-2576.
- Shalini, M. y Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. International Journal of Food Microbiology 105: 281-295.
- Shankar, N., Lockatell, C.V., Baghdayan, A.S., Drachenberg, C., Gilmore, M.S. y Johnson, D.E. (2001). Role of *Enterococcus faecalis* surface protein *esp* in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. Infection and Immunity 69: 4366-4372.
- Sherman, J.M. (1937). The streptococci. Bacteriology Reviews 1: 3-97.
- Shin, M.S., Han, S.K., Ji, A.R., Kim, K.S. y Lee, W.K. (2008). Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the gastrointestinal tract of broiler chickens for probiotic use. Journal of Applied Microbiology 105: 2203-2212.
- Singh, K.V., Coque, T.M., Weinstock, G.M. y Murray, B.E. (1998). In vitro testing of an *Enterococcus faecalis* *efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. FEMS Immunology Medicine of Microbiology 21: 323-331.
- Sparo, M., Nuñez, G.G., Castro, M., Calcagno, M.L., Garcia-Allende, M.A., Ceci, M., Najle, R. y Manghi, M. (2008). Characteristics of an environmental strain, *Enterococcus faecalis* CECT7121, and its effects as additive on craft dry-fermented sausages. Food Microbiology 25: 607-615.
- Stiles, M.E., Ramji, N.W. y Paradis, D.C. (1978). Incidence and relationship of group D streptococci with other indicator organism in meats. Canadian Journal of Microbiology 24: 1502-1508.
- Suzzi, G. y Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. International Journal of Food Microbiology 88: 41-54.

- Tadesse, G.T., Moretro, T., Kohler, A., Axelsson, L. y Naterstad, K. (2009). Complex phenotypic and genotypic responses of *Listeria monocytogenes* strains exposed to the class IIa bacteriocin sakacin P. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 6973-6980.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V. Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. y Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 2233-2239.
- Tenover, F.C., Weigel, L.M., Appelbaum, P.C., McDougal, L.K., Chaitramm J., McAllisterm S., Clark, N., Killgore, G., O'Hara, C.M., Jevittm, L., Patel, J.B. y Bozdogan, B. (2004). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrobials Agents of Chemotherapy* 48: 275-280.
- Teuber, M., Meile, L. y Schwarz, F. (1999). Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76: 115-137.
- Thiercelin, M.E. (1899). Sur un diplocoque saprophyte de l'intestine susceptible de devenir pathogene. *Comptes Rendus des Seances de la Societé de Biologie* 5: 269-271.
- Thomas, L.V. y Delves-Broughton, J. (2005). Capítulo 7: Nisin, en *Antimicrobials in foods*, editado por Davison, P.M., Sofos, J.N. y Branen, A.L., tercera edición, CRC-Press pp 237-274.
- Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M.J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penades, J.R. y Lasa, I. (2001). The enterococcal surface protein, *esp*, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied Environmental Microbiology* 67: 4538-4565.
- Tominaga, T. y Hatakeyama, Y. (2006). Determination of essential and variable residues in pediocin PA-1 by NNK scanning. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1141-1147.
- Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K., y Ike, Y. (1996). Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI17. *Journal of Bacteriology* 178: 3585-3593.
- Vadyvaloo, V., Arous, A., Gravesen, A., Héchar, 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.
- Vadivaloo, V., Hastings, J.W., Van Der Merwe, M.J. y Rautenbach, M. (2002). Membranes of class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5223-5230.
- Vancanneyt, M., Lombardi, A., Andrighetto, C., Knijff, E., Torriani, S., Bjorkroth, K.J., Franz, C.M., Foulquié, M.M.R., Revets, H., De Vuyst, L., Swings, J., Kersters., Dellaglio, F. y Holzapfel, W.H. (2002). Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1981-1991.
- Vankerckhoven, V., Autgaerden, T. V., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D. y Goossens, H. (2004). Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp* and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants

- among European Hospital isolates of *Enterococcus faecium*. Journal of Clinical Microbiology 42: 4473-4479.
- Van Belkum, M.J. y Stiles, M.E. (2000). Nonantibiotics antibacterial peptides from lactic acid bacteria. Natural Product Reports, 17: 323–335.
- Vure, B. y Halami, P.M. (2009). Evaluation of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from fermented milk for probiotic applications. International Journal of Probiotics and Prebiotics 4: 33-40.
- Waters C.M. y Dunny, G.M. (2001). Analysis of functional domains of the *Enterococcus faecalis* pheromone-induced surface protein aggregation substance. Journal of Bacteriology 183: 5659-5667.
- Wegener, H.C., Aarestrup, F.M., Jensen, L.B., Hammerum, A.M. y Bager, F. (1999). Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. Emerging Infections Diseases 5: 329-335.
- Worobo, R.W., Henkel, T., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C. y Stiles, M.E. (1994). Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. Microbiology 140: 517–526.
- Yamamoto, Y., Togawa, Y., Shimosaka, M. y Okazaki, M. (2003). Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. Applied and Environmental Microbiology 69: 5746–5753.
- Yang, R., Johnson, M. y Ray, B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology 58: 3355-3359.
- Yean, Y.C., Su, Y.L., Lalitha, P. y Ravichandran, M. (2007). A nanoplex PCR assay for the rapid detection of vancomycin and bifunctional aminoglycoside resistance in *Enterococcus species*. BMC Microbiology 7:112.
- 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 : 1071–1076.
- Yousif, N.M.K., Dawyndt, P., Abriouel, H., Wijaya, A., Schillinger, U., Vancanney, M., Swings, J., Dirar, H.A., Holzapfel, W.H. y Franz, C.M.A.P. (2005). Molecular characterization, technological properties and safety aspects of enterococci from “Hussuwa” an African fermented sorghum product. Journal of Applied Microbiology 98: 216-228.

**Anexo A.*****Enterococcus faecium entA, entI, entF, entK, entR, orfA1, orfA2, orfA3, entT, entD, orfA4, orfA5 genes, complete cds***

GenBank: AB292463.1

Go to:

LOCUS AB292463 9661 bp DNA linear  
 BCT 29-JUN-2010  
 DEFINITION *Enterococcus faecium entA, entI, entF, entK, entR, orfA1, orfA2, orfA3, entT, entD, orfA4, orfA5 genes, complete cds.*  
 ACCESSION AB292463  
 VERSION AB292463.1 GI:1546235  
 SOURCE *Enterococcus faecium*  
 ORGANISM *Enterococcus faecium*  
 Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales;  
 Enterococcaceae;  
 Enterococcus.  
 REFERENCE 1  
 AUTHORS Hu, C.B., Malaphan, W., Zendo, T., Nakayama, J. and Sonomoto, K.  
 TITLE Enterocin X, a novel two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, has an antibacterial spectrum entirely different from those of its component peptides  
 JOURNAL Appl. Environ. Microbiol. 76 (13), 4542-4545 (2010)  
 PUBMED [20418437](#)  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 9661)  
 AUTHORS Hu, C., Praphailong, W., Zendo, T., Nakayama, J. and Sonomoto, K.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (05-FEB-2007) Contact: Chih-Bo Hu Kyushu University,  
 Laboratory of Microbial Technology, Division of Microbial Science and Technology, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School; 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka, Fukuoka 812-8581, Japan  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..9661  
 /organism="Enterococcus faecium"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /strain="Bb5"

---

```

/isolation_source="Sugar apple"
      /db_xref="taxon:1352"
/identified_by="Wanna Praphailong"
      /note="Genetic determinants for enterocin

```

A (LAB

bacteriocin) biosynthesis and regulation in *Enterococcus faecium* Bb5, including the structural gene (entA), and the genes for immunity protein (entI), inducing peptide (entF), histidine protein kinase (entK), response regulator (entR), ABC transporter (entT), and accessory protein (entD), as well as 5 function-unknown genes"

gene779..934

```

      /gene="entF"
RBS          779..782
      /gene="entF"
/note="putative"
CDS788..934
      /gene="entF"
      /inference="similar to AA
sequence:INSD:AAD29134.1"
      /codon_start=1
      /transl_table=11
      /product="pre-peptide of inducing
peptide"
      /protein_id="BAF74792.1"
      /db_xref="GI:154623585"

/translation="MEEKNRLNAKQCS DQELKKIKGGAGTKPQGKPASNLVECVFSLF
      KKC N"

```

gene961..2257

```

      /gene="entK"
RBS961..966
      /gene="entK"
      /note="putative"
CDS          974..2257
      /gene="entK"
      /inference="similar to AA
sequence:INSD:AAD29135.1"

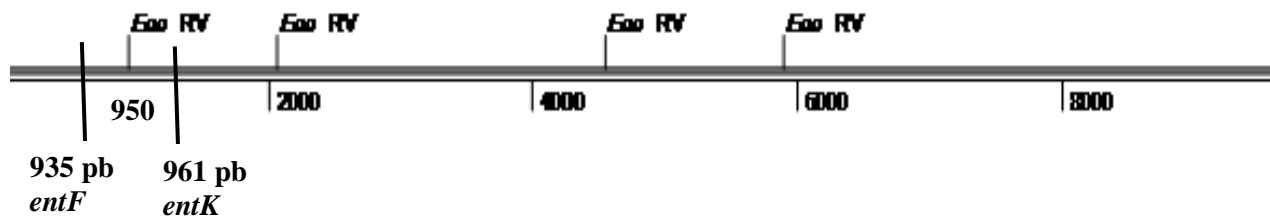
```



```

/codon_start=1
/transl_table=11
homologue"
/product="histidine protein kinase
/protein_id="BAF74793.1"
/db_xref="GI:154623586"

```



**Figura 32.** Diagrama de los sitios de corte para la enzima de restricción *EcoRV* sobre la secuencia de nucleótidos que codifican para el operón de *Enterococcus faecium* que codifica para la enterocina A y sus proteínas accesorios. Se indica el número de donde termina la secuencia para el gen de inducción (*entF*) y comienza la secuencia para el gen de la proteína sensora histidín-quinasa (*entK*).

---

## Anexo B. Producción Científica

### a) Artículo en revista arbitrada.

1. **Yenizey M. Alvarez-Cisneros**, Francisco J. Fernández, Carmen Wacher-Rodarte, Manuel B. Aguilar, Teresita del Rosario Sáinz Espuñes y Edith Ponce-Alquicira. (2010) Biochemical characterization of a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Enterococcus faecium* MXVK29, isolated from Mexican traditional sausage. *Journal of Food Science and Agriculture*, 90: 2475-2481.
2. Luis A. Aguado Bautista, **Yenizey M. Álvarez Cisneros** y Edith Ponce Alquicira. (2010) Evaluación del efecto antimicrobiano in vitro del extracto crudo de bacteriocina en combinación con conservadores químicos utilizados en la industria cárnica. *Revista Nacional Nacameh (Publicación periódica arbitrada en Ciencia y Tecnología de la Carne)*, 4: 69-84.

### b) Presentaciones en congresos Nacionales e Internacionales.

1. **Y. M. Alvarez Cisneros**, F. J. Fernández, C. Wacher Rodarte, T. Sainz Espuñes, y E. Ponce Alquicira. (2010) Molecular identification of bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Enterococcus faecium* MXVK29. International Conference on Antimicrobial Research, del 03 al 05 de Noviembre en Valladolid, España. Poster Virtual
2. **Y. M. Alvarez Cisneros**, F. J. Fernández, C. Wacher Rodarte, T. Sainz Espuñes, and E. Ponce Alquicira. (2010) Safety aspects of a bacteriogenic starter culture *Pediococcus acidilactici* MXVK133 isolated from Mexican traditional chorizo. Congreso Internacional AMSA del 19 al 22 de Junio en Lubbock, Texas, USA. Poster.
3. **Y. M. Alvarez Cisneros**, F. J. Fernández, C. Wacher Rodarte, T. Sainz Espuñes, and E. Ponce Alquicira. (2010) Inhibition of *Listeria* strains by the bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis*. Congreso Internacional del Institute of Food Technologists del 17 al 20 de Julio en Chicago, Illinois, USA. Poster
4. Fernández-Soto, Ruth Rosalia, **Álvarez-Cisneros, Yenizey Merit** y Ponce-Alquicira, Edith. (2010) Comparison of the inhibitory effect of bacteriocins, sodium nitrite and potassium sorbate against *Escherichia coli* in ovine fresh meat. IV International Congress on Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries del 29 de Noviembre al 01 de Diciembre, en Boca del Rio, Veracruz, México. Poster
5. **Y. M. Álvarez-Cisneros**, F. Fernández- Perrino y E. Ponce-Alquicira. (2009) Técnicas de biología molecular utilizadas para identificar bacterias lácticas aisladas de carne y productos cárnicos. Coloquio Nacional en Ciencia y Tecnología de la Carne, 05 y 06 de Noviembre, Iztapalapa, México D.F. Poster.

6. **Álvarez Cisneros, Y. M.**, Fernández, F. J., Wachter Rodarte, C., Sáinz Espuñes, T.R., y Ponce Alquicira, E. (2009) Pruebas de resistencia a antibióticos y factores de virulencia de un posible cultivo iniciador *Pediococcus acidilactici* MXVK133. Congreso Internacional de Inocuidad de Alimentos del 04 al 06 de Noviembre, en Puerto Vallarta-Jalisco, México. Presentación oral.
7. E. Ponce-Alquicira, **Y. M. Álvarez-Cisneros**, F. J. Fernández, C. Wachter-Rodarte y T. R. Sainz-Espuñes. (2009) Antibiotic susceptibility and virulence determinants of bacteriogenic lactic acid bacteria isolated from fermented meat sausages. Congreso Internacional del Institute of Food Technologists del 06 al 10 en Anaheim, California, USA. Poster.
8. E. Ponce-Alquicira, **Y. M. Alvarez-Cisneros**, F. J. Fernández y C. Wachter-Rodarte (2009). Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Enterococcus faecalis* MXKV22 isolated from fermented sausages. Congreso Internacional del Institute of Food Technologists del 06 al 10 de Junio en Anaheim, California, USA Poster
9. **Alvarez-Cisneros, Y. M.**, Ponce-Alquicira, E., Fernández, F. J., Wachter-Rodarte, C. y Aguilar, M. B. (2008) Partial characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* MXKV29 strain active against *Listeria spp.* 3rd International Congress on Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries del 14 al 17 de Octubre del 2008, Querétaro, México. Presentación oral.
10. E. Ponce-Alquicira, **Y. M. Alvarez-Cisneros**, F. J. Fernández y C. Wachter-Rodarte. (2008). Anti-listerial activity of bacteriocin-like inhibitory substances from *Enterococcus faecium* 29 and *Enterococcus faecalis* 22 isolated from Mexican fermented sausages. Congreso Internacional del Institute of Food Technologists del 28 de Junio al 02 de Julio en New Orleans, Luisiana, USA. Poster