



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
UNIDAD IZTAPALAPA**

**DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS TIPO  
BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR CEPAS  
IDENTIFICADAS COMO *Weissella* sp.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE  
ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A :**

**Q.B.P. EMMANUEL ALEJANDRO GERVASIO ORTIZ**

**DIRECTOR:**

**DR. CARLOS VÁZQUEZ SALINAS**

**MÉXICO, D.F. OCTUBRE DE 2012**

México D.F. a 8 de Octubre de 2012

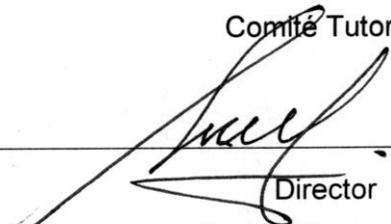
El lector designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la idónea  
comunicación de resultados:

**“Determinación de sustancias tipo bacteriocinas producidas por cepas  
identificadas como *Weissella* sp.”**

Que presentó:

**Q.B.P. Emmanuel Alejandro Gervasio Ortiz**

Comité Tutorial:



---

Director  
Dr. Carlos Vázquez Salinas



---

Lectora  
Dra. Elsa Irma Quiñonez Ramírez

## AGRADECIMIENTOS

*A mi madre, mis tías, Gerardo y José.*

*En una palabra a mi familia, por todo su apoyo, ayuda, preocupaciones y consejos, por estar siempre ahí, a ustedes decirles gracias es poco.*

*A la Dra. Elsa Irma Quiñonez y al Dr. Carlos Vázquez Salinas.*

*Por la confianza depositada en mi y por ser mis mentores en esta área de la investigación, muchas gracias.*

*A la M. en C. Lizeldi Bernardino Varo y al M. en C. J. Julio Tercero Albuero.*

*Gracias por ser, también, mentores, maestros, compañeros y amigos, sin su ayuda, apoyo y consejos no sabría todo lo que sé ahora.*

*A Metztli, Jerónimo y Oscar V.*

*Por los momentos, las risas, las platicas, todo. A cada uno de ustedes gracias por ser parte de mi vida y por su compañía en esta etapa.*

## RESUMEN

El género *Weissella* esta conformado, hasta el momento, por más de 18 especies, algunas de estas producen bacteriocinas o sustancias tipo bacteriocinas. Se trabajó con dos cepas aisladas a partir de col de Bruselas, se sembraron en agar MRS a 37°C por 24 hrs. en tensión parcial de CO<sub>2</sub>; para la identificación se amplificó una región conservada del gen 16S del rRNA, se determinó la cinética de crecimiento y producción de sustancias tipo bacteriocinas poniendo de manifiesto, mediante un reto microbiano. En este estudio se encontró que las cepas identificadas por métodos bioquímicos, pertenecen al género *Weissella*, con un 96% de identidad para género, no así para especie. Se confirmó el género de las dos cepas de *Weissella*. La fase logarítmica duro, aproximadamente, 4 hrs en *Weissella* sp.1 y alrededor de 6 hrs. para *Weissella* sp.2. El tiempo en el que se detectó la presencia de sustancias tipo bacteriocinas fue a las 2 hrs., al inicio de la fase logarítmica, para ambas cepas, se encontró que la mayor actividad inhibitoria fue contra *L. monocytogenes*; lo cual implica que las cepas tienen un potencial biotecnológico dentro de la industria de alimentos.

## ABSTRACT

The genus *Weissella* comprises, up to this moment, over 18 species, some of which produce bacteriocins or bacteriocins-like activity. The line of research focused on two strains isolated from Brussels sprouts, they were grown in MRS agar at 37° C with partial CO<sub>2</sub>; for the identification a conserved region of the gene 16S rRNA was amplified, the growing and the production of bacteriocins-like activity kinetics was determined by antimicrobial activity. In this work we found that the isolates identified by biochemical tests, are from the genus *Weissella* with 96% of identity for the genus, but species. The genus *Weissella* was confirmed for both isolates. The logarithmic phase lasted approximately 4hrs. in *Weissella* sp.1 and around 6 hrs for *Weissella* sp.2. At 2hrs, at the beginning of the logarithmic phase, the bacteriocins-like activity was detected in both isolates, it was found that the antimicrobial activity was much higher against *L. monocytogenes*, demonstrated the biotechnology potential on food industry.

## CONTENIDO

	<b>PÁGINA</b>
Índice de Cuadros	<i>iii</i>
Índice de Figuras	<i>iv</i>
Índice de Gráficas	<i>v</i>
<hr/>	
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>I.1 GENERALIDADES DE LAS BAL</b>	<b>1</b>
<b>I.2 GENERALIDADES DE <i>Weissella</i></b>	<b>2</b>
<b>I.3 BACTERIOCINAS</b>	<b>3</b>
<b>I.3.1 Clasificación de bacteriocinas</b>	<b>4</b>
<b>I.3.2 Bacteriocinas producidas por <i>Weissella</i></b>	<b>5</b>
<b>I.3.3 Modo de acción de las bacteriocinas</b>	<b>7</b>
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>8</b>
<b>III. HIPOTESIS</b>	<b>9</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
<b>V. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO</b>	<b>11</b>
<b>VI. MATERIAL Y METODOS</b>	<b>12</b>
<b>VI.1 MATERIAL BIOLÓGICO</b>	<b>12</b>
<b>VI.2 MÉTODOS</b>	<b>12</b>
<b>VI.2.1 Obtención de DNA genómico</b>	<b>12</b>
<b>VI.2.2 Condiciones para la amplificación gel gen 16S del RNA ribosomal</b>	<b>12</b>
<b>VI.2.3 Amplificación de los genes mediante la técnica de PCR</b>	<b>13</b>
<b>VI.2.4 Purificación del producto de PCR a partir de geles de agarosa</b>	<b>13</b>
<b>VI.2.5 Análisis bioinformático</b>	<b>13</b>
<b>VI.2.6 Cinética de crecimiento y de producción de bacteriocinas</b>	<b>14</b>
<b>VI.2.7 Determinación de la actividad antimicrobiana en el sobrenadante de las BAL</b>	<b>14</b>
<b>VI.2.8 Ensayo de inhibición</b>	<b>14</b>
<b>VII. RESULTADOS</b>	<b>15</b>
<b>VII.1 Amplificación del gen 16S del RNA ribosomal y análisis bioinformático.</b>	<b>15</b>

<b>VII.2 Cinética de crecimiento y de producción de bacteriocinas.</b>	16
<b>VII.2.1 <i>Weissella</i> sp. 1.</b>	16
<b>VII.2.2 <i>Weissella</i> sp. 2.</b>	19
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	22
<b>VIII.1 Amplificación del gen 16S del RNA ribosomal y análisis bioinformático.</b>	22
<b>VII.2 Cinética de crecimiento y de producción de bacteriocinas.</b>	23
<b>IX.CONCLUSIONES</b>	26
<b>X. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES</b>	27
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b>	28

## ÍNDICE DE CUADROS

	PÁGINA
<b>Cuadro 1.</b> Clasificación de Bacteriocinas.	4
<b>Cuadro 2.</b> Cepas testigo que se utilizaron.	12
<b>Cuadro 3.</b> Condiciones de reacción para la identificación de las cepas aisladas. Iniciadores de Forney <i>et al.</i> 2004.	12
<b>Cuadro 4.</b> Diámetro de inhibición de las STB. Cepa: <i>Weissella</i> sp. 1.	17
<b>Cuadro 5.</b> Diámetro de inhibición de las STB. Cepa: <i>Weissella</i> sp. 2.	20

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>PÁGINA</b>
<b>Figura 1.</b> Vía de fermentación láctica.	1
<b>Figura 2.</b> Electroferograma del producto amplificado del gen 16S del RNA ribosomal con los iniciadores propuestos por Forney <i>et al.</i> 2004.	15
<b>Figura 3.</b> BLAST utilizando la secuencia obtenida del gel.	15
<b>Figura 4.</b> Halos de inhibición de <i>Weissella</i> sp. 1 en <i>L. monocytogenes</i> .	18
<b>Figura 5.</b> Halos de inhibición de <i>Weissella</i> sp. 1 en <i>S.Tiphy</i> .	18
<b>Figura 6.</b> Halos de inhibición de <i>Weissella</i> sp. 2 en <i>L. monocytogenes</i> .	21
<b>Figura 7.</b> Halos de inhibición de <i>Weissella</i> sp. 2 en <i>E. coli</i> .	21

## **ÍNDICE DE GRÁFICAS**

	<b>PÁGINA</b>
<b>Gráfica 1.</b> Cinética de Crecimiento de <i>Weissella</i> sp. 1.	16
<b>Gráfica 2.</b> Cinética de Crecimiento de <i>Weissella</i> sp. 2.	19

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1 GENERALIDADES DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)

Las BAL son microorganismos Gram positivos, bacilos o cocos, catalasa negativos, no esporulados, aerotolerantes, organotróficos, tolerantes a la acidez, capaces de fermentar los hidratos de carbono para obtener energía y la producción de ácido láctico; sus características pueden variar en determinadas condiciones. La vía metabólica por la cual degradan la glucosa puede ser homofermentativa o heterofermentativa. En el primer caso se producen dos moléculas de ácido láctico, y en el segundo se obtiene etanol, ácido acético, ácido láctico y dióxido de carbono (Figura 1)<sup>13,18,20,21,25,27</sup>.

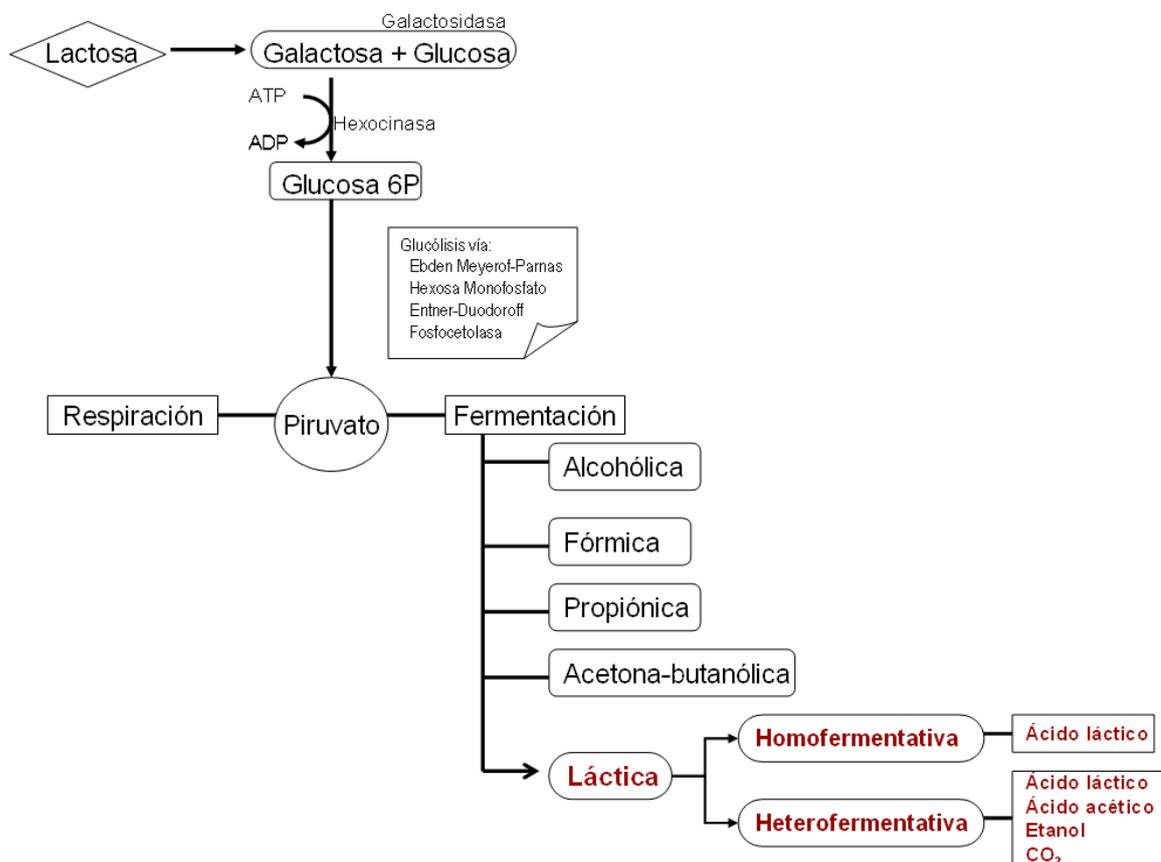


Figura 1. Vía de fermentación láctica. (Tomado de Gervasio-Ortiz EA, Navarro-Rodríguez AE. 2009)

Se encuentran en hábitats ricos en nutrientes caracterizados por la presencia de carbohidratos solubles, productos de la degradación de proteínas, vitaminas, y con bajas tensiones de oxígeno, por ejemplo: la leche y sus derivados, principalmente; productos

cárnicos, embutidos y vegetales fermentados; incluso están presentes en las cavidades humanas y de animales<sup>18,21</sup>.

Las bacterias lácticas transforman la lactosa en ácido láctico y otros ácidos orgánicos bajando el pH hasta 4.5, alcanzando su punto isoeléctrico e impidiendo la acción de bacterias patógenas, ejerciendo así una acción conservadora<sup>13</sup>. Ya sea porque un bajo pH vuelve a los ácidos orgánicos liposolubles, permitiéndoles pasar a través de la membrana celular y alcanzar el citoplasma de los patógenos, o por la competencia por los nutrientes esenciales, acompañada por la acumulación de D-aminoácidos y una disminución del potencial de oxido reducción<sup>25</sup>.

A las bacterias ácido lácticas se les conoce, como bacterias benéficas y se han designado como GRAS (Generalmente Reconocidas como Benéficas, por sus siglas en ingles), estas tienen un papel importante en la conservación de los alimentos, productos fermentados, y como microorganismos competitivos naturales o como parte de cultivos iniciadores de la fermentación, específicos en condiciones controladas. Sin embargo en la última década han recibido más atención, pues algunas de estas bacterias producen sustancias antagónicas llamadas bacteriocinas, que presentan actividad contra microorganismos patógenos<sup>19,25</sup>.

## **I.2 GENERALIDADES DEL GÉNERO *Weissella***

La clasificación de las bacterias ácido lácticas se basa principalmente en la morfología microscópica, la manera en la que fermentan la glucosa, su crecimiento a diferentes temperaturas, la forma en la que se usa el ácido láctico producido, la capacidad de crecer a altas concentraciones de sal y la tolerancia a ambientes ácidos o alcalinos<sup>17</sup>. Dentro de los principales géneros están: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*, este último de reciente identificación. Otros géneros que también se incluyen dentro de las BAL son: *Aerococcus*, *Microbacterium*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium*<sup>27,25</sup>.

El género *Weissella* fue acuñado por Collins *et al.*, en 1993, mientras hacían un análisis filogenético de algunas bacterias ácido lácticas tipo *Leuconostoc* desconocidas, para dar cabida a cinco especies de *Lactobacillus* heterofermentativos y una especie anteriormente clasificada como *Leuconostoc paramesenteroides*<sup>8</sup>.

Utilizando los datos de las secuencias 16S y 23S RNAr, Martínez-Murcia y Collins, en 1990 y 1993; demostraron que *Leuconostoc paramesenteroides* era filogenéticamente distinto de *L. mesenteroides* y que se agrupaba con cinco especies de lactobacilos heterofermentativos, *Lactobacillus confusus*, *L. halotolerans*, *L. kandleri*, *L. minors* y *L. viridescens*. Esto dio lugar a la descripción del género *Weissella* que comprende al anterior *L. paramesenteroides*, las cinco especies de *Lactobacillus*, y en ese momento una especie nueva llamada *Weissella hellenica*. En la actualidad se han reportado más de 18 especies, aproximadamente, del género *Weissella*, entre ellas se encuentran: *Weissella confusa*, *W. halotolerans*, *W. hellenica*, *W. kandleri*, *W. minor*, *W. paramesenteroides*, *W. thailandensis*, *W. viridescens*, *W. cibaria* y *Weissella* sp.<sup>2</sup>.

Algunos de estos géneros producen bacteriocinas que son definidas como péptidos producidos para matar o inhibir el crecimiento de bacterias relacionados con las especies que las producen. Se les ha puesto un especial interés a estas sustancias, como una alternativa de preservadores de alimentos. Se han descritos bacteriocinas relacionadas con especies del género *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Leuconostoc*; sin embargo rara vez se han reportado bacteriocinas producidas por *Weissella*<sup>29</sup>.

Los aspectos más importantes en el estudio de las bacteriocinas, son la producción y purificación. Es común que la producción de bacteriocinas sea muy baja y los medios de cultivo usados comúnmente sean complejos para la producción de las mismas e interfieran en su purificación. A veces, todos los ingredientes de un medio no son necesarios para la producción de bacteriocinas, por lo que, la optimización de las condiciones de crecimiento es muy importante para mejorar la producción de bacteriocinas<sup>24</sup>.

### **I.3 BACTERIOCINAS**

En las últimas décadas se ha puesto mucha atención en la aplicación de las bacteriocinas como un bioconservador de alimentos, y se han realizado diversos estudios para identificarlas y darles un uso como inhibidores de amplio espectro, estables a los tratamientos térmicos y las variaciones de pH, todo debido a su propiedad inocua de ser degradadas por proteasas en el tracto gastrointestinal<sup>19</sup>.

Las bacteriocinas son péptidos pequeños sintetizados en el ribosoma, de 20 a 60 residuos y liberados de forma extracelular, de tal forma que puedan llevar a cabo la

actividad bactericida o bacteriostática y se clasifican en base a sus características bioquímicas<sup>12,24</sup>. Biológicamente, se pueden definir como proteínas activas o complejos de proteínas (agregados proteicos, lipopolisacáridos, glicoproteínas, etc.) con actividad antimicrobiana hacia las bacterias Gram positivas y en especial hacia las especies con las que están estrechamente relacionadas<sup>14,23</sup>.

En 1999, Caplice y Fitzgerald las definieron como, productos primarios producidos extracelularmente o productos modificados de la síntesis ribosomal bacteriana, los cuales pueden tener un espectro, relativamente estrecho, en la actividad bactericida<sup>4</sup>. Sin embargo, existe una excepción a la regla, y es que Jamuna y Jeevaratnam reportaron en 2004, actividad antagonista hacia algunas especies de bacterias Gram negativas, como: *Aeromonas hydrophilus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp* y *Vibrio parahemolyticus*<sup>15</sup>.

El blanco molecular de las bacteriocinas es la membrana citoplasmática, por lo que en bacterias Gram negativas es más difícil su acción debido a que estos organismos poseen una membrana interna de fosfolípidos y la externa de lipopolisacáridos complicando su actividad antagonista sobre ellas, ya que esta membrana les confiere una barrera de protección y sólo son activas contra algunas Gram positivas. Sin embargo, las cepas mutantes o protoplastos de las bacterias Gram negativas son sensibles a la acción de las bacteriocinas después de estar expuestas a un estrés subletal, como el calor, la congelación o descongelación, situaciones en las cuales membrana externa se daña y permite el paso de las bacteriocinas a la membrana citoplasmática, lo que da un aumento de la sensibilidad<sup>3</sup>.

### I.3.1 Clasificación de bacteriocinas

Jumriangrit en 2004, cita una clasificación hecha por Klaenhammer y modificada por Nes *et al.* en 1999, donde las bacteriocinas se dividen en cuatro clases, sin embargo y de acuerdo con lo reportado por Monroy *et al.* en 2009, se puede agregar una quinta clase:

Cuadro 1. Clasificación de Bacteriocinas		
Clase	Tamaño (kDa)	Características y subclases
I	<5	Péptidos producidos en el ribosoma, sometidos a una gran modificación después de la traducción, pequeños péptidos que contienen lantionina y $\beta$ -metil lantionina.
II	<10	Son péptidos de bajo peso molecular, termoestables, formados

		únicamente por aminoácidos modificados, sintetizados en el ribosoma como péptidos inactivos y entran en función por el corte post-traducción en el N-terminal del péptido líder. IIa. Péptidos simples anti-listeria que contienen la secuencia de aminoácidos YGNGV cerca del N-terminal. IIb. Bacteriocinas de dos péptidos. IIc. Péptidos Thiol activados (necesitan reducir la cisteína para su actividad).
III	>30	Proteínas de alto peso moléculas y termolábiles.
IV		Complejo de bacteriocinas que llevan restos de lípidos o carbohidratos.
V		Bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente.

### I.3.2 Bacteriocinas producidas por *Weissella*

En estudios recientes, cuando se caracteriza a las poblaciones de bacterias ácido lácticas asociadas con alimentos tradicionales fermentados, se ha encontrado que la mayoría de estos alimentos contienen especies del género *Weissella*<sup>2</sup>.

Se han aislado nuevas especies del género *Weissella* en alimentos fermentados; en embutidos fueron aisladas cepas de *Weissella hellenica*, *Weissella kimchii* (posterior sinónimo heterotípico de *W. cibaria*) y *W. koreensis* fueron aisladas de *kimchi* (plato típico de la cocina coreana), y las cepas *W. thailandensis* fueron aisladas de pescado fermentado. La excepción fueron las cepas de *W. soli*, que se aislaron de suelo, y algunas cepas de *W. cibaria* que fueron aisladas de alimentos fermentados y muestras clínicas<sup>8</sup>. *W. confusus* también ha sido aislada de muestras humanas y animales<sup>11,31</sup>. *W. paramesenteroides* es una de las especies más predominantes en los vegetales frescos y también juega un papel importante en la primera fase de fermentación del silaje. *W. halotolerans* y *W. viridescens* han sido comúnmente asociados con la carne o productos cárnicos, mientras que el hábitat natural de *W. kandleri* se desconoce. Las cepas utilizadas para la descripción taxonómica de *W. minor* fueron aisladas de los restos de las máquinas de ordeña<sup>2</sup>.

En 2008, De Bruyne y colaboradores, propusieron una nueva especie: *Weissella ghanensis* aislada de un fermento de granos de cacao de Ghana, siendo positiva a la formación de ácido a partir de celobiosa, fructosa, maltosa, salicina, sucrosa y trehalosa, hidrolizó la esculina, formó amoniaco a partir de arginina y se encontró un contenido de G + C en un 40%<sup>8</sup>.

Chavasirikunton *et al.*, 2006, encontraron que algunas BAL aisladas de embutidos fermentados tropicales podían producir nuevas bacteriocinas con propiedades adecuadas para su adaptación a un lugar tropical. Ya que particularmente el clima tropical es un ambiente óptimo para la multiplicación celular, llevando a tomar conciencia sobre la necesidad de bioconservadores para alimentos en este tipo de áreas. Ellos reportaron actividad tipo bacteriocinas en *W. confusa* y en *Pediococcus acidilactici* hacía *Bacillus cereus*, indicando que la actividad antagonista de *Pediococcus* sp., es común, no así la de *Weissella* sp. hacía el mismo. Encontraron que las bacteriocinas producidas por ambas cepas se pueden aplicar en un amplio rango de pH, de 4 a 6, sin embargo a pesar de que su estabilidad disminuye al aumentar la temperatura, su actividad se mantiene a la temperatura del proceso de pasteurización<sup>6</sup>.

Srionnual *et al.* en 2007 encontraron, que *W. cibaria* 110 producía una bacteriocina activa contra bacterias Gram positivas, a la que llamaron weissellicin 110, con actividad antagonica hacía algunas especies de *Lactobacillus* sp., *Weissella* sp. y *Leuconostoc* sp; pero sin efecto contra *Listeria monocytogenes*, lo cual limita alguna aplicación potencial hacía los alimentos fermentados. La sensibilidad hacia proteinasa K y tripsina, demostraron su naturaleza proteica<sup>29</sup>.

Vallejo *et al.* en el 2009, encontraron sustancias tipo bacteriocinas (STB) termoestables, indicando que son péptidos de bajo peso molecular con actividad específica contra *L. monocytogenes*, propiedades que permitirían incluirlas dentro del grupo de bacteriocinas clase I o II.<sup>30</sup> Al igual que Moracanin *et al.* quienes aislaron una bacteriocinas de *L. sakei* I-154 con una actividad antimicrobiana significativa hacía *L. monocytogenes* NCTC 10527; donde al aumentar la temperatura aumentaba el efecto antilisteria<sup>22</sup>.

### **I.3.3 Modo de acción de las bacteriocinas**

La mayoría de las bacteriocinas tienen un efecto bactericida y solo pocas se han reportado con actividad bacteriostática, como leucocin A-UAL 187, leucocin A, lactocin 27 y leucocin S<sup>16,26</sup>.

Un modo común de la actividad de las bacteriocinas es por la formación de poros en la membrana citoplasmática, y se cree que esto ocurre a través del mecanismo formador de poros ("barrel-stave"). Este modelo sugiere que el péptido inicialmente se acumula en la superficie de la membrana a través de interacciones iónicas con los grupos de fosfolípidos, la presencia de estos péptidos dan como resultado un adelgazamiento significativo de la membrana en estas regiones, a causa del desplazamiento de los fosfolípidos; las moléculas de adoptan una orientación transmembranal, formando un poro en ésta, provocando la lisis celular<sup>26</sup>.

El poder que ejercen las bacteriocinas sobre otros microorganismos patógenos tiene distintos comportamientos, es decir, algunos microorganismos pueden ser sensibles, mientras que otros son resistentes a la acción de estos compuestos, incluso una cepa que parece ser sensible puede tener células que presenten resistencia a la acción de la bacteriocinas<sup>21</sup>. El campo de acción de las bacteriocinas se relaciona con el contenido de cistina y de acuerdo a ello, se han establecido tres grupos<sup>5</sup>:

- a) bacteriocinas con un estrecho intervalo de acción, restringido a microorganismos de la misma especie;
- b) bacteriocinas con un intervalo intermedio que inhibe bacterias lácticas y algunas bacterias Gram positivas; y
- c) bacteriocinas con amplio intervalo de acción, las cuales inhiben una amplia variedad de Gram positivas.

## II. JUSTIFICACIÓN

En años recientes se ha descrito que dentro de las BAL que forman parte de la microbiota del hombre y alimentos se encuentra el género *Weissella*, del cual se han identificado más de 18 especies; las cuales, se dice, tienen un papel importante en la industria de los alimentos por la producción sustancias tipo bacteriocinas, las cuales tienen potencial biotecnológico como bioconservador reconocido a nivel mundial.

Dada la importancia que está teniendo este género, se dio a la tarea de su búsqueda en productos hortícolas, teniendo hasta el momento la identificación bioquímica de aislados pertenecientes a *Weissella* sp. Lo que hace necesario confirmar el género mediante la amplificación del gen 16S RNArribosomal y conocer si éstas, tienen características de BAL productoras de sustancias tipo bacteriocinas.

### **III. HIPÓTESIS**

1. Sí los aislados identificados fenotípicamente como *Weissella* sp se confirman con iniciadores específicos entonces se corroborará el género de las cepas provenientes de hortalizas.
2. Sí las cepas identificadas como *Weissella* producen sustancias tipo bacteriocinas entonces se podrá considerar que tiene una aplicación biotecnológica.

## IV. OBJETIVOS

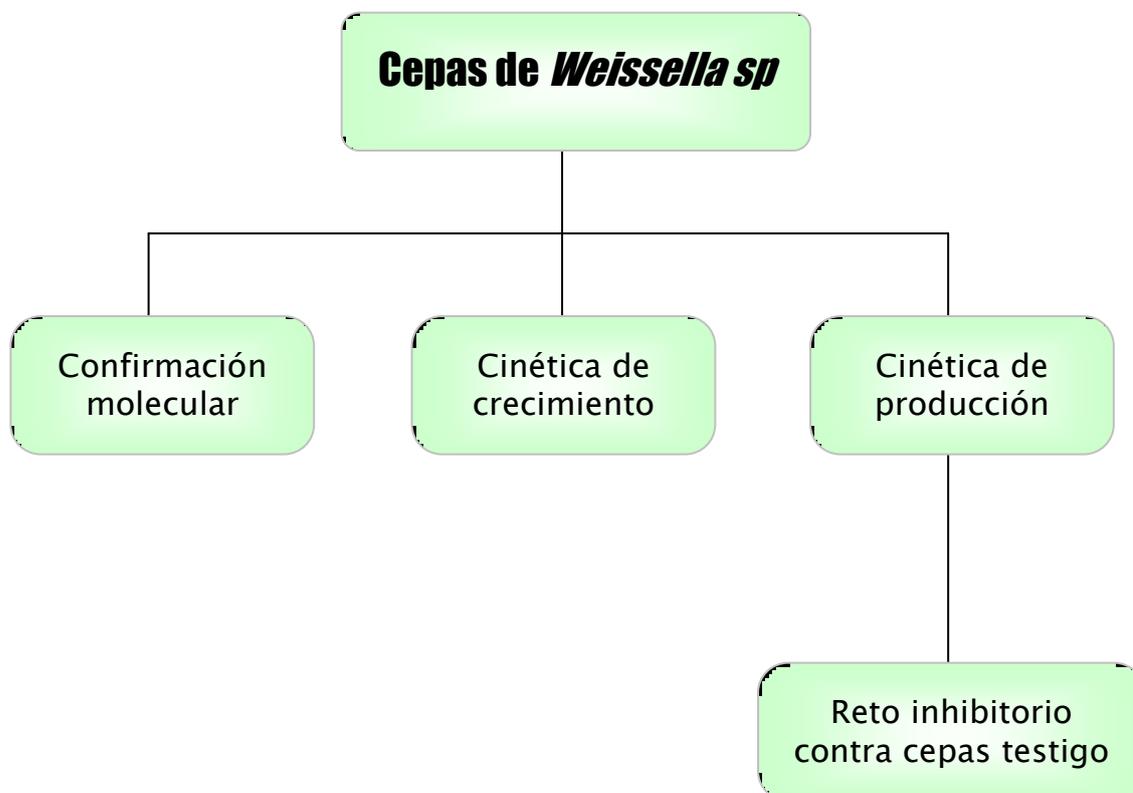
### GENERAL

- Tipificar las cepas del género *Weissella* aisladas de productos hortícolas, determinar la cinética de crecimiento y el tiempo de producción de las sustancias tipo bacteriocinas.

### ESPECÍFICOS

- Identificar mediante la secuencia del gen 16S RNA ribosomal las cepas de *Weissella* sp aisladas de hortalizas.
- Elaborar cinéticas de crecimiento y producción de las sustancias tipo bacteriocinas de las cepas de *Weissella* sp.

## V. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



## VI. MATERIALES Y METODOS

### VI.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se usaron 2 cepas de *Weissella* sp aisladas de hortalizas (coles de Bruselas), obtenidas de la Central de Abastos de la Ciudad de México.

Los microorganismos que se usaron en el reto microbiano se muestran en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Cepas testigo que se utilizarán

<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115
<i>Listeria monocytogenes</i>	Aislado clínico
<i>E. coli</i>	
<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 700728
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Salmonella</i> Typhi	ATCC 6532

### VI.2 MÉTODOS

#### VI.2.1 Obtención de DNA genómico

Las cepas se sembraron en caldo MRS (Man Rogosa Sharpe) y se incubaron a 37°C durante 24 horas en tensión parcial de CO<sub>2</sub> al 5%. Para obtener el DNA se empleó el sistema Wizard® Genomic DNA Purification, de la casa comercial PROMEGA, usando el protocolo indicado por el proveedor<sup>5</sup>.

#### VI.2.2 Condiciones para la amplificación del gen 16S del RNA ribosomal

Se tomarán para la amplificación del gen 16S del RNA ribosomal los iniciadores específicos reportados en la bibliografía mostrados en la cuadro 3, iniciadores reportados por Forney *et al.*, en 2004.

<b>Cuadro 3.</b> Condiciones de reacción para la identificación de las cepas aisladas		
<i>Iniciadores</i>		<i>Referencia</i>
<b>E9F</b>	F-5' GAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'	Forney <i>et al.</i> ,2004
<b>E939R</b>	R-5' CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC -3'	

Desnaturalización inicial	94 °C/ 2 min
Desnaturalización	94 °C/ 30 seg

Alineamiento	55 °C/ 30 seg
Extensión	72 °C/ 30 seg
Extensión final	72 °C/5 min
Número de ciclos	30
Tamaño del amplificado	930 pb

### VI.2.3 Amplificación de los genes mediante la técnica de PCR

Se preparó la mezcla de reacción con: 34.95  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril, 5  $\mu\text{L}$  de regulador 10 $\times$  (200 mM Tris-HCl pH 8.4 y 500 mM KCl), 2.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50mM, 0.25  $\mu\text{L}$  de la mezcla de dNTP (10 mM), 2.5  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (1 nM), 0.3  $\mu\text{L}$  de *Taq* polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ ) y 2  $\mu\text{L}$  de la solución que contiene el ADN (aproximadamente 100 ng). El volumen total de la mezcla de reacción fue de 50  $\mu\text{L}$ . Las reacciones se hicieron en un termociclador SelectCycler de la casa comercial Select BioProducts. Las condiciones de los ciclos, tiempos y temperaturas utilizados para cada gen serán determinadas con base en los iniciadores diseñados. Posteriormente, se prepararon geles de agarosa al 1% (p/v). Se mezcló 4  $\mu\text{L}$  del producto de PCR con 1.5  $\mu\text{L}$  del regulador de carga [azul de bromofenol (0.25%), sacarosa (40%) y xileno-cianol (0.25%)] y 9  $\mu\text{L}$  de agua. Las electroforesis se desarrollaron utilizando regulador Tris-Acido acético glacial-EDTA (TAE), mediante la aplicación de 121 V durante una hora. Como referencia, se empleó un marcador de talla molecular de 100 pb (Invitrogen®).

La tinción de los geles se realizó con una solución de bromuro de etidio a una concentración final de 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los geles se observaron en un transiluminador Gel Doc 2000 (Bio Rad®) que emite luz a una longitud de onda de 302 nm y se digitalizaron mediante en el programa QuantityOne (BioRad®).

### VI.2.4 Purificación del producto de PCR a partir de geles de agarosa

Para la purificación de las bandas a partir de un gel de agarosa para su posterior secuenciación se usó el sistema GE PCR Purification Kit, de la casa comercial General Electric.

### VI.2.5 Análisis bioinformático

Se analizó con el paquete DNASTAR® versión 7.1 de Lasergene, el programa Seaview 4.32 y usando las bases de datos GenBank, y el algoritmo BLAST del sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> de las secuencias del gen 16S RNA ribosomal para su identificación.

### **VI.2.6 Cinética de crecimiento y de producción de bacteriocinas**

Se sembraron las cepas por medio de la técnica de interpolación de matraces con 250 mL de medio de cultivo caldo MRS, se sembraron 0.1mL de las cepas 1 y 2, respectivamente, y cada 18 hrs se realizó un pase a un nuevo matraz, esto con la finalidad de que los microorganismos se adaptaran a los sustratos del medio de cultivo.

Posteriormente, se resembraron en tubos con 5mL de medio MRS cada uno etiquetado para obtener la muestra cada dos horas por 48 hrs y por triplicado. Se incubaron en condiciones de CO<sub>2</sub> al 5% a 27° C. A cada muestra se le midió la absorbancia en un espectrofotómetro de masas a una longitud de onda de 600 nm.

### **VI.2.7 Determinación de la actividad antimicrobiana en el sobrenadante de las BAL**

Se sembraron las cepas de bacterias lácticas en caldo MRS, incubando a 37°C, durante 24 horas en una atmósfera parcial de CO<sub>2</sub>. Los cultivos se tomaron en la fase estacionaria y se centrifugaron a 3500 rpm/15 min. Se decantó el sobrenadante en tubos estériles. Se sometieron a tratamiento térmico a 85°C/10 min, para evitar la interferencia del peróxido de hidrógeno. El sobrenadante libre de células se ajustó a un pH de 5.6 con NaOH 4.5 M.

Se filtró el sobrenadante mediante una jeringa acoplada a un porta filtros equipado con una membrana de nitrocelulosa estéril con poro de 0.22 µm. Se recolectó el sobrenadante en viales estériles y se guardaron a -20°C, hasta su utilización.

### **VI.2.8 Ensayo de inhibición**

Una vez obtenido el extracto crudo se procedió a probar la inhibición en agar. En cajas Petri se vaciaron 20 mL de agar Mueller-Hinton para formar la base y se dejó solidificar. En tubos con 10 mL de agar blando, fundido y mantenido a 45°C se adiciono la cepa testigo a probar ajustando su concentración bacteriana a 3x10<sup>8</sup> UFC/mL. Se mezcló y se vació el contenido de los tubos sobre las placas, dejándolas solidificar. Se colocaron las torres de acero inoxidable en cada caja de Petri. Se adicionaron 100 µL de cada uno de los sobrenadantes crudos y neutralizados obtenidos anteriormente. Se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se midió el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento de cada una de las cepas de referencia.

## VII. RESULTADOS

### VII.1 Amplificación del gen 16S del RNA ribosomal y análisis bioinformático.

Los resultados obtenidos utilizando los iniciadores de Forney indican que las cepas aisladas de hortalizas pertenecen al género *Weissella*, con un amplificado de 930 pb (figura 2) y un porcentaje de identidad de 96% para el género en ambas cepas (figura 3).

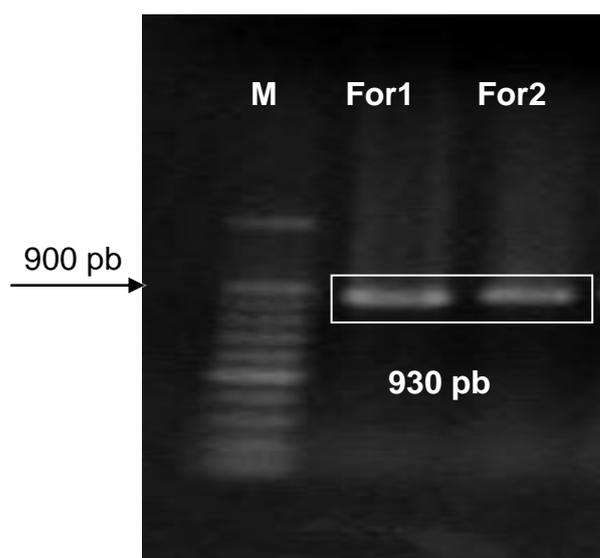


Figura 2. Electroferograma del producto amplificado del gen 16S del RNA ribosomal con los iniciadores propuestos por Forney *et al.* 2004. M – Marcador de talla molecular de 100 pb. For1, For2 cepas de *Weissella* sp.

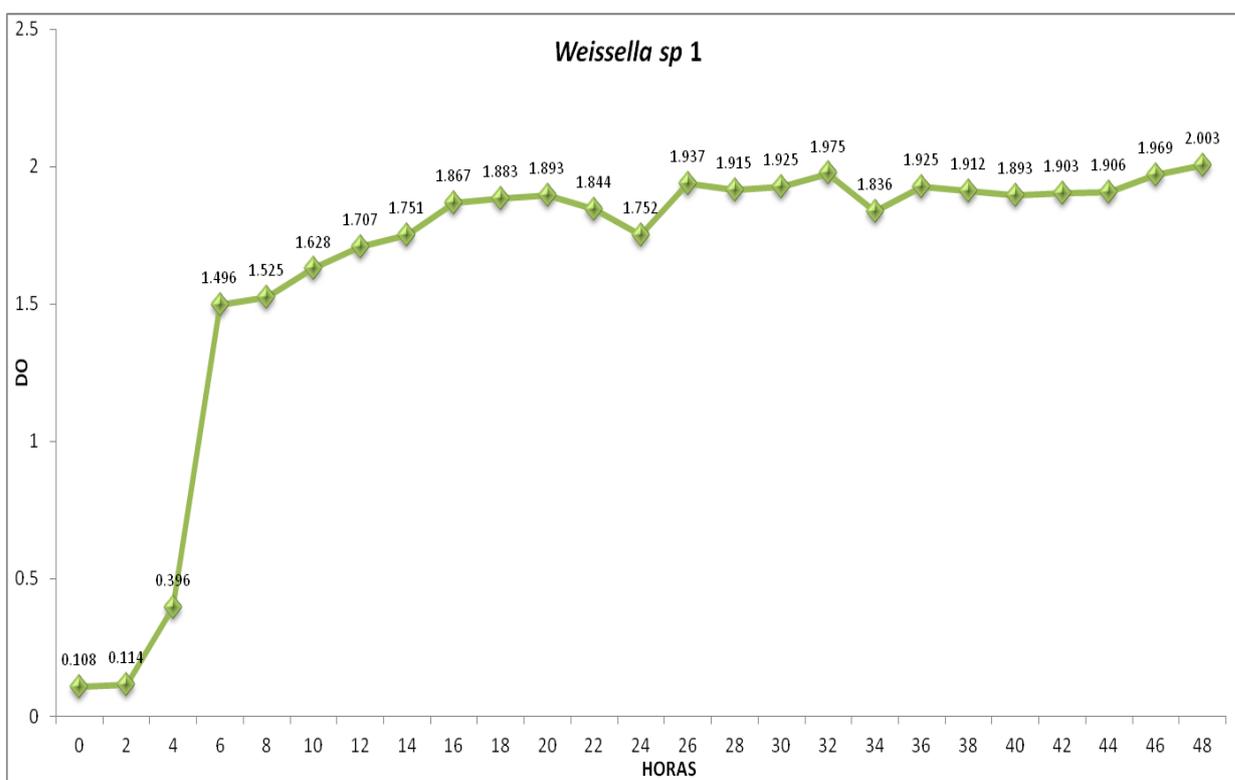
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">EU267320.1</a>	Uncultured <i>Weissella</i> sp. clone M186 16S ribosomal RNA gene, parti	669	669	99%	0.0	96%	
<a href="#">GU223369.1</a>	<i>Weissella</i> confusa strain YSY-M12 16S ribosomal RNA gene, partial	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">GU223368.1</a>	<i>Weissella</i> confusa strain YSY-M5 16S ribosomal RNA gene, partial se	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">GU138616.1</a>	<i>Weissella</i> cibaria IMAU:10288 16S ribosomal RNA gene, partial seq	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">GU138615.1</a>	<i>Weissella</i> cibaria IMAU:10287 16S ribosomal RNA gene, partial seq	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">GU138614.1</a>	<i>Weissella</i> confusa IMAU:10286 16S ribosomal RNA gene, partial sec	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">GU138608.1</a>	<i>Weissella</i> confusa IMAU:10280 16S ribosomal RNA gene, partial sec	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">GU138603.1</a>	<i>Weissella</i> cibaria IMAU:10275 16S ribosomal RNA gene, partial seq	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">GU138599.1</a>	<i>Weissella</i> confusa IMAU:10271 16S ribosomal RNA gene, partial sec	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">GU138598.1</a>	<i>Weissella</i> cibaria IMAU:10270 16S ribosomal RNA gene, partial seq	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">GU138596.1</a>	<i>Weissella</i> confusa IMAU:10268 16S ribosomal RNA gene, partial sec	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">GU138592.1</a>	<i>Weissella</i> confusa IMAU:10264 16S ribosomal RNA gene, partial sec	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">GU138580.1</a>	<i>Weissella</i> cibaria IMAU:10252 16S ribosomal RNA gene, partial seq	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">GU138579.1</a>	<i>Weissella</i> cibaria IMAU:10251 16S ribosomal RNA gene, partial seq	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">GU138573.1</a>	<i>Weissella</i> confusa IMAU:10245 16S ribosomal RNA gene, partial sec	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">GU138572.1</a>	<i>Weissella</i> cibaria IMAU:10244 16S ribosomal RNA gene, partial seq	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">GU138571.1</a>	<i>Weissella</i> cibaria IMAU:10243 16S ribosomal RNA gene, partial seq	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">GU138554.1</a>	<i>Weissella</i> cibaria IMAU:10226 16S ribosomal RNA gene, partial seq	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">GU138547.1</a>	<i>Weissella</i> cibaria IMAU:10219 16S ribosomal RNA gene, partial seq	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">GU138518.1</a>	<i>Weissella</i> confusa IMAU:10190 16S ribosomal RNA gene, partial sec	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">AB510757.1</a>	<i>Weissella</i> cibaria gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, str	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">AB510754.1</a>	<i>Weissella</i> cibaria gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, str	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">AB510747.1</a>	<i>Weissella</i> cibaria gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, str	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">AB510746.1</a>	<i>Weissella</i> cibaria gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, str	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">AB510745.1</a>	<i>Weissella</i> cibaria gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, str	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">AB510744.1</a>	<i>Weissella</i> cibaria gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, str	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">GQ073545.1</a>	Uncultured bacterium clone nbw209h07c1 16S ribosomal RNA gene,	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">GQ070513.1</a>	Uncultured bacterium clone nbw235b07c1 16S ribosomal RNA gene,	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">FJ429988.1</a>	<i>Weissella</i> cibaria strain C2-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	665	665	99%	0.0	96%	
<a href="#">FJ429987.1</a>	<i>Weissella</i> cibaria strain C2-32 16S ribosomal RNA gene, partial seq	665	665	99%	0.0	96%	

Figura 3. BLAST utilizando la secuencia obtenida del gel. Se confirma el género *Weissella* en las cepas aisladas de coles de Bruselas, no así la especie.

## VII.2 Cinética de crecimiento y de producción de bacteriocinas.

### VII.2.1 *Weissella sp. 1.*

En la cinética de crecimiento *Weissella sp 1*, la fase Lag duro dos horas y tuvo una fase exponencial de entre 2 y 6 horas (gráfica 1). La actividad de las sustancias tipo bacteriocina fue detectada a las dos horas de crecimiento. Encontrando que las cepas de *L. monocytogenes* presentaban más sensibilidad que el resto de las cepas probadas. (cuadro 4; figuras 4 y 5).



Gráfica 1. Cinética de Crecimiento de *Weissella sp. 1*

**Cuadro 4. Diámetro de inhibición de las STB (mm).  
Cepa: *Weissella sp.* 1**

<b>TIEMPO (horas)</b>	<b><i>S. Typhi</i></b>	<b><i>S. aureus</i></b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>E. coli</i> O157:H7</b>	<b><i>L. monocytogenes</i></b>	<b><i>L. monocytogenes</i> aislado clínico</b>
2	0.6	0.5	0.2	0.2	1.1	1.2
4	0.6	0.6	0.2	0.3	1.2	1.2
6	0.7	0.6	0.3	0.4	1.2	1.2
8	0.7	0.6	0.3	0.4	1.2	1.2
10	0.8	0.6	0.3	0.4	1.2	1.2
12	0.9	0.6	0.4	0.5	1.2	1.3
14	0.4	0.7	0.5	0.5	1.3	1.3
16	0.4	0.7	0.5	0.5	1.3	1.3
18	0.5	0.7	0.5	0.5	1.2	1.4
20	0.5	0.7	0.5	0.5	1.2	1.4
22	0.5	0.7	0.5	0.5	1.2	1.2
24	0.5	0.6	0.5	0.5	1.2	1.2

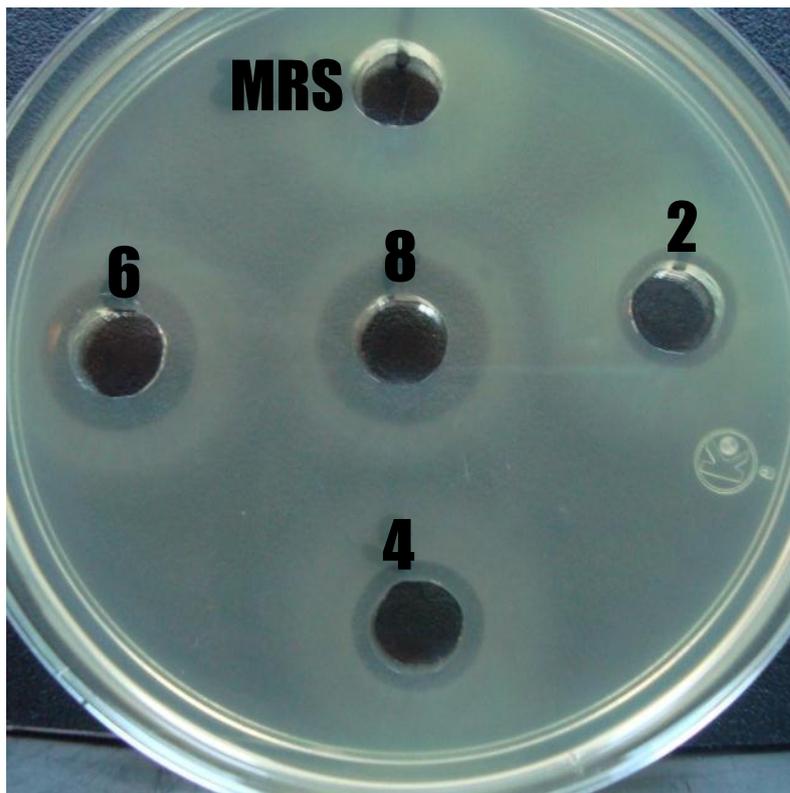


Figura 4. Halos de inhibición de *Weissella* sp. 1 en *L. monocytogenes*. Muestras tomada a las 2hrs con un halo de inhibición de 1.1cm, las muestras tomadas a las 4, 6 y 8hrs presentan inhibición con un halo de 1.2cm.

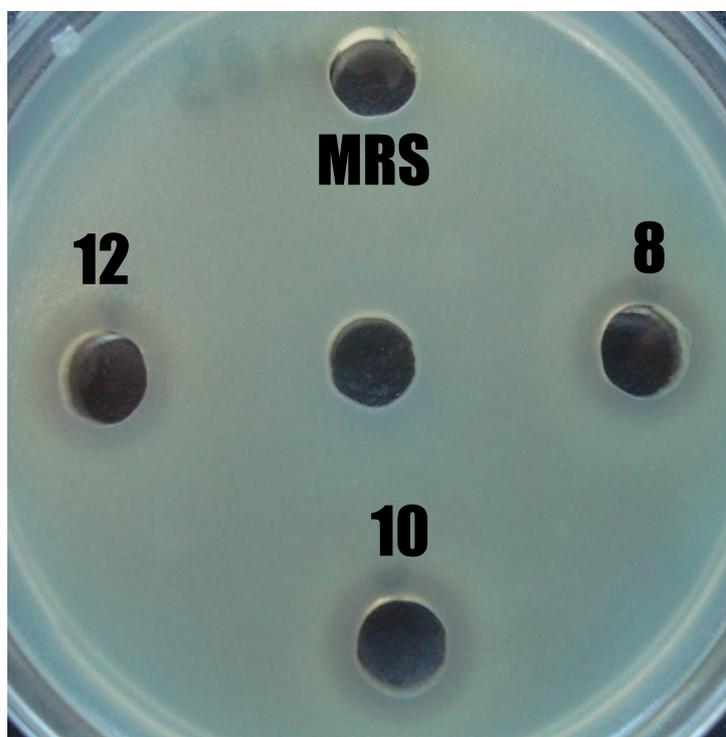
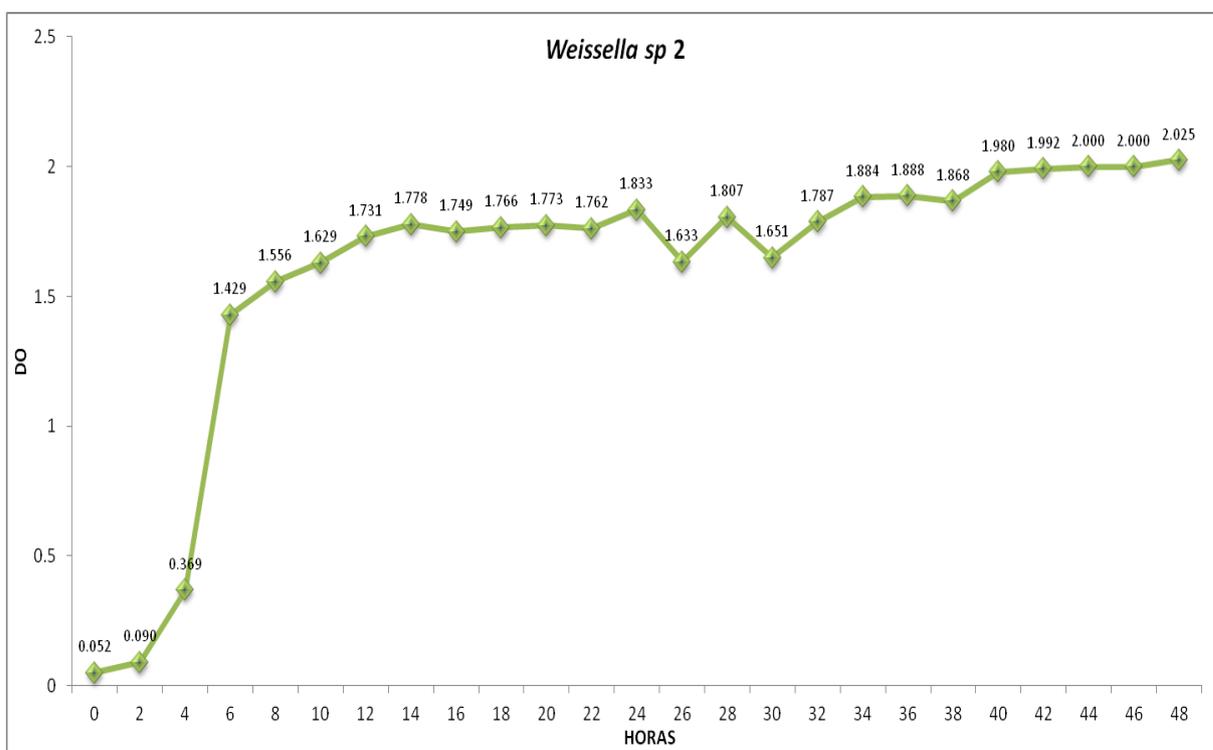


Figura 5. Halos de inhibición de *Weissella* sp. 1 en *S. Typhi*. MRS – control negativo. Muestras tomadas a las 8, 10 y 12hrs muestran una inhibición con un halo de 0.8, 0.7 y 0.9cm respectivamente.

### VII.2.2 *Weissella sp. 2.*

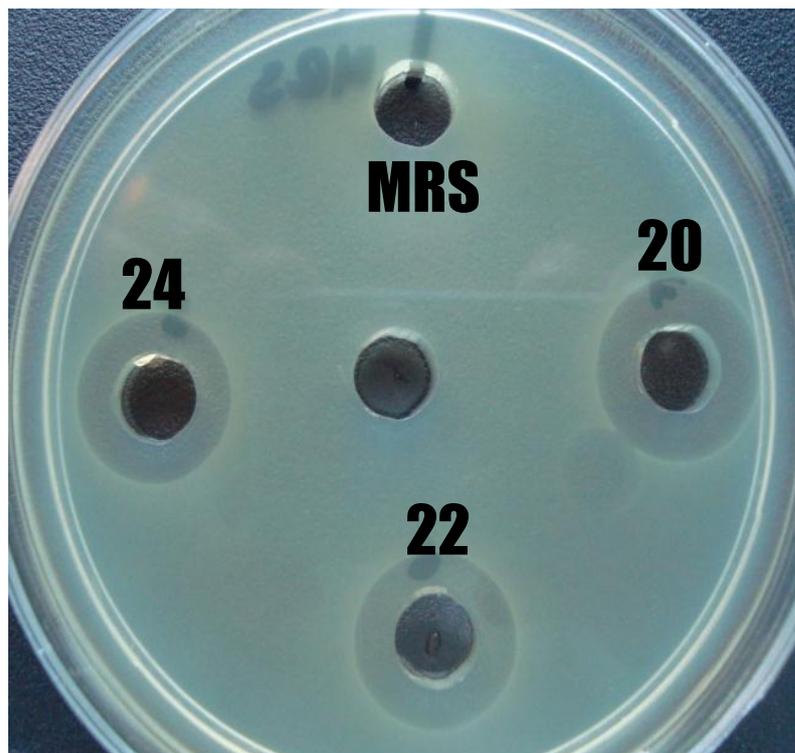
Para la cepa de *Weissella sp. 2*, se encontró una fase lag de dos horas y una fase exponencial de hasta 8 horas, (gráfica 2); en el caso de los halos de inhibición se detectó actividad antagónica a partir de las dos horas de crecimiento, al igual que en la cepa denominada *Weissella sp. 1*. Las cepas de *L. monocytogenes* presentaron mayor susceptibilidad a las STB, en comparación con el resto de las cepas probadas, especialmente sobre *S. Tiph*. (cuadro 5; figuras 6 y 7).



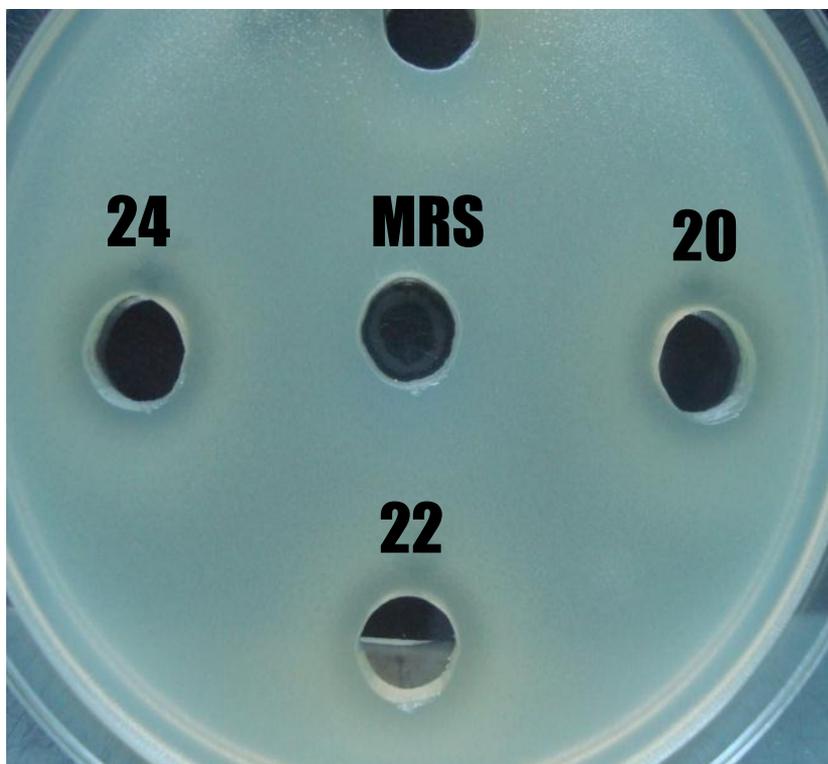
Gráfica 2. Cinética de Crecimiento de *Weissella sp. 2.*

**Cuadro 5. Diámetro de inhibición de las STB (mm).  
Cepa: *Weissella sp. 2***

<b>TIEMPO (horas)</b>	<b>S. Typhi</b>	<b>S. aureus</b>	<b>E. coli</b>	<b>E. coli O157:H7</b>	<b>L. monocytogenes</b>	<b>L. monocytogenes aislado clínico</b>
2	-	0.3	0.4	-	1.2	1.2
4	-	0.3	0.4	-	1.3	1.2
6	0.2	0.4	0.4	-	1.3	1.2
8	0.2	0.4	0.5	0.3	1.2	1.3
10	0.2	0.3	0.5	0.3	1.2	1.2
12	0.2	0.4	0.5	0.3	1.3	1.2
14	0.2	0.4	0.6	0.3	1.3	1.2
16	0.2	0.4	0.5	0.3	1.2	1.3
18	0.2	0.4	0.5	0.4	1.2	1.3
20	0.2	0.3	0.5	0.3	1.4	1.4
22	0.1	0.3	0.6	0.4	1.4	1.4
24	0.2	0.4	0.5	0.4	1.3	1.2



**Figura 6. Halos de inhibición de *Weissella sp. 2* en *L. monocytogenes*. MRS – Control Negativo. Muestras tomadas a las 20, 22 y 24 h, con un halo de inhibición de 1.4 para las dos primeras y 1.3 a las 24 h.**



**Figura 7. Halos de inhibición de *Weissella sp. 2* en *E coli*. MRS – control negativo. Muestras tomadas a las 20 y 24 hrs muestran un halo de inhibición de 0.5cm y a las 22hrs un halo de 0.6cm.**

## VIII. DISCUSIÓN

### VIII.1 Amplificación del gen 16S del RNA ribosomal y análisis bioinformático.

En este trabajo se demostró que las cepas aisladas de coles de Bruselas, pertenecen al género *Weissella*, teniendo un porcentaje de identidad del 96% como *Weissella* sp en la secuenciación de los amplificadores obtenidos para ambas (figura 1 y 2). En la actualidad la secuenciación del gen 16S del RNAr constituye un método rápido y eficaz de identificación bacteriana, en especial sobre cepas que mantienen una relación filogenética y bioquímica entre cepas de distinto género, como lo es el género *Weissella*. En concordancia con Rodicio *et. al.*, 2004, quienes señalan la identificación por 16S RNAr para bacterias cuyas características bioquímicas no se adaptan a algún género en específico, o cepas de especies comunes que exhiben un perfil bioquímico ambiguo.

Stackebrandt y Goebel, 1994, demostraron que cepas con menos del 97% de identidad en las secuencias de sus RNAr 16S es improbable que lleguen a estar relacionadas a nivel de especie.

Hasta el momento se han aislado nuevas especies del género *Weissella* provenientes de embutidos, pescado y alimentos fermentados; en especial de alimentos fermentados artesanalmente cuya materia prima son las hortalizas; por ejemplo el *kimchi* (plato típico de la cocina coreana) se han aislados cepas como *Weissella cibaria* y *W. koreensis*. La excepción han sido las cepas de *W. soli*, aislada del suelo, y *W. confusus*, aislada de muestras humanas y animales<sup>8,11,31</sup>. *W. halotolerans* y *W. viridescens* han sido comúnmente asociados con la carne o productos cárnicos, mientras que *W. minor*, ha sido aislada de los restos de las máquinas de ordeña. Estos datos corresponden con los resultados obtenidos en este trabajo; aunque también existen cepas del género *Weissella* de las cuales se desconoce su hábitat natural<sup>2</sup>.

Aun cuando se sabe que las cepas pertenecientes al grupo de BAL están presentes en toda la naturaleza, en especial en hábitats ricos en nutrientes, existen pocas investigaciones con reportes del aislamiento de cepas pertenecientes al género *Weissella* en productos de origen hortícola, de ahí que el interés en su búsqueda e identificación fuera en este tipo de productos.

De acuerdo con Björkroth *et al*; 2002, Dellagio *et al*; 1986 encontraron que *W. paramesenteroides* es una de las especies más comúnmente aisladas en los vegetales

frescos, además de tener un papel importante en la primera fase de fermentación del silaje.

## VII.2 Cinética de crecimiento y de producción de bacteriocinas.

Durante su multiplicación las bacterias ácido lácticas producen una gran variedad de productos terminales del metabolismo, entre ellas sustancias antagonistas, como el ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno, sustancias inhibitorias indefinidas, así como proteínas antimicrobiales o bacteriocinas<sup>17,24</sup>.

En este estudio se analizó la cinética de crecimiento donde se observó que para obtener mejores resultados se hizo una activación de los microorganismos dándoles tres pases consecutivos para mantenerlos metabólicamente activos. El tiempo de la fase lag fue corta y se observó que para la cepa de *Weissella* sp1 y *Weissella* sp2 el inicio de su fase exponencial parte de las dos horas aproximadamente. Estos resultados se asemejan a lo obtenido por Pal *et al.*, 2010, quienes reportaron el inicio de la fase exponencial entre 3 y 4 horas aproximadamente; y por Srionnual *et al.*, 2007, que encontraron una fase exponencial a partir de las 4 horas. Demostrando una similitud en los tiempos de inicio relacionado con el género *Weissella*.

La cinética de producción de sustancias tipo bacteriocinas (STB) obtenida de los sobrenadantes de las cepas de *Weissella* sp1 y *Weissella* sp2, se detectó a las dos horas de inicio, esto demostrado mediante el reto microbiano contra las cepas testigo. Los sobrenadantes probados tuvieron una mayor inhibición contra las cepas de *L. monocytogenes* ATCC 19115 y *L. monocytogenes* de aislado clínico, sugiriendo una mayor actividad antagónica contra estos microorganismos debido a que se encuentran relacionados filogenéticamente al género *Weissella*.

Las bacteriocinas ejercen su efecto bactericida, efectivamente, contra aquellos géneros con los que están relacionadas filogenéticamente, Morisset *et al.* 2004. Srionnual S. *et al.*, 2007, reportó que *W. cibaria* 110 producía una bacteriocina con efecto contra *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp. Y *Weissella* sp; asimismo en el 2010 Bernardino *et al.*, encontraron que *Weissella* sp. producía una STB contra *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* y *Listeria* sp; resultados que se encuentran relacionados con lo obtenido durante este estudio.

Para el resto de las cepas testigo se observó que en *S. aureus* y *S. Tiphly*, *E. coli* y *E. coli* O157:H7, la sensibilidad fue menor, especialmente sobre las especies Gram negativas (Cuadro 3, 4; Figura 4, 5, 6 y 7).

Pal *et al*, en el 2010, simplificaron el medio MRS, usado comúnmente para el cultivo de las BAL, para aumentar la producción de bacteriocinas producidas por *Weissella paramesenteroides* DFR-8, la cual produce una bacteriocina termoestable y un compuesto antimicrobiano que no tenía características de bacteriocina. Al modificar la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno, encontraron que la producción de la bacteriocina aumentaba en comparación con un medio no modificado<sup>20</sup>. En la actualidad se han aumentado este tipo de estudios para optimizar la producción de estas bacteriocinas.

Hasta el momento Chavasirikunton *et al.*, 2006, habían reportado la actividad de STB provenientes de *Weissella sp* contra *Bacillus sp*, mientras que Srionnual *et al*; 2007, tipificaron a weisselliecin 110 como una bacteriocina activa contra *Lactobacillus sp.*, *Weissella sp.* y *Leuconostoc sp*, pero sin actividad contra *Listeria monocytogenes*. Al igual que Lee, 2005, quien encontró que *W. kimchii* producía una STB activa contra patógenos del tracto vaginal.

La actividad que ejercen las STB y las bacteriocinas sobre otros microorganismos patógenos tiene distintos comportamientos, es decir, algunos microorganismos pueden ser sensibles, mientras que otros son resistentes a la acción de estos compuestos, incluso una cepa que parece ser sensible puede tener células que presenten resistencia a la acción de la bacteriocinas<sup>21</sup>.

Las bacteriocinas se pueden definir como proteínas biológicamente activas las cuales tienen acción bactericida o bacteriostática contra otros microorganismos; además de mostrar actividad antimicrobiana especialmente sobre las especies con las que están estrechamente relacionadas, regularmente microorganismos Gram positivos<sup>23,21</sup>. Sin embargo, Jamuna y Jeevaratnam reportaron en 2004, actividad antagónica proveniente de bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas hacia algunas especies de bacterias Gram negativas.

La acción de las bacteriocinas está determinada por la composición de la membrana citoplasmática, la estructura y la expresión de una proteína en función de la inmunidad, además de la composición química del medio ambiente. Recientemente se considera

también la existencia de las moléculas superficiales en la membrana de la célula blanco que permiten el acoplamiento con la bacteriocina producida por otra bacteria<sup>21</sup>.

Se han realizado diversos estudios para identificar bacteriocinas y STB producidos por BAL en general, y darles un uso como inhibidores, estables a los tratamientos térmicos y las variaciones de pH, gracias a su propiedad inocua de poder ser degradadas por proteasas en el tracto gastrointestinal. Es por ello que los resultados obtenidos en esta investigación, en conjunto con el resto de las investigaciones muestran el gran potencial que podría tener el género *Weissella*, así como sus metabolitos, como bioconservadores de alimentos, así como un método para la prevención y control de enfermedades en animales y humanos, entre otros.

## IX. CONCLUSIONES

- Las dos cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de hortalizas, pertenecen al género *Weissella*.
- La producción de sustancias tipo bacteriocinas producidas por las cepas se inicia a las dos horas de crecimiento.
- Las cepas de *L. monocytogenes* ATCC 19115 y *L. monocytogenes* aislado clínico, son más sensibles a las sustancias tipo bacteriocinas producidas por ambas cepas de *Weissella* que las cepas de *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli*, , *E. coli* O157:H7 y *S. Tiph*y ATCC 6532.

## X. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	TRIMESTRE		
	1	2	3
Purificación de las cepas	X		
Extracción de DNA y PCR	X	X	
Secuenciación del gen 16s RNA ribosomal	X	X	
Cinética de crecimiento		X	X
Cinética de producción de bacteriocinas		X	X
Análisis de resultados	X	X	X
Revisión bibliográfica	X	X	X
Escritura del proyecto tesis	X	X	X

## XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Bernardino-Varo L., S.K. Maya-Dueñas, G.E. Carmona-Ríos, E.I. Quiñones-Ramírez, C. Vázquez-Salinas. 2010. Identificación de bacterias lácticas de origen hortícola con producción de sustancias tipo bacteriocinas. En: XVII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. VI Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. VIII Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular. Acapulco, Gro.
2. Björkroth K.J., U. Schillinger, R. Geisen, N. Weiss, B. Hoste, W. H. Holzapfel, H. J. Korkeala & P. Vandamme. 2002. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 141–148.
3. Bromberg R., I. Moreno, C. Lopes-Zaganini, R.R. Delboni & J. De Oliveira. 2004. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. *Braz J Microbiol* 35: 137-144.
4. Caplice E. & G.F. Fitzgerald. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int J Food Microbiol* 50(1-2): 131-149.
5. Cintas L.M., M.P. Casaus, C. Herranz, I.F. Nes & P.E. Hernández. 2001. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *F Scn Tech Inter* 74: 281- 305.
6. Chavasirikunton V., S. Vatanyoopaisarn & C. Phalakornkule. 2006. Bacteriocin-like activity from *Weissella confusa* and *Pediococcus acidilactici* isolated from traditional thai fermented sausages. *Journal Of Culture Collections* 5: 64-72.
7. Cleveland J., T.J. Montville, I.F. Nes & M.L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* 71: 1-20.
8. De Bruyne K., N. Camu, K. Lefebvre, L. De Vuyst & P. Vandamme. 2008. *Weissella ghanensis* sp. nov., isolated from a isolated Ghanaian cocoa fermentation. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 2721–2725.

9. Ennahar S. & N. Deschamps. 2000. Anti-*Listeria* effect of enterocin A, produced by cheeseisolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *J Applied Microbiol* 88:449–457.
10. Feng G., G. Guron, J. Churey & R. Worobo. 2009. Characterization of Mundtacin L, a Class IIa Anti-*Listeria* Bacteriocin from *Enterococcus mundtii* CUGF08. *Appl Environ Microbiol* 75(17): 5708-5713.
11. Flaherty J.D., P.N. Levett, F.E. Dewhirst, T.E. Troe, J.R. Warren, & S. Johnson. 2003. Fatal Case of Endocarditis Due to *Weissella confusa*. *J Clin Microbiol* 41(5): 2237–2239.
12. Fontaine L. & P. Hols. 2008. The inhibitory spectrum of thermophilin 9 from *Streptococcus thermophilus* LMD-9 depends on the production of multiple peptides and the activity of BlpGSt, a Tiol-disulfide oxidase. *Appl Environ Microbiol* 74(4): 1102–1110.
13. Forney L., X. Zhou & C.J. Brown. 2004. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed King. *Microbiol* 7: 210–220.
14. Gervasio-Ortiz E.A., Navarro-Rodríguez A.E. 2009. Identificación y tipificación de bacterias ácido lácticas fermentadoras de queso de cincho expendido en mercados de venta fija en Chilpancingo, Gro. [tesis]. Chilpancingo: Universidad Autónoma de Guerrero.
15. Grajek W., A. Olejnik & A. Sip. 2005. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *Acta Biochim Pol* 52(3): 665–671.
16. Jamuna M. & K. Jeevaratnam. 2004. Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins. *J Gen Appl Microbiol* 50: 79–90.
17. Jeevaratnam K., M. Jamuna & A.S. Bawa. 2005. Biological preservation of foods- Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Indian J Chem Biotechnol* 4: 446-454.

18. Jumriangrit P. 2004. Characterization and purification of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* PMU33 strain from fermented fish products [master tesis]. Thailand: Mahidol University.
19. König H., J. Fröhlich. 2009. Lactic Acid Bacteria. In: König H, Uden G, Fröhlich J, editors. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Germany: Springer; p. 3-7.
20. Lee K.H., J.Y. Park, S.J. Jeong, G.H. Kwon, H.J. Lee, H.C. Chang, D.K. Chung, J.H. Lee, & J.H. Kim. 2007. Characterization of Paraplantaricin C7, a Novel Bacteriocin Produced by *Lactobacillus paraplantarum* C7 Isolated from *Kimchi*. J Microbiol Technol 17(2): 287–296
21. Lindgren S.W., W.J. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. Rev FEMS Microbiology 7: 149-163.
22. Monroy-Dosta M.C., T. Castro-Barrera, F.J. Fernández-Perrino, Mayorga-Reyes L. 2009. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. 73: 63-72.
23. Moracanin S.V., L. Turubatovic, M. Skrinjar & D. Obradovic. 2008. Influence of temperature and pH on anti-listerial activity of bacteriocin isolated from *Lactobacillus sakei* I 154. In: International Congress of Meat Science and Technology 54 (ICOMST 54);Cape Town, South Africa: 1-3.
24. Morisset D., J.M. Berjeaud, D. Marion, C. Lacombe & J. Frère. 2004. Mutational analysis of mesentericin Y105, an Anti-*Listeria* bacteriocin, for determination of impact on bactericidal activity, in vitro secondary structure, and membrane interaction. Appl Environ Microbiol 70(8): 4672–4680.
25. Pal A., K.V. Ramana, A.S. Bawa. 2010. Simplification and optimization of deMan Rogosa Sharpe (MRS) medium for enhanced production of bacteriocin by *Weissella paramesenteroides* DFR-8. J Food Sci Technol 47(3): 258-265.

26. Parada J.L., C. Ricoy-Caron, A. Medeiros & C.R. Soccol. 2007. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *J Braz arch biol technol* 50(3): 521-542.
27. Rodicio M.R. & M.C. Mendoza. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22 (4): 238-245.
28. Powell J.E. 2006. Bacteriocins and bacteriocin producers present in Kefir and Kefir grains [master tesis]. South Africa: Stellenbosch University.
29. Rouse S., F. Sun, A. Vaughan & D. Van Sinderen. 2007. High-Throughput Isolation of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria, with Potential Application in the Brewing Industry. *J Inst Brew* 113(3): 256–262.
30. Sakayori Y., M. Muramatsu, S. Hanada, Y. Kamagata, S. Kawamoto & J. Shima. 2003. Characterization of *Enterococcus faecium* mutants resistant to mundticin KS, a class IIa bacteriocin. *Microbiology* 149: 2901–2908.
31. Srionnual S., F. Yanagida, L. Li-Hsiu, H. Kuang-Nan & C. Yi-sheng. 2007. Weissellicin 110, a Newly Discovered Bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, Isolated from Plaasom, a Fermented Fish Product from Thailand. *Appl Environ Microbiol* 73(7): 2247–2250.
32. Vallejo M., N. Olivera, C. Sequeiros, E. Marguet. 2009. Actividad antilisteria de bacterias ácido lácticas aisladas de peces marinos. *Analecta Veterinaria* 29(2): 19-23.
33. Vela A.I., C. Porrero, J. Goyache, A. Nieto, B. Sánchez, V. Briones, M.A. Moreno & I. Domínguez. 2003. *Weissella confusa* Infection in Primate (*Cercopithecus mona*). *Rev Infect Dis* 9(10): 1307-1309.