

Departamento de Biotecnología

Estudio del efecto antimicrobiano de bacteriocinas del genero *Enterococcus*
y *Pediococcus* en la membrana celular de *Listeria innocua* ATCC33090.

TESIS

QUE PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD
EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Q.A. Luis Arturo Aguado Bautista

Directores: Dra. Yenizey Merit Álvarez Cisneros
Dra. Edith Ponce Alquicira

México, D.F. a 2 de Abril de 2013

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

Estudio del efecto antimicrobiano de bacteriocinas del genero *Enterococcus* y *Pediococcus* en la membrana celular de *Listeria innocua* ATCC33090.

Que presentó:

Q.A. Luis Arturo Aguado Bautista

Comité Tutorial:

Directores:

Dra. Yenizey Merit Álvarez Cisneros



Dra. Edith Ponce Alquicira



Lector:

M en B. Isadora Martínez Arellano



El presente trabajo 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.



A México, que siempre será grande, porque me ha podido brindar una educación de excelente calidad y me ha permitido conocer los lugares más hermosos y divertidos, así como grandes retos.

Porque son nuestras decisiones las que muestran lo que podemos llegar a ser. Mucho más que nuestras propias habilidades.

A mis padres Bibiana y Arturo, que siempre me han impulsado a hacer las cosas bien y me han ayudado en todo lo que han podido sin condición alguna y de quienes nunca dejare de aprender.

Porque el estudio y, en general, la búsqueda de la verdad y la belleza conforman un área donde podemos seguir siendo niños toda la vida.



Un enorme y especial agradecimiento a la UAM y a la UNAM por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de afinar gran parte de mi aprendizaje y descubrir el gran valor de la investigación para el desarrollo de la humanidad.

Un especial agradecimiento a la Dra. Edith por darme la oportunidad de seguir trabajando con ella y confiar en mí, brindándome su apoyo y su tiempo tan valioso, así como su conocimiento, consejo y las facilidades para trabajar adecuadamente.

A Yenizey, quien ahora es Dra. por darme la libertad de realizar el trabajo de esta tesis de posgrado, sin presiones, brindando sus valiosos consejos, compartiendo dudas y disfrutando de las reuniones, sesiones plenarias, así como su amistad. Grxs x ser mi mamá!!

A Isa, Luis, Izzy y Bren por ser tan divertidos y buenos amigos; aportándome nuevas ideas, realizando sesiones plenarias de excelente calidad, fiestas, congresos y tours; haciendo que el tiempo se metabolice poco a poco con un buen control de calidad. Venga el número mágico...

Agradezco a mis hermanos Oscar y Javi y amigos Belem, Fanny, Sandra, Martha, Axl, Hugo, Julio, Manuel, Andrea y Gaby Ann. Las grandes aventuras siempre fueron con ustedes, grandes anécdotas e impresionantes locuras y últimamente buenas fiestas.

A Ivonne, Mariana, Mariel, Edson, Sagrario y Brenda, por compartir muy buenos momentos, tener corazón azul y piel dorada (muy importante), pero sobre todo xq hacemos buen equipo para trabajar y bueno quien sabe... A Saúl y Giovanni, también por las buenas recomendaciones de Food& Beverages, música y observaciones de cosas lindas.

Eres más que una mujer, Suerte que en los cielos naciste, Tu sonrisa es un placer, En tu mirada la vida existe, Llenas de encanto mi día, Ahora que eres feliz.

A Monse, Susy y Dal por compartir conmigo su vida y ser mi conciencia analizando con detalle muchos problemas de la dulce vida.

RESUMEN

La utilización de productos biológicos para inhibir o destruir a microorganismos patógenos, implica un enfoque biotecnológico que forma parte del concepto de barreras antimicrobianas y que tiene como objetivo final la obtención de alimentos más seguros para el consumidor. Debido a que las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido usadas por siglos en la elaboración de un amplio número de alimentos fermentados, ellas son generalmente consideradas como GRAS (Generally Recognized As Safe) por lo que resultan ideales para su uso como bioconservadores o biocontroladores microbianos.

Desde el siglo 20 ha existido un gran interés por emplear cepas de *Enterococcus* y *Pediococcus* como cultivos iniciadores en la elaboración de productos cárnicos y lácteos fermentados, debido a que éstos contribuyen en la estabilidad del producto, en el desarrollo de las propiedades sensoriales específicas del producto final, además de su capacidad para producir bacteriocinas, entre otros compuestos bacteriostáticos; sin embargo antes de su posible aplicación en alimentos las cepas de *Enterococcus*, *Pediococcus* y sus bacteriocinas deben ser caracterizadas bioquímica y molecularmente. Por este motivo el objetivo de este trabajo, fue determinar el efecto de las bacteriocinas producidas por *Enterococcus faecalis* MXVK22, *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Pediococcus parvulus* MXVK133, sobre una cepa sensibilizada de *Listeria innocua* ATCC33090.

Las bacteriocinas fueron extraídas de cultivos de *E.faecium* MXVK29, *E.faecalis* MXVK22 y *P. parvulus* MXVK133, también se utilizó Nisina como control. Se les realizaron determinaciones de actividad antimicrobiana a los diferentes extractos; posteriormente se procedió a la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las bacteriocinas contra una carga microbiana de 7-8 log UFC/mL de *Listeria innocua* ATCC33090. Se adicionaron las diferentes bacteriocinas por separado en base a su CMI, contra la cepa sensible y se determinó la fuga del material intracelular, así como la evaluación de la capacidad de recuperación posterior a la exposición de las bacteriocinas.

Por otra parte las células sensibles fueron marcadas con diacetato de 5(6)-carboxifluoresceína (CFDA), para corroborar el flujo de material intracelular y fueron realizadas cinéticas por exposición a la bacteriocina, así como un recuento en placas de agar cuenta standard para determinar el efecto bacteriostático y finalmente se procedió a la observación de las células tratadas con las bacteriocinas en un microscopio electrónico de transmisión, para observar directamente el efecto causado.

Ninguna de las bacteriocinas aplicadas sobre *Listeria innocua* presento el mismo mecanismo de acción de la Nisina, ya que en todas las pruebas en las que fueron evaluadas, la Nisina fue la más eficiente, al causar la inactivación de las células de *Listeria*. Las tres bacteriocinas utilizadas causan la fuga del material intracelular así como del marcador, sin embargo la enterocina 29 fue la más eficaz de las tres que se evaluaron al poseer una actividad inhibitoria de 43.03 UA/ μ g de proteína y una CMI de 7.81 mg/mL, logrando una reducción de 1 a 2 ciclos logarítmicos de *Listeria*, mientras que la nisina logró una reducción de 5 a 6 ciclos logarítmicos cuando se usó su CMI de 0.78 mg/mL. A su vez la enterocina 29 logró que la cantidad de material intracelular fugado sea mayor respecto a la enterocina 22 y pediocina 133.

Por lo tanto, se concluye que el mecanismo de acción de las bacteriocinas producidas por *Enterococcus faecalis* MXVK22, *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Pediococcus parvulus* MXVK133 respectivamente, es del tipo IIa según la clasificación de Cotter *et al* realizada en el 2005.

ABSTRACT

The use of biological products to inhibit or destroy pathogens involves a biotechnological approach that is part of the concept of antimicrobial hurdles and aims eventually obtaining safer food for consumers. Because lactic acid bacteria (LAB) have been used to development of a wide range of fermented foods for centuries, they are generally regarded as GRAS (Generally Recognized As Safe), so they can use them as bio-conservatives or microbial biocontrols.

There has been a great interest for using *Enterococcus* and *Pediococcus* strains as starter cultures in the fermented dairy and meat products production since the 20th century, as they contribute to product stability, the development of final product specific sensory properties, also, their ability to produce bacteriocins, among other bacteriostatics compounds. However, the strains of *Enterococcus*, *Pediococcus* and their bacteriocins should be biochemical and molecularly characterized before a possible application in foods. Therefore, the aim of this study was to determine the effect of bacteriocins produced by *Enterococcus faecalis* MXVK22, *Enterococcus faecium* MXVK29 and *Pediococcus parvulus* MXVK133 on *Listeria innocua* ATCC33090 strain.

Bacteriocins were extracted from cultures of *E. faecium* MXVK29, *E. faecalis* MXVK22 and *P. parvulus* MXVK133 also Nisin was used as a control. The antimicrobial activity of bacteriocins and the minimum inhibitory concentration (MIC) were determined, against *Listeria innocua* ATCC33090 load of 7-8 log CFU / mL was measure. Likewise, different bacteriocins were separately added based on their MIC against sensitive strain and the leakage of intracellular material was quantified. Also, the post-exposure bacteriocins recovery ability of sensitive strains was evaluated.

Moreover, sensitive cells were labeled with diacetate 5 (6)-carboxyfluorescein (CFDA) in order to corroborate the intracellular material flow. Kinetics were performed by exposure the cell to the bacteriocin, as well as a standard account to determined bacteriostatic effect on

treated cells with the bacteriocin, finally the cells was observed in transmission electron microscope to perceived directly the effect caused.

None of the bacteriocins applied to *Listeria innocua* presented the same action mode of nisin, as in all the tests that were evaluated. Nisin was the most efficient to cause inactivation of *Listeria* cells in all treatments. The three bacteriocins used cause leakage of intracellular material and marker, however the enterocin 29 was the most effective of the three that were assessed to have an inhibitory activity of 43.03 AU / mg of protein and an MIC of 7.81 mg / mL, achieving a reduction of *Listeria* 1-2 log units, whereas nisin was a reduction of 5-6 log units when their MIC was used 0.78 mg / mL. Also the leaking intracellular material using the enterocin 29 was greater than enterocin 22 and pediocin 133.

Therefore, it was concluded that the action mechanism of bacteriocins produced by *Enterococcus faecalis* MXVK22, *Enterococcus faecium* MXVK29 and *Pediococcus parvulus* MXVK133 was type IIa as classified by Cotter *et al* conducted in 2005.

Índice General

Contenido.	Página
Dedicatorias.	3
Agradecimientos.	4
Resumen.	5
Abstract.	7
Índice General.	9
Índice de Tablas.	11
Índice de Gráficos.	12
Índice de Imágenes.	13
Capítulo 1. Introducción.	15
Capítulo 2. Justificación.	19
Capítulo 3. Revisión bibliográfica.	21
3.1 Enterocinas.	21
3.2 Pediocinas.	22
3.3 Clasificación.	22
3.4 Espectro antimicrobiano.	27
3.5 Mecanismo de acción.	27
Capítulo 4. Hipótesis.	30
4.1 Objetivo general.	30
4.2 Objetivos específicos.	30
Capítulo 5. Metodología.	31
5.1 Crecimiento de cepas.	32
5.2 Extracción de las bacteriocinas.	32
5.3 Determinación de la actividad inhibitoria.	33
5.3.1 Cinética de crecimiento del microorganismo sensible.	34
5.3.2 Concentración mínima inhibitoria.	35
5.4 Recuento después de la exposición a la bacteriocina.	35
5.5 Determinación por UV del flujo de material intracelular.	36

	Página
5.6 Capacidad de recuperación de las células expuestas a la acción de la bacteriocina.	36
5.7 Tinción de las células.	37
5.7.1 Determinación del flujo de carboxifluoresceína en células teñidas y expuestas a la bacteriocina.	37
5.7.2 Cinética de crecimiento de organismos sensibles en presencia de la bacteriocina.	37
5.8 Preparación de cepas para observación en microscopio electrónico de transmisión.	38
Capítulo 6. Resultados y discusión.	40
6.1 Determinación de la actividad inhibitoria.	40
6.2 Cinética de crecimiento de <i>Listeria innocua</i>	43
6.3 Concentración mínima inhibitoria.	44
6.4 Recuento en placa.	45
6.5 Determinación del flujo de material intracelular por UV.	46
6.6 Capacidad de recuperación de las células expuestas a la acción de la bacteriocina.	47
6.7 Tinción de las células.	49
6.8 Determinación del flujo de carboxifluoresceína en células teñidas y expuestas a la bacteriocina.	49
6.8.1 Cinética de crecimiento de organismos sensibles en presencia de la bacteriocina.	52
6.9 Micrografías.	56
Capítulo 7. Conclusiones.	75
Perspectivas.	76
Bibliografía.	77
Anexo A.	81
Anexo B.	82
Anexo C.	83

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Clasificación de bacteriocinas.	25
Tabla 2. Propuesta de clasificación de bacteriocinas.	26
Tabla 3. Cepas utilizadas y clasificación.	32
Tabla 4. Determinación de proteína en las bacteriocinas.	40
Tabla 5. Actividad inhibitoria de las bacteriocinas.	42
Tabla 6. Datos cinéticos de <i>Listeria innocua</i> ATCC33090.	44
Tabla 7. CMI de las bacteriocinas.	45
Tabla 8. Células viables después de ser tratadas con bacteriocinas.	45
Tabla 9. Absorbancia a 260nm del sobrenadante.	46
Tabla 10. Absorbancia $\lambda_{Ex}490nm$ y $\lambda_{Em}520nm$ de la carboxifluoresceína en células de <i>Listeria innocua</i> expuestas a las bacteriocinas.	50
Tabla 11. Fluorescencia de las células sensibles respecto al tiempo.	53

Índice de Gráficos

	Página
Gráfica 1. Determinación por espectrometría del material intracelular fugado.	47
Gráfica 2. Capacidad de recuperación de <i>Listeria innocua</i> con diferentes concentraciones de las bacteriocinas.	48
Gráfica 3. Absorbancia del marcador (CFDA) cuando se adicionan las diferentes bacteriocinas con el doble de la concentración de la CMI.	51
Gráfica 4. Absorbancia del marcador (CFDA) cuando se adicionan las diferentes bacteriocinas con la CMI.	51
Gráfica 5. Absorbancia del marcador (CFDA) cuando se adicionan las diferentes bacteriocinas con la mitad de la concentración de la CMI.	52
Gráfica 6. Cinética de la fuga del marcador (CFDA) cuando se adiciona enterocina 22.	54
Gráfica 7. Cinética de la fuga del marcador (CFDA) cuando se adiciona pediocina 133.	54
Gráfica 8. Cinética de la fuga del marcador (CFDA) cuando se adiciona enterocina 29.	55
Gráfica 9. Cinética de la fuga del marcador (CFDA) cuando se adiciona Nisina.	55

Índice de Imágenes

	Página
Imagen 1. Mecanismos de acción de bacteriocinas.	29
Imagen 2. Metodología general en el proyecto.	31
Imagen 3. Actividad y concentración de la enterocina 29.	40
Imagen 4. Actividad y concentración de la pediocina 133.	41
Imagen 5. Actividad y concentración de la enterocina 22.	41
Imagen 6. Actividad y concentración de la nisina.	42
Imagen 7. Cinética de crecimiento de <i>Listeria innocua</i> ATCC33090.	43
Imagen 8 - 11. <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 en ausencia de las bacteriocinas bajo el microscopio electrónico de transmisión.	56
Imagen 12 – 19. <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 tratada con 66.66 UA/mL de Nisina bajo el microscopio electrónico de transmisión.	59
Imagen 20 – 27. Morfología de <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 tratada con 66.56 UA/mL de pediocina133 bajo el microscopio electrónico de transmisión.	63
Imagen 28 – 35. Morfología de <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 tratada con 66.56 UA/mL de enterocina29 bajo el microscopio electrónico de transmisión.	67
Imagen 36 – 43. Morfología de <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 tratada con 66.24 UA/mL de enterocina22 bajo el microscopio electrónico de transmisión.	71

"La frase más excitante que se puede oír en ciencia,
la que anuncia nuevos descubrimientos,
no es "¡Eureka!" (¡Lo encontré!) sino 'Es extraño...!'"
Isaac Asimov

“Los guerreros vencedores ganan primero
y luego van a la guerra, mientras que los perdedores
van primero a la guerra y luego pretenden ganarla”
Sun Tzu

“No digas todo lo que sabes, no hagas todo lo que puedes, no creas todo lo que oyes,
no gastes todo lo que tienes; Porque: el que dice todo lo que sabe,
el que hace todo lo que puede, el que cree todo lo que oye,
el gasta todo lo que tiene; Muchas veces: dice lo que no conviene,
hace lo que no debe, juzga lo que no ve, gasta lo que no puede.”
Proverbio Árabe

Capítulo 1

1. Introducción

A pesar de los avances modernos de la tecnología, la preservación de los alimentos sigue siendo un tema debatido, no sólo para los países en desarrollo, donde la aplicación de las tecnologías de conservación de los alimentos son claramente necesarias, sino también para el mundo industrializado. La industria alimentaria tiene grandes retos como la reducción de las pérdidas económicas debidas a la descomposición de los alimentos, disminución de los costos de procesamiento de alimentos y evitar la transmisión de patógenos microbianos a través de la cadena alimentaria, al tiempo que se satisfacen las crecientes demandas de los consumidores de alimentos listos para comer, de sabor fresco, rico en nutrientes, vitaminas y mínimamente procesados (Gálvez *et al.*, 2007).

Los microorganismos presentes sobre las superficies de trabajo como acero inoxidable, vidrio y plástico en las plantas procesadoras de alimentos, son una potencial fuente de contaminación que puede llevar al deterioro de los alimentos o la transmisión de enfermedades. *Listeria monocytogenes* es uno de los patógenos que pueden formar biopelículas sobre las superficies, siendo difícil de remover o eliminar con los métodos tradicionales de limpieza (Silva, 2004).

La contaminación de los alimentos es un problema serio para la industria alimentaria, debido a que da lugar a la aparición de productos inaceptables para el consumo humano. La producción industrial de alimentos es un proceso que se desarrolla a gran escala, razón por la cual las pérdidas por contaminación microbiana son elevadas y altamente costosas. Este fenómeno generalmente es un proceso en el que participan bacterias, levaduras, hongos y parásitos, al mismo tiempo es un proceso competitivo, en el cual prevalecen aquellos grupos que se adaptan a las condiciones ambientales que se manifiestan en el producto en particular.

Los alimentos pueden contaminarse por una gran variedad de microorganismos, tanto patógenos como de deterioro. La flora inicial presente en los mismos está formada por

cantidades variables de microorganismos. La capacidad de adaptación y resistencia a factores ambientales de cada microorganismo (refrigeración, actividad de agua, agentes antimicrobianos, por ejemplo), determinará qué grupos sobrevivirán y serán los dominantes (Schneider, 2005).

Para inhibir o destruir a microorganismos patógenos, se está empleando productos biológicos que tienen un enfoque biotecnológico formando parte del concepto de barreras antimicrobianas y que tiene como objetivo final la obtención de alimentos más seguros para el consumidor (Schöbitz, 2006). Para esto se han usado bacterias ácido lácticas (BAL) por siglos en alimentos fermentados; dichas bacterias son consideradas como GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA (Food and Drug Administration) y por lo tanto son ideales para su uso como bioconservadores o biocontroladores microbianos. Permitiendo su uso en la fermentación de alimentos sin una aprobación adicional (Ross *et al.*, 1999).

La bioconservación se puede definir como la extensión de la vida media y de la seguridad de los alimentos mediante el empleo de su microbiota natural o controlada y/o sus productos antibacterianos como son las bacteriocinas (Heng *et al.*, 2007). Las BAL producen una gran variedad de sustancias antimicrobianas (por ejemplo, ácidos orgánicos, acetoína, diacetilo, peróxido de hidrógeno, reuterina, péptidos antifúngicos, y bacteriocinas (Holzapfel *et al.*, 1995; El-Ziney *et al.*, 2000; Magnuson y Schnürer, 2001). Las bacteriocinas son péptidos biológicamente activos contra miembros de la misma especie o especies muy relacionadas taxonómicamente a la cepa productora; sintetizados en los ribosomas como parte de su mecanismo de defensa (Jack *et al.*, 1995; Cotter *et al.*, 2005).

Las BAL producen una amplia variedad de bacteriocinas, la mayoría de los cuales se pueden agrupar en una de las clases propuestas por Klaenhammer (1993). La estructura, biosíntesis, genética y su aplicación en alimentos de las bacteriocinas estudiadas en este trabajo han sido revisadas recientemente (Aguado Bautista *et al.*, 2010; Aguado Bautista, 2011; Álvarez, 2011). Dentro de estas bacterias productoras de antimicrobianos tenemos las

que pertenecen al género *Enterococcus* y *Pediococcus*, por ejemplo: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* y *Pediococcus acidilactici* que producen bacteriocinas.

En los últimos años ha existido un gran interés por emplear cepas de *Enterococcus* y *Pediococcus* 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, debido a que son inactivadas por enzimas proteolíticas. Esta característica les permite ser consideradas como conservadores seguros de una gran variedad de alimentos. (Álvarez, 2011), como en la carne curada, leche, queso, jugos y pasta de soya (Riley y Wertz, 2002). Se ha desarrollado gelatina de pediodicina, una bacteriocina de clase IIa hecha por bacterias productoras de ácido láctico, que protegen a los hot-dogs de la contaminación bacteriana (Raloff, 1998).

Una preocupación acerca del uso de bacteriocinas para la preservación de comida es la selección de cepas resistentes. Estudios con BAL han mostrado la generación de cepas resistentes a la actividad de bacteriocinas después de haber expuesto la cepa sensible a 25 ciclos de crecimiento sucesivo en presencia de la bacteriocina (Dykes y Hastings, 1998). El tratamiento con una combinación de bacteriocinas, por ejemplo nisina y bacteriocina de clase IIa podrían reducir teóricamente la incidencia de resistencia (Vignolo *et al.*, 2000).

Un problema adicional es si la resistencia a una clase de bacteriocina BAL puede resultar en una resistencia cruzada con otra clase de bacteriocina (Song & Richard, 1997)). Por lo que, antes de su posible aplicación en alimentos las cepas bacteriogénicas así como sus bacteriocinas deben ser caracterizadas bioquímica y molecularmente, debido a que las bacterias productoras 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 estos microorganismos sean de gran interés para los procesos de fermentación, son muy importantes los estudios para identificar su modo de acción, para evitar la presencia de posibles factores de riesgo, de forma que puedan proponerse como una alternativa segura para futuras aplicaciones en alimentos (Álvarez, 2011).

Capítulo 2

2. Justificación

Debido a que los consumidores le dan una gran importancia a la seguridad alimentaria la ciencia de los alimentos está dedicando muchos medios para obtener productos más seguros para el consumo humano. Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETAS), son enfermedades bacterianas que suponen pérdidas económicas elevadas en la industria, además de los consiguientes efectos para la salud. Muchos microorganismos causan daños directamente sobre el producto y con la consecuente formación de olores desagradables y defectos físicos, cuando se alcanzan los niveles inadecuados (Cassens, 1996). Se sabe que muchos microorganismos producen agentes antimicrobianos, como el caso de las bacterias lácticas que producen bacteriocinas, las cuales son especialmente eficaces contra las bacterias Gram positivas. Las bacteriocinas actúan atacando las membranas celulares de los organismos sensibles, reduciendo o incluso inactivando a la flora microbiana.

La atención de la investigación de las bacteriocinas se enfocó en la bacteria *Listeria monocytogenes*, agente causal de listeriosis, debido a que la frecuencia de brotes de esta infección aumentó, combinada con la resistencia natural del agente causal y que cada año en los Estados Unidos, se han reportado 2300 casos de listeriosis lo cual generó costos de 2.3 billones de dólares anuales, siendo los productos cárnicos mínimamente procesados y los listos para consumirse los principales alimentos implicados; de ahí que se haya establecido “tolerancia cero” para *Listeria monocytogenes*, este hecho resulta de suma importancia, sobre todo para aquellas empresas dedicadas a la exportación de alimentos.

Además el estudio de esta bacteria fue interesante debido a su capacidad de crecer a temperaturas cercanas a la refrigeración que se utilizan para la preservación tradicional de comida. Esto condujo al aislamiento de un gran número de bacteriocinas de clase IIa, las cuales son altamente activas contra *L. monocytogenes* (Ennahar *et al.*, 2000).

Sin embargo, la naturaleza química muy diversa de las bacteriocinas propone modos de acción diferentes, lo que conduce a pensar que una resistencia cruzada es más difícil de obtener. No obstante, ha sido reportada una resistencia cruzada entre diferentes bacteriocinas dentro de la clase IIa (Rekhif *et al.*, 1994). Las bacteriocinas de la clase IIa, como la pediocina producida por *Pediococcus acidilactici* y las enterocinas producidas por diferentes especies del género *Enterococcus* se caracterizan por ser termoestables en un amplio intervalo de pH, y por presentar actividad contra algunos microorganismos asociados con la carne y productos cárnicos, como *Listeria*, *Clostridium* y *Brochothrix thermosphacta*.

Estudios preliminares realizados por el grupo de trabajo han reportado que las bacteriocinas producidas por *Enterococcus faecium* MXVK29, *Enterococcus faecalis* MXVK22 y *Pediococcus parvulus* MXVK133 tiene la capacidad de producir bacteriocinas con propiedades y características que pueden corresponder a la clase IIa con altas posibilidades de ser aplicadas en alimentos, pero se ha demostrado que estos biconservadores en altas concentraciones pueden generar cepas resistentes (Álvarez-Cisneros *et al.*, 2010), por lo cual se requiere conocer el mecanismo de acción de cada una de estas bacteriocinas para entender mejor el efecto de resistencia que producen, además la forma en que actúan ayudaría a caracterizar y clasificar mejor a estos compuestos para futuras aplicaciones.

Capítulo 3

3. Revisión Bibliográfica

3.1 Enterocinas

Algunas BAL tienen la propiedad de sintetizar sustancias antimicrobianas como parte de un mecanismo de defensa y de competencia ante otros microorganismos (Klaenhammer, 1993; Jack *et al.*, 1995). Estas sustancias, conocidas como bacteriocinas, han despertado el interés de muchos investigadores debido a su carácter antimicrobiano natural, con potencial aplicación para el control de microorganismos patógenos y de deterioro en alimentos. Sumado a esto, el origen proteico de las mismas representa una ventaja adicional, ya que durante el paso por el tracto digestivo son inactivadas por las proteasas presentes en el estómago, evitando así problemas de resistencia o inhibición de la microbiota normal del tracto gastrointestinal (Nettles, 1993). Dentro de los géneros de bacterias lácticas productoras, se encuentran *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Pediococcus sp.* y *Enterococcus sp.* (Heng *et al.*, 2007).

El género *Enterococcus* pertenece al grupo de bacterias ácido lácticas Gram (+), son cocáceas agrupadas en pares o cadenas cortas, no esporuladas, catalasa negativo, oxidasa negativo y anaerobios facultativos, tienen un crecimiento óptimo a temperaturas de 35° C, aunque algunas especies del género crecen en un intervalo de 10 – 45 °C, en presencia de NaCl al 6.5% y pH de 9.6; que puede sobrevivir a tratamientos de 65° C durante 30 minutos (Špelina *et al.*, 2007).

Las enterocinas son péptidos termoestables activos, sintetizados vía ribosomal por bacterias lácticas y tienen un mecanismo de inmunidad específico. Se caracterizan por presentar un efecto antagónico contra especies de microorganismos taxonómicamente relacionadas, ya sean patógenos y/o causantes de deterioro (Cotter *et al.*, 2005). Las BAL producen una variedad de enterocinas, la mayoría de las cuales se pueden agrupar en una de las clases propuestas por Klaenhammer (1993).

3.2 Pediocinas

El género *Pediococcus* pertenece al grupo de bacterias lácticas asociadas con la fermentación de carnes y vegetales, donde juega un papel importante en la producción de ácido y desarrollo de sabor. Además, tiene la ventaja de producir bacteriocinas efectivas contra muchas bacterias lácticas y numerosos patógenos Gram negativos (Pucci *et al.*, 1988; Chikindas *et al.*, 1993; Price y Schweigert, 1994; Faruk y Bibek, 1996). Son células esféricas, que forman tétradas y pares, (pero nunca solas o en cadena). Son Gram (+), no móviles, ni esporuladas, anaerobias facultativas, con fermentación homoláctica, catalasa negativa y presentan un intervalo óptimo de crecimiento de 25 a 40 °C. El crecimiento depende de la presencia de un carbohidrato fermentable, por ejemplo la glucosa sin formación de gas, y requiere factores de crecimiento y aminoácidos (Faruk y Bibek, 1996).

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

Se ha reportado que las condiciones de crecimiento influyen en la producción de bacteriocinas, ya que es esencial la composición y el pH final del medio de cultivo. Se ha encontrado que un pH inicial de 6.5 a 6.8 estimula el crecimiento celular y que con un pH final de 3.6- 3.7 se tiene la mayor producción de bacteriocina. Este hecho se asocia al procesamiento postraduccional de las pro-pediocinas a pediocinas activas y ocurre eficientemente por debajo de un pH 5.0 (Yin *et al.*, 2003; 2004).

3.3 Clasificación

La mayoría de las bacteriocinas producidas por las BAL son péptidos catiónicos, 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). Estas sustancias han sido agrupadas según características diversas, como espectro de inhibición, mecanismo de acción, estructura química, tamaño y resistencia a temperatura, que a continuación se describen.

Klaenhammer (1993) propuso clasificar a las bacteriocinas en cuatro grupos:

- 7 **Grupo I (lantibióticos).** Integrado por péptidos termoestables (<5 kDa), caracterizados por la presencia de deshidroaminoácidos y tioéter aminoácidos (deshidroalanina, deshidrobutirina, lantionina y β -metil-lantionina) en su estructura. Se sintetizan en forma de pro-péptidos, sufriendo modificaciones postraduccionales que originan la aparición de aminoácidos modificados. Las bacteriocinas de esta clase fueron subdivididas en tipo A y tipo B, según su estructura química (estructura de sus anillos) y actividad antimicrobiana (Sahl y Bierbaum, 1998).

Tipo A. Son moléculas anfifílicas, flexibles, de forma alargada y con 2-7 cargas positivas netas. Tienen forma de rosca (2.1 a 3.5 kDa) y forman poros en las membranas bacterianas. A este grupo pertenece la nisina, subtilisina 7, Pep 5, epilacina K7, epidermina, y gallidermina, entre otras.

Tipo B. Son moléculas globulares (alrededor de 2 kDa), fuertemente anfifílicas, con carga negativa o neutra y producen la muerte celular mediante la inhibición de las enzimas participantes en la síntesis de la pared celular. Ninguna bacteriocina de este grupo es producida por BAL. Algunos ejemplos son la mersacidina y la actagardina (Sahl y Bierbaum, 1998).

- 7 **Grupo II (No lantibióticos, péptidos activos contra *Listeria*).** Grupo integrado por péptidos termoestables (<10 kDa), no contienen lantionina y es el grupo que comprende la mayor cantidad de bacteriocinas. Se divide en tres subgrupos:

Clase II-a. Péptidos similares a la pediocina (pediocin- likepeptides), activos contra *Listeria* y contienen una secuencia aminoacídica consenso en su extremo amino terminal (Tyr- Gly- Asn- Gly- Val- Xaa- Cys). Dentro de las BAL que producen este tipo de bacteriocinas se encuentra *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Carnobacterium*.

Clase II-b. Agrupa bacterias cuya actividad requiere la acción complementaria de dos péptidos; en esta clasificación encontramos a la lactococina G, lactococina M y plantaricina A, entre otras (Chen y Hoover, 2003).

Clase II-c. Péptidos con grupo tiol (-SH) activos que requieren cisteína reducida para activarse. Las bacteriocinas que pertenecen a este grupo son aquellos no lantibióticos que no pertenecen a las clases II-a y II-b, por ejemplo acidocina B, divergicina A, enterocina P, enterocina B y enterocina L50, entre otras.

- 7 **Clase III.** Grupo integrado por proteínas termolábiles (termosensibles y > 30 kDa). La mayoría de estas bacteriocinas son producidas por el género *Lactobacillus*.
- 7 **Clase IV.** Este grupo contiene péptidos complejos que requieren moléculas lipídicas o carbohidratos junto con la fracción proteica para su actividad. Estas bacteriocinas incluyen glicoproteínas, lipoproteínas y glucolipoproteínas.

Sin embargo Cotter *et al.*, (2005) sugirieron una modificación a esta clasificación (Tabla 1) en donde quedan agrupadas las bacteriocinas en dos grupos mayoritarios: los lantibióticos que contienen lantionina (clase I) y los que no contienen lantionina (clase II), mientras que las bacteriocinas de alto peso molecular 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 esta clasificación debido a que ninguno de los miembros de este grupo ha sido suficientemente caracterizado como para demostrar su existencia.

Tabla 1. Clasificación de bacteriocinas.

Clase	Subclase	Características	Descripción	Ejemplos
Clase I	Se han propuesto 11 subclases	Bacteriocinas con lantionina	Lantibióticos de uno y dos péptidos	Péptido sencillo: nisina, mersacidina, lacticina 481
				Péptido doble: lacticina 3147, citolisina
Clase II	IIA	Bacteriocinas sin lantionina, pequeños péptidos heterogéneos.	Bacteriocinas tipo pediocina	Pediocina PA1, leucocina A
	IIB		Bacteriocinas de dos péptidos	Lactacina F
	IIC		Bacteriocinas cíclicas	Enterocina AS48, reuterina 6.
	IID		Bacteriocinas de un solo péptido y lineales	Lactococina A, divergicina A.
Bacteriolisinas		Básicamente proteínas líticas	Grandes proteínas termolábiles	Lisostafina, enterolisina A.

Fuente: (Cotter *et al.*, 2005).

(Heng y Tagg, 2006) propusieron una nueva clasificación de bacteriocinas, en la que respetan la agrupación de (Cotter *et al.*, 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 2). 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.

Tabla 2. Propuesta de clasificación de bacteriocinas.

Clase	Subclase	Características	Descripción	Ejemplos
Clase I	Se han propuesto 11 subclases	Bacteriocinas con lantionina	Lantibióticos de uno y dos péptidos	Péptido sencillo: nisina, mersacidina, lacticina 481
				Péptido doble: lacticina 3147, citolisina
Clase II	IIA	Bacteriocinas sin lantionina, pequeños péptidos heterogéneos.	Bacteriocinas tipo pediocina	Pediocina PA1, leucocina A
	IIB		Bacteriocinas de dos péptidos	Lactacina F
	IIC		Bacteriocinas de un solo péptido y lineales	Lactococina A, divergicina A.
Clase III	IIIa	Bacteriolíticas	Péptidos cíclicos	Enterocina AS48
	IIIb	No líticas		
Clase IV		Péptidos cíclicos	Grandes proteínas	Lisostafina, enterolisina A.

Fuente: (Heng *et al.*, 2007).

Debido a lo anterior se ha propuesto de acuerdo con las características particulares de estos compuestos, una nueva clasificación, especial para enterocinas (Franz *et al.*, 2007). Esta nueva clasificación incluye cuatro clases principales: 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 *et al.*, 2001).

3.4 Espectro Antimicrobiano

La mayoría de las bacteriocinas generadas por las bacterias Gram (-) actúan esencialmente sobre especies microbianas relacionadas taxonómicamente con ellas, mientras que las bacteriocinas de las Gram (+) son antagonistas de una mayor diversidad de especies Gram (+) (Tagg *et al.*, 1976). Aunque, las bacterias Gram (+) como *Lactobacillus acidophilus* producen bacteriocinas que inhiben el desarrollo de bacterias Gram (-) (Vicent *et al.*, 1959), su utilización antimicrobiana frente a bacterias Gram (-) ha dado buenos resultados cuando son combinadas con otras sustancias como algún ácido orgánico (Mustapha *et al.* 2002).

Las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas se han clasificado en tres clases, respecto a su espectro antimicrobiano: a) bacteriocinas con un estrecho margen de acción, (restringido a microorganismos de la misma especie); b) bacteriocinas con una actividad intermedia que inhibe bacterias lácticas y algunas bacterias Gram (+); y c) bacteriocinas con amplio margen de acción, las cuales inhiben una amplia variedad de Gram (+) (Cintas *et al.*, 2001).

3.5 Mecanismo de acción

Diversos mecanismos de acción han sido propuestos para describir la acción bactericida de las bacteriocinas. Uno de ellos es la formación de poros o canales selectivos el cual es uno de los mecanismos mejor descritos. Así mismo se ha sugerido 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:

a) Pueden unirse al lípido II (receptor universal y principal transportador de subunidades de peptidoglucano del citoplasma a la pared celular) impidiendo la síntesis correcta de la pared celular y conduciendo a la célula a la muerte.

b) Pueden 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. Por otro lado los lantibióticos con dos péptidos (como la lacticina 3147) pueden tener esta actividad dual distribuida en los dos péptidos (Cotter *et al.*, 2005).

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 *et al.*, 2005). Siendo 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 N terminal, 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 *et al.*, 2005; Imagen 1).

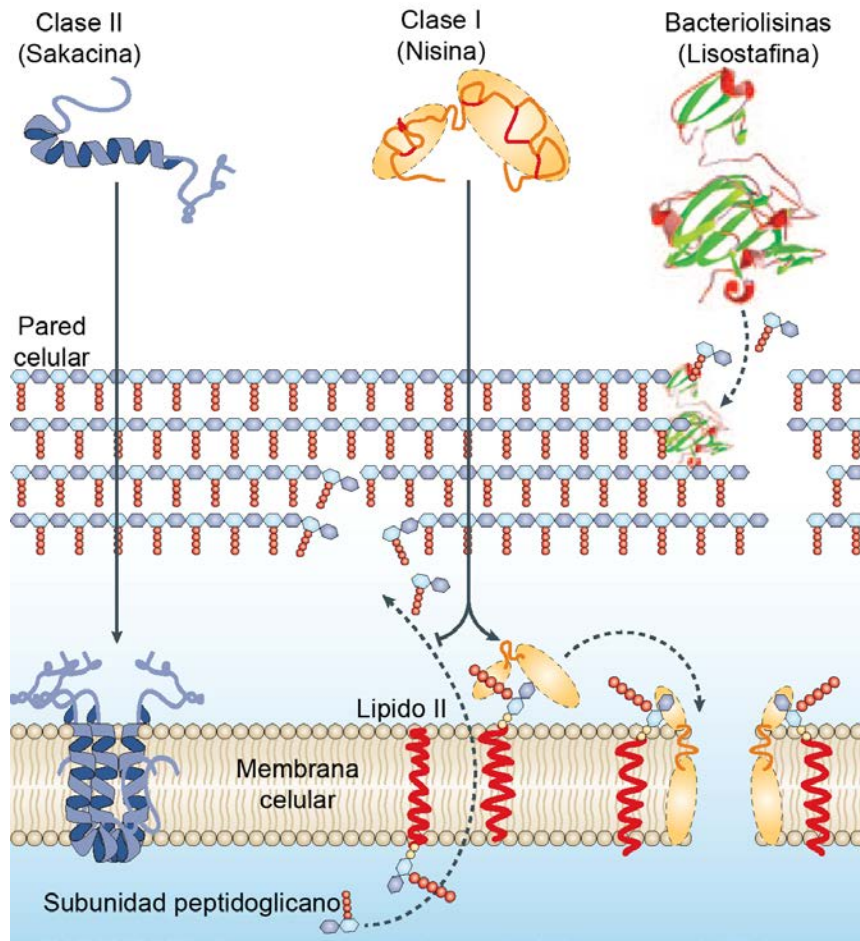


Imagen 1. Mecanismos de acción de bacteriocinas (Cotter *et al.*, 2005).

Capítulo 4

4. Hipótesis

Si las bacteriocinas en estudio tienen un efecto antimicrobiano en la membrana plasmática, dicho efecto provocaría un incremento en la permeabilidad de la membrana de las células sensibles que podrían ser monitoreadas evaluando la fuga del material intracelular y la observación de poros en la membrana de las células.

4.1 Objetivo general:

Determinar el efecto de las bacteriocinas producidas por *Enterococcus faecium* MXVK29, *Enterococcus faecalis* MXVK22 y *Pediococcus parvulus* MXVK133 sobre la membrana celular de *Listeria innocua*.

4.2 Objetivos específicos:

- a) Obtener un extracto semipurificado de la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* MXVK29, *Enterococcus faecalis* MXVK22 y *Pediococcus parvulus* MXVK133.
- b) Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos semipurificados contra la cepa sensible; así como las concentraciones mínimas inhibitorias de los diferentes extractos semipurificados.
- c) Evaluar la fuga de material intracelular mediante espectroscopia UV y en células teñidas con carboxifluoresceína.
- d) Evaluar la capacidad de recuperación de *Listeria innocua* ATCC33090 después de ser expuesta a la bacteriocina.

Capítulo 5 - Metodología

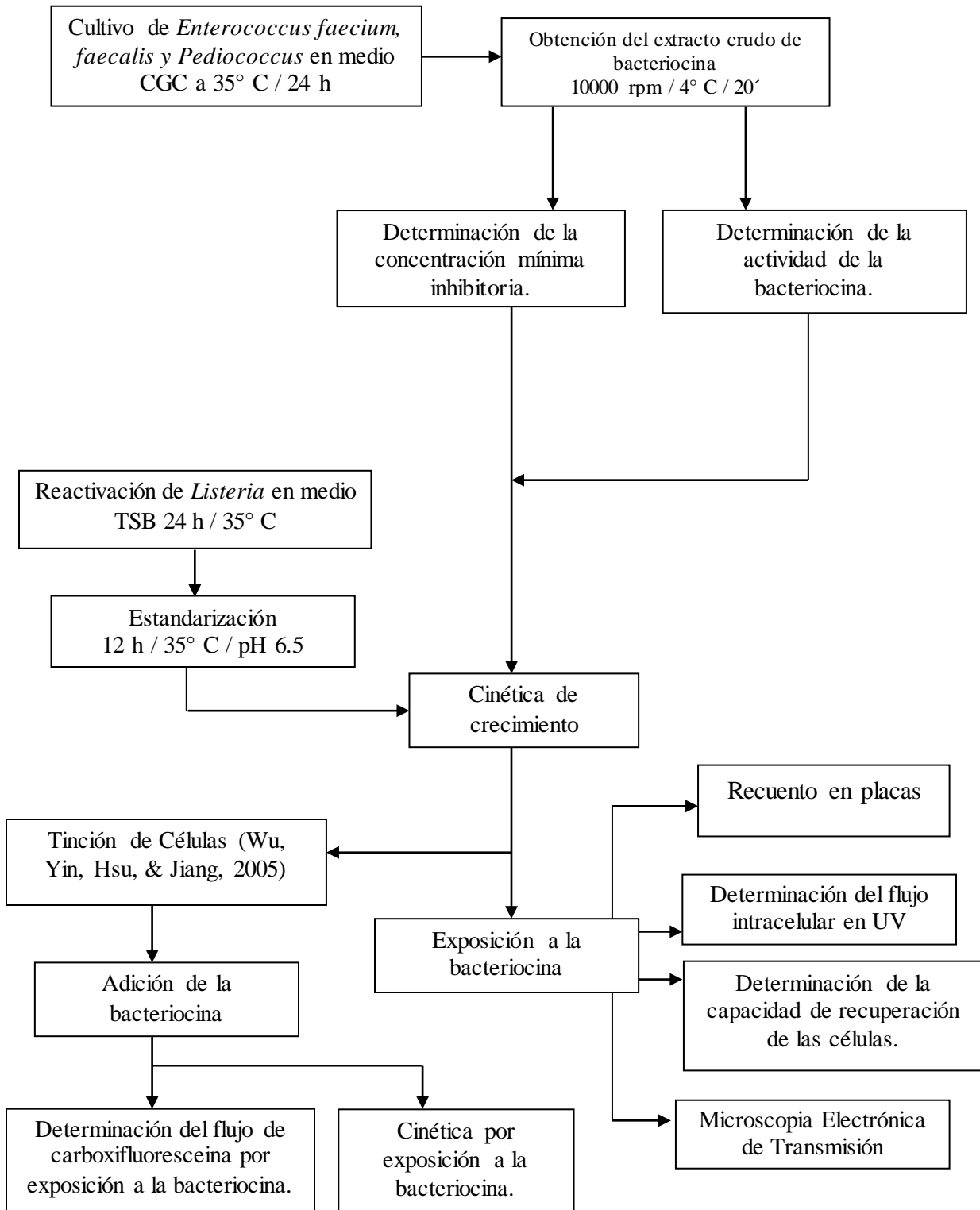


Imagen 2. Metodología general en el proyecto

5.1 Crecimiento de Cepas

Las cepas bacteriogénicas se listan en la Tabla 3; empleando una cepa de *Listeria innocua* como microorganismo sensible. Todas las cepas se almacenaron en congelación a -80 °C y con una D.O._{600nm} = 0.4 y posteriormente fueron reactivadas empleando las siguientes condiciones: Caldo Caseína Glucosa (Anexo B) a 35° C durante 24 horas y *Listeria inocua* en medio TSB (Anexo B) a 35 °C durante 16 horas para obtener una concentración de células estandarizada para las demás pruebas.

Tabla 3. Cepas utilizadas y clasificación.

Cepa	Tipo de Bacteria
<i>Enterococcus faecium</i> MXVK29 ⁽¹⁾	Gram (+)
<i>Enterococcus faecalis</i> MXVK29 ⁽¹⁾	Gram (+)
<i>Listeria innocua</i> ATCC33090 ⁽¹⁾	Gram (+)
<i>Pediococcus parvulus</i> MXVK133 ⁽¹⁾	Gram (+)

(7) Laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México.

5.2 Extracción de las bacteriocinas.

El extracto semipurificado de las bacteriocinas se obtuvo a partir de un cultivo de 24 horas de cada una de las cepas productoras, el cual se sometió a un tratamiento térmico a 70 °C durante 30 minutos (Katla *et al.*, 2003) para inactivar termicamente a los microorganismos, así como enzimas proteasas principalmente, presentes en el medio que pudieran degradar a la bacteriocina. Posteriormente se ajustó el pH del cultivo a 6.5 para neutralizar ácido láctico en el medio principalmente, posteriormente se mantuvo en agitación moderada durante 24 horas a 4 °C para propiciar que la bacteriocina se adhiriera a la membrana celular. 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 para eliminar los restos del medio de cultivo y a su vez evitar la lisis de las células.

Finalmente las células se resuspendieron (5% del volumen original) en una solución 100 mM de NaCl, pH 1.0, el descenso del pH facilitó la desorción de la bacteriocina al buffer de extracción. Las células se mantuvieron en agitación a 4 °C durante 24 horas para una mejor desorción. Posteriormente se sometieron a centrifugación a 3100 \times g durante 20 minutos a 4 °C para descartar células y retener el sobrenadante con la bacteriocina; luego se dializo para eliminar las sales presentes y posteriormente se liofilizo para concentrar el compuesto antimicrobiano.

El liofilizado se disolvió en agua destilada para obtener una solución saturada semipurificada de bacteriocina, finalmente se filtró a través de membranas estériles Millipore (Durapore® Membrane Filters, GV, Irlanda) con tamaño de poro de 0.22 μ m. El filtrado obtenido es lo que se denominó extracto semipurificado de bacteriocina (ESB).

5.3 Determinación de la actividad inhibitoria.

El ESB liofilizado se disolvió en cantidad suficiente para hacer una solución saturada en buffer de fosfatos 0.1M pH 7, (250mg/mL enterocina 29; 250 mg/mL pediocina 133; 552 enterocina 22; 400mg/mL nisna) y se le determinó la concentración de proteína por el método de Bradford. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de dos. La actividad antimicrobiana del extracto crudo se obtuvo por el método de difusión en agar (Schillinger y Lücke, 1989), utilizando *Listeria innocua* como cepa sensible. La técnica consistió en depositar 30 μ L de la solución del ESB en pozos hechos con una pipeta Pasteur estéril sobre la capa de agar TSA semisólido (0.8% de agar bacteriológico), sobre una capa del mismo medio pero con 1.5% de agar bacteriológico.

El medio semisólido fue previamente inoculado con 70 μ L de un cultivo en fase logarítmica ($D.O_{600nm} = 0.3$) de la cepa sensible (*Listeria innocua*); esta densidad óptica corresponde a una concentración de $10^7 - 10^8$ UFC/mL. La actividad del compuesto antimicrobiano tipo bacteriocina se evaluó determinando el halo de inhibición formado, una vez incubada la placa a 35 °C durante 24 h para el desarrollo de la cepa sensible.

La actividad del extracto de bacteriocina se reportó en Unidades Arbitrarias por gramo de extracto liofilizado (UA/g). Así mismo las unidades específicas (UA/ μ g de proteína) se calcularon dividiendo las UA/mL ó UA/mg entre la cantidad de proteína de la muestra (μ g de proteína/mL o μ g de proteína/mg); estando definida 1 UA como el inverso de la máxima dilución (base 2) en la cual se obtuvo un halo de inhibición de 2 mm de diámetro entre el volumen del compuesto antimicrobiano colocado en cada pozo por el factor de conversión ($D \times 1000/30$, donde D= inverso dilución (Bhunia *et al.*, 1991; Chikindas *et al.*, 2004) con la siguiente fórmula:

$$UA = \frac{D}{V} \times F_D$$

UA = unidades arbitrarias en un mililitro.

D = inverso de la dilución base 2.

V = volumen de bacteriocina en cada pozo (30 μ L).

F_D = factor de conversión (1000 μ L/ 1mL).

5.3.1 Cinética de crecimiento del microorganismo sensible.

Se inocularon tubos de 13 x 16 mm con 9 mL de caldo de cultivo TSB con 1% (v/v) de inóculo de 14 horas de *Listeria innocua* ATCC33090 para obtener conservas de cepas en fase estacionaria, agregando 30% de glicerol al volumen a conservar, se homogenizaron y se congelaron a -80 °C. A partir de estas cepas en congelación se realizaron las cinéticas de crecimiento para las técnicas consecutivas; Fueron inoculados tubos de 9 mL con TSB con 10% (v/v) de muestra y se tomaron alícuotas de 30 μ L para colocarlos en los pocillos de las micro placas con 140 μ L de medio TSB estéril y se realizaron lecturas de absorbancia a 600 nm en un lector de microplacas Biotek® Synergy HT cada 5 minutos hasta tener una D.O._{600nm} = 0.3 para analizar el crecimiento celular (UFC/mL) y la fluorescencia tanto de las células como del sobrenadante.

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 obtienen los parámetros cinéticos de velocidad de crecimiento específico (μ) y tiempo de latencia (t-lag) con el programa DMFit© v.3.0. (Baranyi *et al.*, 1994; Baranyi, 2012).

5.3.2 Concentración mínima inhibitoria.

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se basa en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar). Las determinaciones se realizaron empleando como microorganismo sensible a *Listeria innocua* bajo las mismas condiciones que se utilizan en la cinética con caldo de cultivo TSB (5.3.1) y con un intervalo determinado de las diferentes bacteriocinas (250mg/mL enterocina 29; 250 mg/mL pediocina 133; 552 enterocina 22; 400mg/mL nisina).

En todos los casos se prepararon diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2 utilizando medio de cultivo TSB; posteriormente se inoculó dicho medio y tras la correspondiente incubación, para permitir el crecimiento del microorganismo, se realizó la lectura, determinando qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo; la cual se denomina concentración mínima inhibitoria (CMI) (García y Gómez-Lus, 2000).

5.4 Recuento después de la exposición a la bacteriocina.

Después de incubación en medio TSB, las células indicadoras fueron colectadas al cabo de 10 minutos en la centrifuga a $10\,000 \times g$ y lavadas con buffer 0.05 M de Tris-HCl (pH 7.0). Las células fueron resuspendidas en buffer de fosfatos 0.2 M (pH 6.0) para obtener una concentración de 10^7 - 10^8 UFC/mL. Las células se expusieron a diferentes concentraciones en base a la CMI de pediocina 133, nisina, enterocina 22 y 29 a 35 °C durante 1 hora y se

determinó la cuenta de células viables mediante recuento en placas de agar TSB e incubadas durante 24 horas a 35 °C.

5.5 Determinación del flujo de material intracelular por UV.

Después de la incubación en TSB, las células indicadoras fueron colectadas al término de 10 minutos de centrifugación a 10 000 x g y lavadas con buffer de Tris-HCl (pH 7.0) 0.05M, filtrado (0.45 μ m). Las células fueron re-suspendidas en buffer de fosfatos 0.2 M (pH 6.0) para obtener una concentración de 10^7 - 10^8 UFC/mL. El cultivo sensible fue expuesto a diferentes concentraciones de pediocina 133, nisina, enterocina 22 y 29 a 35 °C durante 1 hora. Después de 10 minutos de centrifugación a 10 000 x g, el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana 0.2 μ m y se le midió la absorbancia al ultravioleta a 260 nm.

5.6 Capacidad de recuperación de las células expuestas a la acción de la bacteriocina.

Después de 18 horas de incubación en TSB, las células sensibles fueron colectadas pasados 10 minutos de centrifugación a 10 000 x g y lavadas con buffer Tris-HCl (0.05M) pH 7.0. Las células se re-suspendieron en buffer de fosfatos (0.2M) pH 6.0 para obtener una concentración de $10^7 - 10^8$ UFC/mL. Las muestras fueron tratadas con la CMI de pediocina 133, enterocina 22, enterocina 29 y nisina respectivamente a 35 °C por 2 horas. A continuación a 100 mL de cultivo fresco se adicionó 0.1% de células tratadas con bacteriocina y se incubaron a 35° C; finalmente se determinó la absorbancia a 600 nm durante 3 horas de incubación.

5.7 Tinción de las células sensibles.

Este procedimiento consistió en incubar las cepas sensibles durante 7.1 horas a 35 °C en medio TSB, las células en crecimiento ($D.O._{600\text{nm}} = 0.3$), se centrifugaron a 10 000 x g durante 10 minutos, después se colectaron y lavaron usando Buffer Tris-HCl (0.05 M) pH 7.0, luego se re-suspenden en más Buffer Tris-HCl. Posteriormente se colocaron durante 40 segundos en el vortex, para obtener únicamente células separadas y viables. Se agregó una

solución de 1 mM de diacetato de 5(6)-carboxyfluoresceína (CFDA) en acetona 10 µg/mL a las células en suspensión y se incubaron a 35 °C durante 30 minutos.

Posterior al tratamiento, las células se lavaron 2 veces con buffer Tris-HCl para remover la fluoresceína residual. Las células son inmediatamente usadas para análisis o pueden ser almacenada en hielo y alejadas de la luz por un máximo de 30 minutos.

5.7.1 Determinación del flujo de carboxifluoresceína en células teñidas y expuestas a la bacteriocina.

La pérdida de la carboxifluoresceína de las células teñidas se determinó en una concentración de $10^7 - 10^8$ UFC/mL de *Listeria innocua* ATCC33090 con buffer de fosfatos (0.2 M) pH 6.0, el cultivo una vez teñido fue expuesto a diferentes concentraciones de pediocina, enterocina 22, enterocina 29 y nisina (Diluciones de 2 apartir de la CMI) respectivamente.

Después de 1 hora de incubación a 35° C con agitación constante y alejada de la luz, los cultivos se centrifugaron a 10 000 x g durante 10 minutos. Terminada la centrifugación, los pellets de células fueron lavados con buffer de fosfatos (0.2M) pH 6.0 y posteriormente re-suspendidas en el mismo buffer. Mientras el supernadante fue filtrado a través de una membrana con tamaño de poro 0.22 µm. La intensidad de la fluorescencia se determinó en la suspensión celular y los filtrados a una longitud de excitación de 490 nm y emisión de 520 nm usando un espectrofluorometro BioTek® Synergy HT.

5.7.2 Cinética de crecimiento de organismos sensibles en presencia de la bacteriocina.

La cinética se realizó durante 1 hora de incubación en buffer de fosfatos 0.2 M (pH 6.0) a 35° C. En este tiempo se ensayó la fuga de la 5(6)-carboxyfluoresceína de las células teñidas. Después de comenzar a tratar con la CMI de pediocina 133, enterocina 29, enterocina 22 y nisina, las muestras fueron incubadas con agitación y alejadas de la luz a 35 °C durante 1

hora. Al paso del minuto 30, 45 y 60 de la incubación; las muestras fueron retiradas y centrifugadas a $10\,000 \times g$ durante 10 minutos.

Mientras el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana Millipore (Durapore® Membrane Filters, GV, Irlanda) con tamaño de poro $0.22 \mu\text{m}$. La intensidad de la fluorescencia se determinó en la suspensión celular y los filtrados a una longitud de excitación de 490 nm y emisión de 520 nm usando un espectrofluorómetro BioTek® Synergy HT.

5.8 Preparación de cepas para observación en microscopio electrónico de transmisión.

La preparación y observación de muestras de microscopía electrónica, se realizaron en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM; para ello se inocularon tubos de medio TSB (9 mL) con 10% (v/v) de inóculo y se tomaron alícuotas de 30 μL para colocarlos en los pocillos de las microplacas con 140 μL de medio TSB estéril y se realizaron lecturas de absorbancia a 600 nm en un lector de microplacas Biotek® Synergy HT cada 5 minutos hasta tener una $\text{D.O.}_{600\text{nm}} = 0.3$. Posteriormente, las células sensibles fueron colectadas pasados 10 minutos en la centrifuga a $10\,000 \times g$ y lavadas con buffer 0.05 M de Tris-HCl (pH 7.0).

Las células fueron re-suspendidas en buffer de fosfatos 0.2 M (pH 6.0) para obtener una concentración de 10^7 - 10^8 UFC/mL. Dichas células fueron expuestas a diferentes concentraciones en base a su CMI de pediocina 133, nisina, enterocina 22 y 29 a 35°C durante 1 hora. A continuación se centrifugaron a $10\,000 \times g$ durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante, el pellet se lavó con buffer 0.05 M de Tris-HCl (pH 7.0) para eliminar el exceso de bacteriocina y se transfirió a un microtubo estéril para adicionar la solución fijadora de glutaraldehído al 0.5% en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.0 y se mantuvo en refrigeración (4°C) durante 24 horas (Regininni *et al.*, 2008).

Las células en fijación se lavaron tres veces con buffer de fosfatos 0.1M, pH 7.0 hasta eliminar el olor a glutaraldehído (frutal). A continuación se adicionó una suspensión de OsO_4 al 1% en el mismo buffer durante 90 minutos en refrigeración. Después de este tratamiento se

deshidrataron las células con cambios cada 15 min (2 veces) de acetona en diferentes concentraciones, partiendo desde 30% hasta acetona absoluta (100%). Una vez deshidratadas las células, se les adicionó resina y se dejaron 48 h a 60°C para que se polimerizaran. Estas células fueron cortadas (Micrótopo Leica ultracut. UCT, EUA) para poder ser observadas en el microscopio electrónico de transmisión (JEM- 1200 EX II, EUA); previo a la observación se tiñeron con 2% de acetato de uranio y citrato de plomo (Clinton, 1971).

6. Resultados y discusión

6.1 Determinación de la actividad inhibitoria.

La actividad se evaluó determinando la máxima dilución en la que se observó un halo de inhibición de soluciones saturadas de bacteriocina en buffer de fosfatos 5mM, pH 6.5 por 24 horas (Imágenes 3 – 6) y de acuerdo a la cantidad de proteína de cada una de las bacteriocinas (Tabla 4), determinada por el método de Bradford.

Tabla 4. Determinación de proteína en las bacteriocinas.

Bacteriocina	Determinación(μ g proteína/mL de ESB)				
	1	2	3	4	Promedio
Enterocina 22	43.75	43.72	43.76	43.79	43.75 ± 2.88
Pediocina 133	31.25	31.28	31.23	31.26	31.25 ± 2.08
Enterocina 29	24.88	24.86	24.87	24.89	24.88 ± 1.29
Nisina	34.20	34.23	34.20	34.19	34.20 ± 1.73

La lectura se realizó a una longitud de onda de 595 nm.

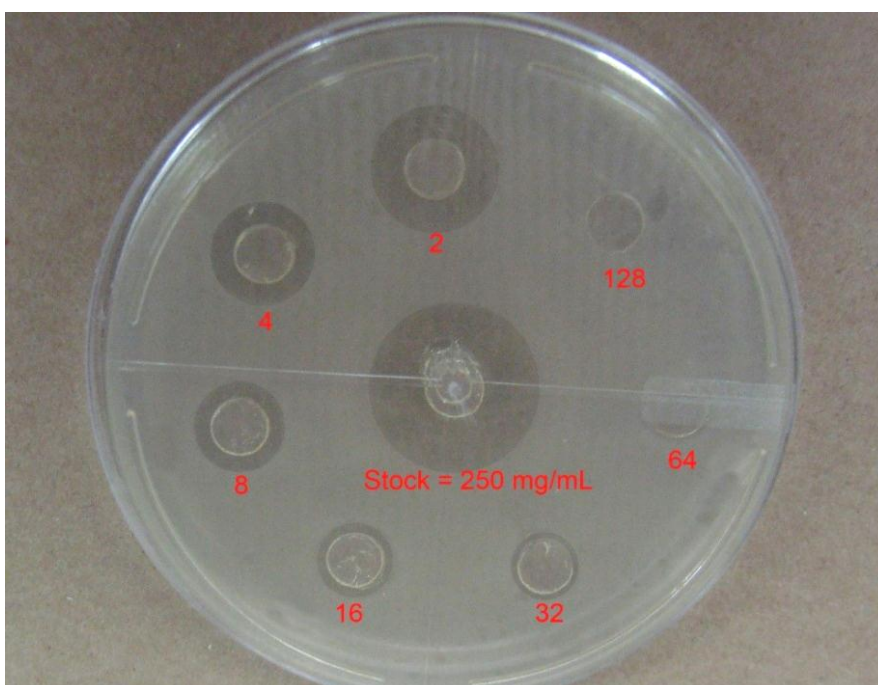


Imagen 3. Actividad y concentración de la enterocina 29.

Imagen 4. Actividad y concentración de la pediocina 133.

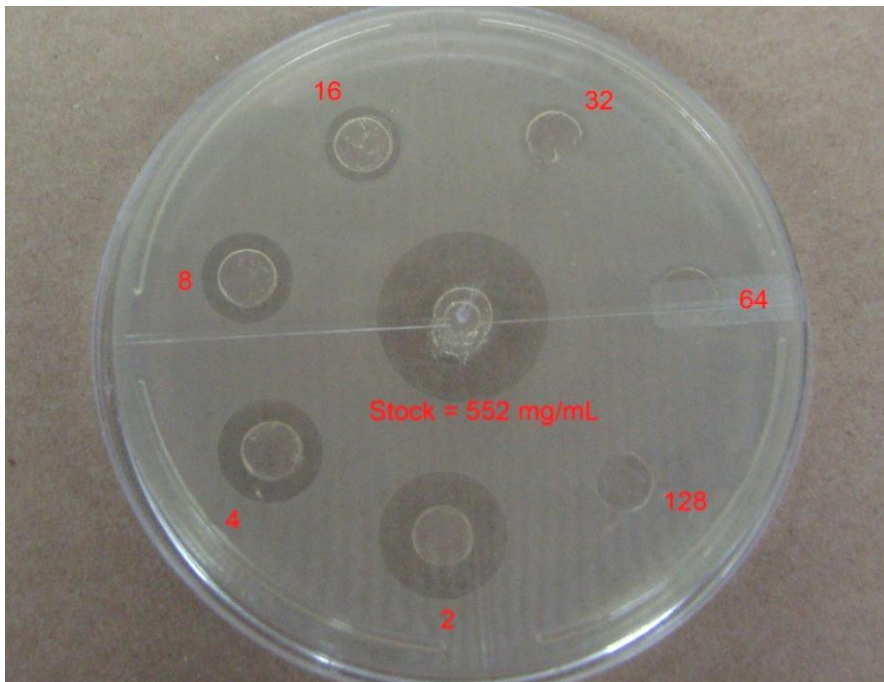
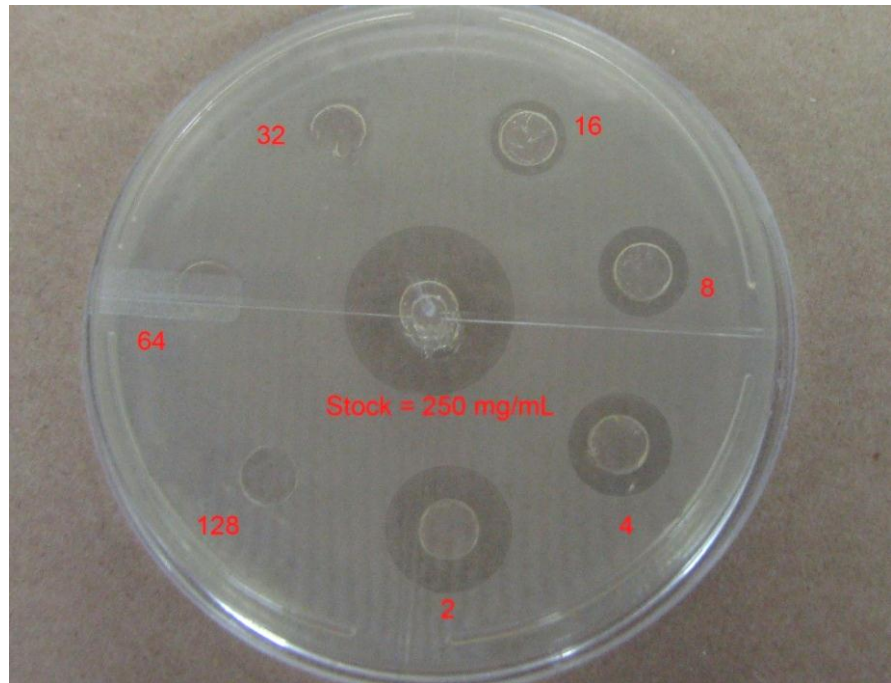
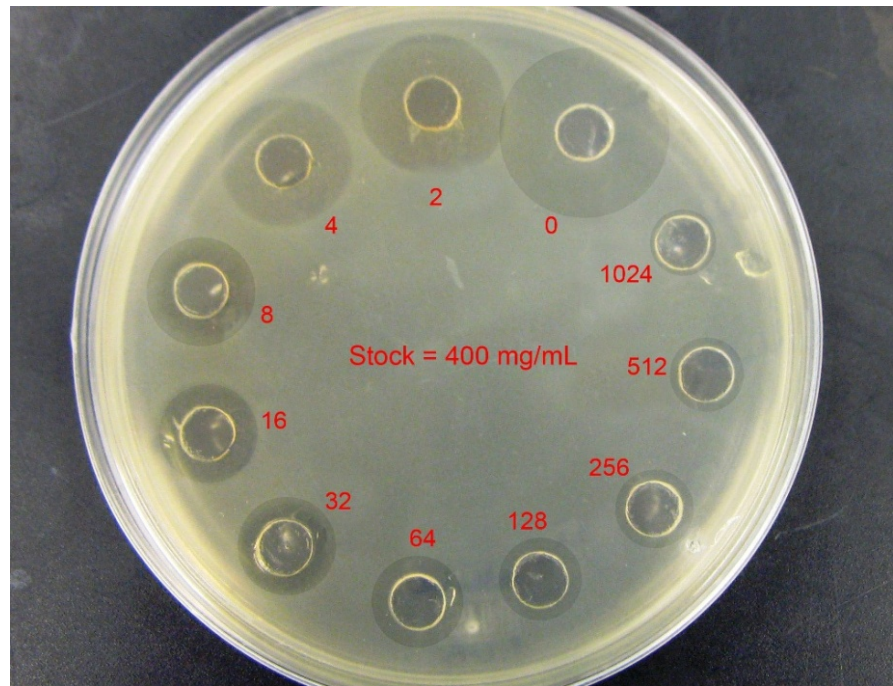


Imagen 5. Actividad y concentración de la enterocina 22.

Imagen 6. Actividad y concentración de la nisina.



El extracto semipurificado de las diferentes bacteriocinas presentó diferentes actividades (Tabla 5), siendo la enterocina 29 que presenta la mayor actividad inhibitoria y actividad específica dentro de las bacteriocinas en estudio. Como se aprecia en los resultados, la nisina presentó casi 10 veces la actividad de la enterocina 29, esto se puede deber a que la nisina utilizada fue de tipo comercial, por lo cual está más concentrada y purificada. Mientras que la enterocina 22 a pesar de tener mayor concentración de proteína tiene menor actividad antimicrobiana que la enterocina 29 y la pediocina 133, lo que se puede atribuir a que no es una pediocina comercial y no toda la proteína es bacteriocina.

Tabla 5. Actividad Inhibitoria de las bacteriocinas.

Bacteriocina	Actividad (UA/g)	Concentración de Proteína ($\mu\text{g/mL}$)	Unidades Específicas (UA/ μg de proteína)
Enterocina 29	4260	24.88	43.03
Pediocina 133	2130	21.51	21.51
Enterocina 22	960	43.75	12.15
Nisina	42660	34.20	498.95
$\sigma = 0.00$			

6.2 Cinética de crecimiento de *Listeria innocua*.

A partir de las cepas en congelación con una $D.O._{600nm} = 0.4$ se realizó la inoculación en medio TSB y posteriormente se colocó en microplacas esterilizadas durante 30 minutos con luz U.V. para garantizar la esterilidad de las microplacas, durante la cinética. Como se puede observar en la imagen 7 al utilizar el software DMFit© v.3.0 se observa que *Listeria innocua* ATCC33090 sigue el modelo de Gompertz cuyos datos cinéticos se aprecian en la tabla 6 al igual que los datos del control negativo (medio TSB sin inóculo). Estos datos fueron obtenidos con la finalidad de estandarizar todas las técnicas utilizadas durante el estudio.

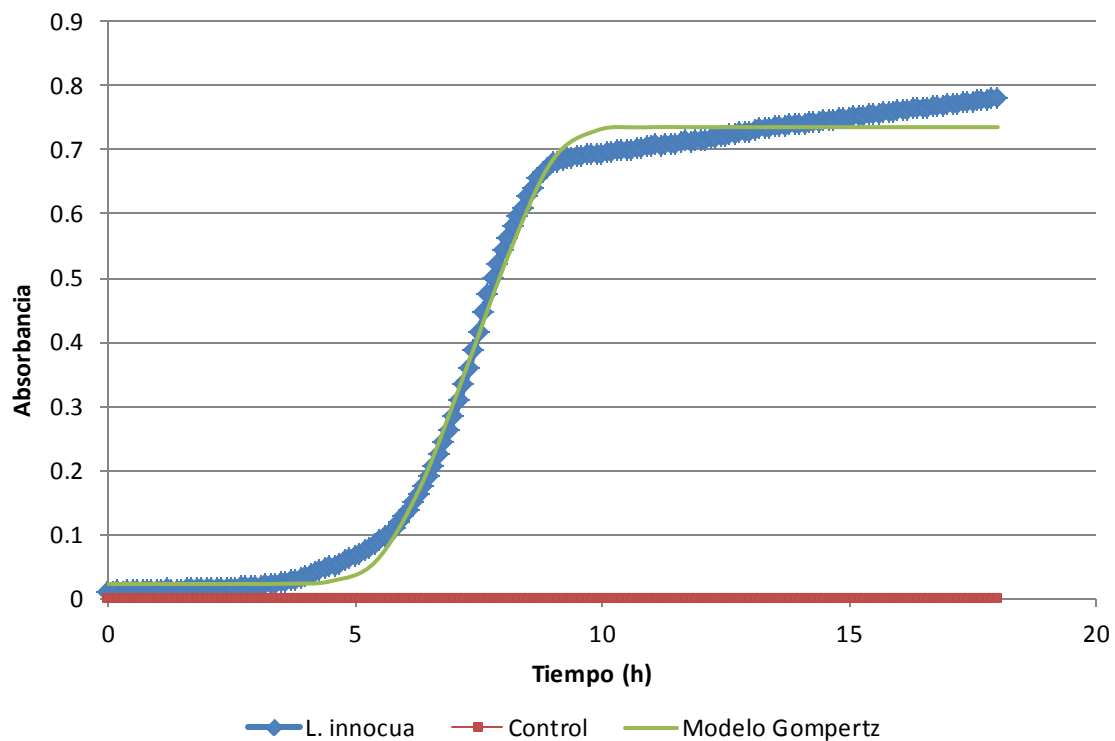


Imagen 7. Cinética de crecimiento de *Listeria innocua* ATCC33090.

Tabla 6. Datos cinéticos de *Listeria innocua* ATCC33090.

Párametros	<i>Listeria innocua</i>	Control
μ_{Max}	0.02 D.O./minuto \pm 0.002*	0
t-lag	5.6 horas \pm 0.06*	0
t_d	35.5 minutos \pm 0.03*	0
Tiempo Para Obtener D.O. = 0.3	7.1 horas \pm 0.03*	0
*Promedio de 12 replicas		

6.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI).

Los métodos de dilución se consideran de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos. La gran cantidad de variables (dependientes del microorganismo, del medio de cultivo, del inoculo) que influyen en estos métodos son responsables de oscilaciones en el resultado final. Las CMI's de las bacteriocinas en estudio se muestran en la tabla 7, las cuales se calcularon con base en la cinética de crecimiento del microorganismo sensible, debido a que son las concentraciones mínimas que tienen un efecto antimicrobiano contra *Listeria innocua* y por tanto son la base para la técnica de fuga de carboxifluoresceína.

Con base en los resultados anteriores la enterocina 29 es la que tiene mayor efecto contra *Listeria innocua* al tener que adicionar únicamente 7.8 mg/mL al medio de cultivo, por lo que es la bacteriocina más eficiente de las tres, sin embargo no es relevante respecto a la nisina que puede inhibir el crecimiento de listeria con solo 0.78 mg/mL, lo cual nuevamente se puede deber a que esta última es un compuesto purificado ó que sus mecanismos de acción sean diferentes.

Tabla 7. CMI de las Bacteriocinas.

Bacteriocina	Ultima dilución con inhibición *	CMI (mg/mL)
Enterocina 29	32	7.81
Pediocina 133	16	15.62
Enterocina 22	16	34.5
Nisina	512	0.78
*Se utilizaron diluciones seriadas en base 2. $\sigma = 0.00$		

6.4 Recuento en placa.

Las células de *Listeria innocua* con una concentración de 10^7 - 10^8 UFC/mL se cultivaron en medio TSB y después fueron expuestas a diferentes concentraciones en base a la CMI de pediocina 133, nisina, enterocina 22 y 29 para determinar la cuenta de células viables que no se vieron afectadas; lo que se determinó mediante un recuento en placas de agar TSB e incubadas durante 24 horas a 35° C, como se puede observar en la tabla 8. Estos resultados muestran que las enterocinas 22 y 29, así como la pediocina solo logran la disminución de 1 a 2 ciclos logarítmicos cuando son utilizadas en una concentración mínima, lo que significa que mientras estén presentes en el medio por un tiempo determinado evitan la proliferación de *Listeria innocua*. Por otra parte la nisina al tener una actividad mínima inhibitoria más grande y debido al mecanismo de acción del Tipo IA que posee, logra una disminución de 5 a 6 ciclos logarítmicos en un tiempo de exposición relativamente corto.

Tabla 8. Células viables después de ser tratadas con bacteriocinas.

Bacteriocina	CMI (mg/mL)	Recuento (UFC/mL)
Enterocina 29	7.81	$7 \times 10^6 \pm 0.2$
Pediocina 133	15.62	$3 \times 10^6 \pm 0.3$
Enterocina 22	34.5	$5 \times 10^6 \pm 0.5$
Nisina	0.78	$8 \times 10^2 \pm 0.0005$

6.5 Determinación del flujo de material intracelular por UV.

Se partió de un cultivo estandarizado de *Listeria innocua*, con una población de 10^7 - 10^8 UFC/mL, al que se le adicionaron las diferentes bacteriocinas y nisina como control positivo del experimento, en concentraciones equivalentes a la CMI de cada una de ellas. También se adicionó una concentración equivalente al doble de su respectiva CMI y una correspondiente a la mitad de la CMI. Se realizaron 4 réplicas con sus respectivos duplicados, los promedios se observan en la tabla 9 e indican que parte de la materia intracelular se fugó de las células de *Listeria innocua*, por acción de la bacteriocina y que presenta una absorbancia en UV a 260nm, tales como son el DNA, NAD^+ , NADH, ATP, aminoácidos, etc. (McAuliffe *et al.*, 2001).

Tabla 9. Absorbancia a 260 nm del sobrenadante.

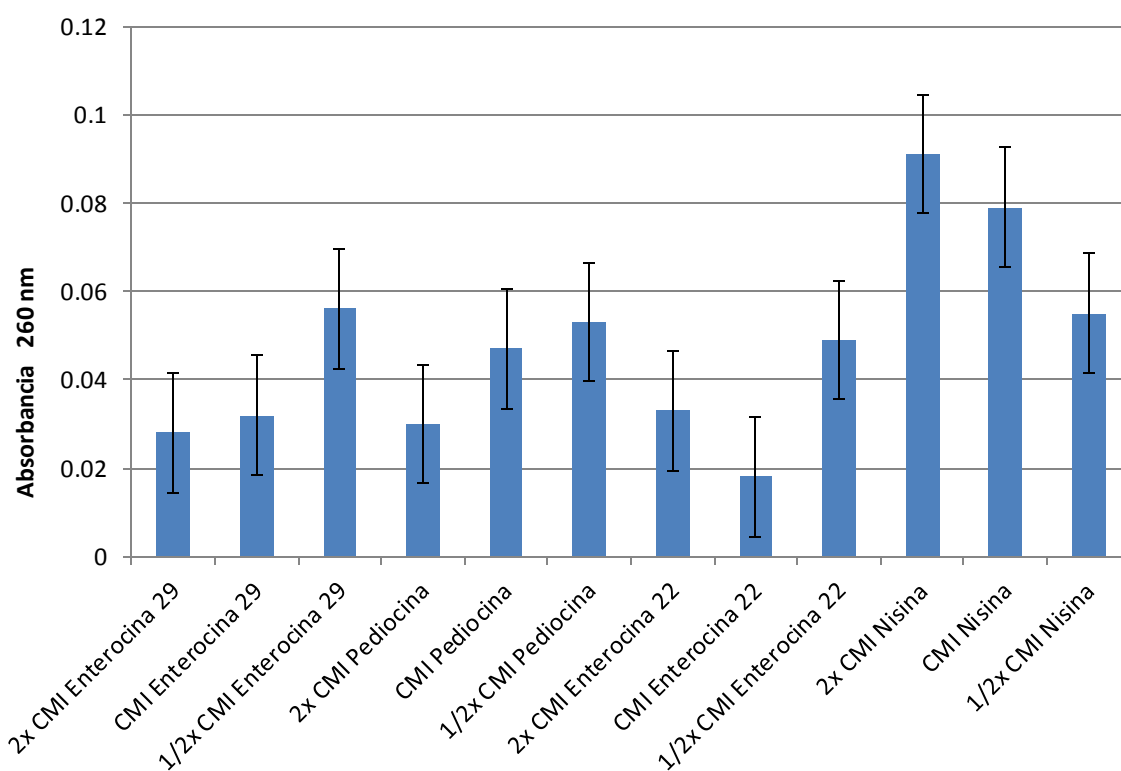
Bacteriocina	2 x CMI (mg/mL)	CMI (mg/mL)	½ x CMI (mg/mL)
Enterocina 29	0.020	0.032	0.053
Enterocina 22	0.019	0.005	0.030
Pediocina 133	0.025	0.047	0.053
Nisina	0.091	0.079	0.055

$\sigma = 0.013$. Se usó como blanco buffer Tris-HCl, el cual no presenta absorbancia.

Los datos presentados en la gráfica 1 presentan una tendencia que indica que entre menos concentrada este la bacteriocina mayor es el material intracelular que se fuga de las células tratadas, lo que es opuesto a la tendencia de la nisina la cual indica que entre más se agrega, mayor es el flujo del material intracelular.

Esto puede ser porque las bacteriocinas 22, 29 y 133 al estar únicamente semipurificadas, tal vez tengan péptidos o proteínas que entorpezcan la acción del péptido antimicrobiano de cada una o que los propios péptidos antimicrobianos se interfieran entre sí, puesto que si estos poseen un mecanismo del tipo II, requieren de la presencia de sitios

específicos para lograr la adhesión en la membrana y poder actuar (Ennahar *et al.*, 2000), mientras que la nisina posee un mecanismo del tipo I, que no requiere ningún sitio específico para formar poros (McAuliffe, Ross, & Hill, 2001). Otra posibilidad es que por su propio mecanismo de acción el tamaño del poro formado no sea lo suficientemente grande como para dejar salir todos los compuestos intracelulares (Rosa *et al.*, 2002), o como su mecanismo es de la clase IIa, únicamente produce una despolarización en la célula y el material intracelular se pierde lentamente.



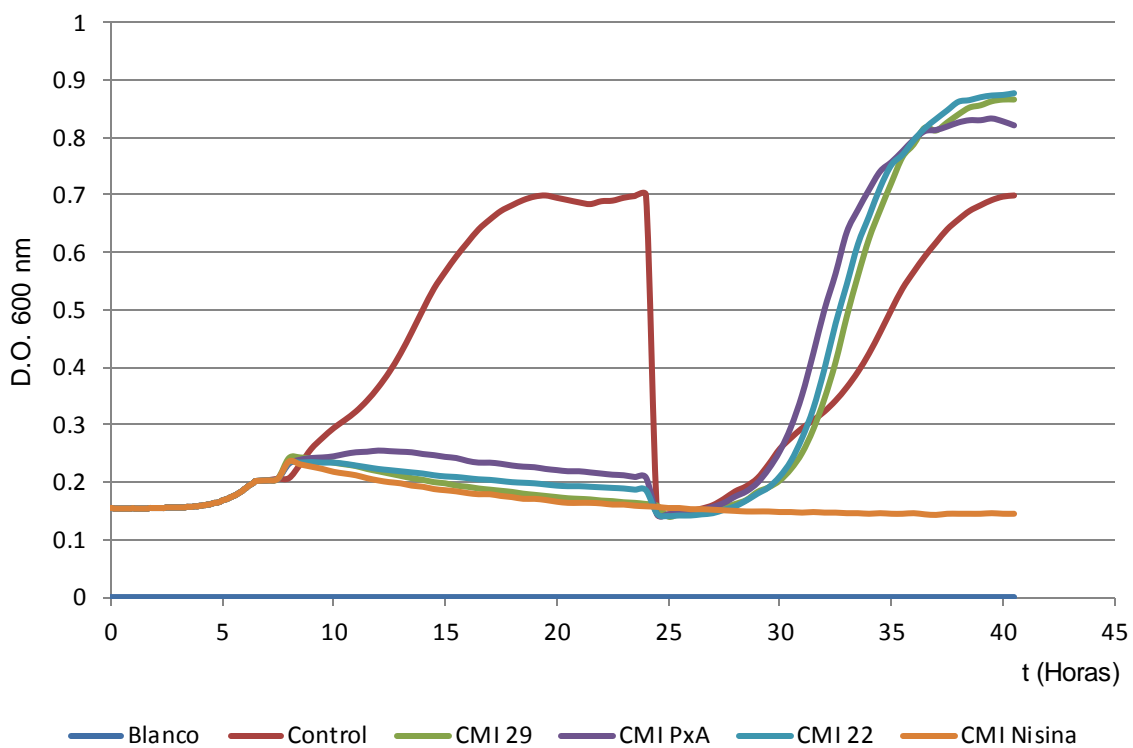
Gráfica 1. Determinación por espectrometría del material intracelular fugado.

6.6 Capacidad de recuperación de las células expuestas a la acción de la bacteriocina.

En la gráfica 2 se observa un crecimiento acelerado por parte de los cultivos que fueron expuestos a las bacteriocinas, lo cual no sucede en las células control que no fueron expuestas y que posiblemente sea causado por que las células expuestas se sometieron a una

reacción homeostática la cual las estresa, puesto que sucede un proceso de adaptación el cual provoca un fuerte gasto energético y al ser colocadas de nuevo en medio de cultivo nuevo, estas células intentarían sobrevivir de cualquier modo (Leistner y Gould, 2005).

Estas células al reproducirse transmitieron un mecanismo de defensa que les permitió soportar las condiciones a las que fueron expuestas lo cual derivaría en el desarrollo de nuevas células resistentes. Sin embargo, esto no sucede para el caso de las células expuestas a la nisina, ya que debido a su modo de acción y al estar en bajas concentraciones respecto a su CMI, no generan un estrés a *Listeria innocua*, por tanto las células mueren y no puede recuperarse aunque se pongan en sus condiciones óptimas de crecimiento.



Gráfica 2. Capacidad de recuperación de *Listeria innocua* con diferentes concentraciones de las bacteriocinas.

6.7 Tinción de las células.

El fundamento de esta técnica está basado en el hecho de que el diacetato de 5(6)-carboxyfluoresceína puede ingresar al interior de la célula y debido a su estructura no puede salir de esta, lo cual asegura un marcado sobre la célula, ya que las estereasaas que posee la célula degradan los enlaces del diacetato de 5(6)-carboxyfluoresceína convirtiéndolo en 5(6)-carboxyfluoresceína y generándole cargas negativas extras al compuesto por lo que permanece en el interior de la célula (Anexo A).

6.8 Determinación del flujo de carboxifluoresceína en células teñidas y expuestas a la bacteriocina.

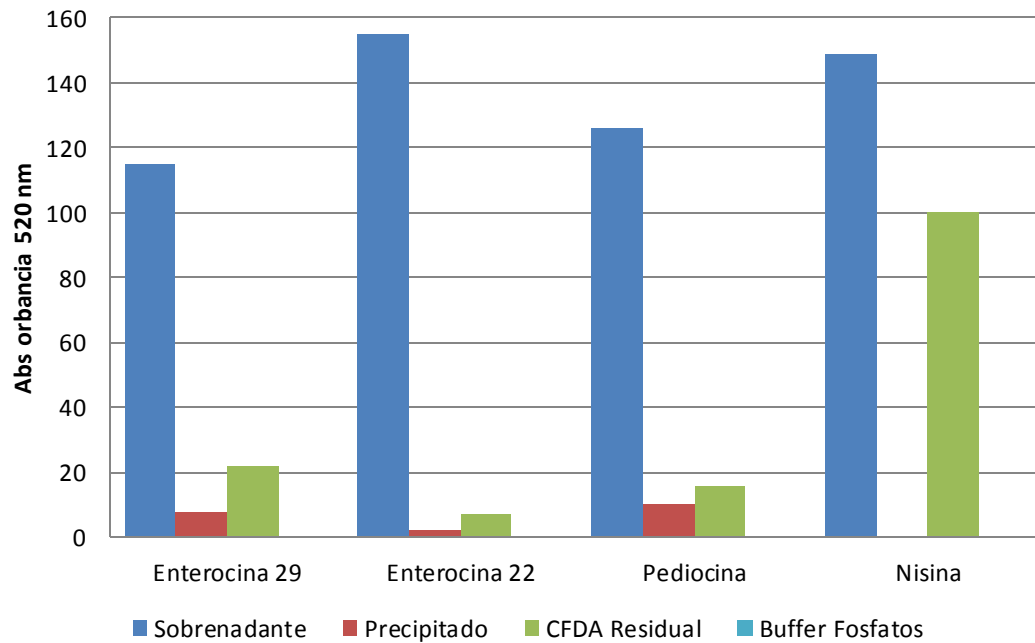
La pérdida de la carboxifluoresceína de las células teñidas se determinó en una concentración de $10^7 - 10^8$ UFC/mL de células de *Listeria innocua* expuestas a diferentes concentraciones de pediocina 133, enterocina 22, enterocina 29 y nisina (2x CMI, CMI y $\frac{1}{2}$ x CMI) respectivamente. La fluorescencia se determinó tanto en el filtrado, como en las células resuspendidas, así como en el buffer de fosfatos con el que se lavaron las células, estos resultados se pueden observar en la tabla 10.

Estos datos muestran que la fuga del material intracelular de las células es causado por el efecto de la adición de las diferentes bacteriocinas, ya que el fundamento de la técnica consiste en marcar dichas células con un compuesto que no se pueda fugar de la célula, más que por la ruptura de la membrana celular de estas, lo cual se evidencia con las gráficas 3, 4 y 5, en las cuales se observa como el compuesto fluorescente con el cual se marcaron las células está en mayor proporción en el sobrenadante, el cual se obtuvo posterior a la adición de la bacteriocinas; mientras que el compuesto fluorescente que queda el precipitado (biomasa) es menor.

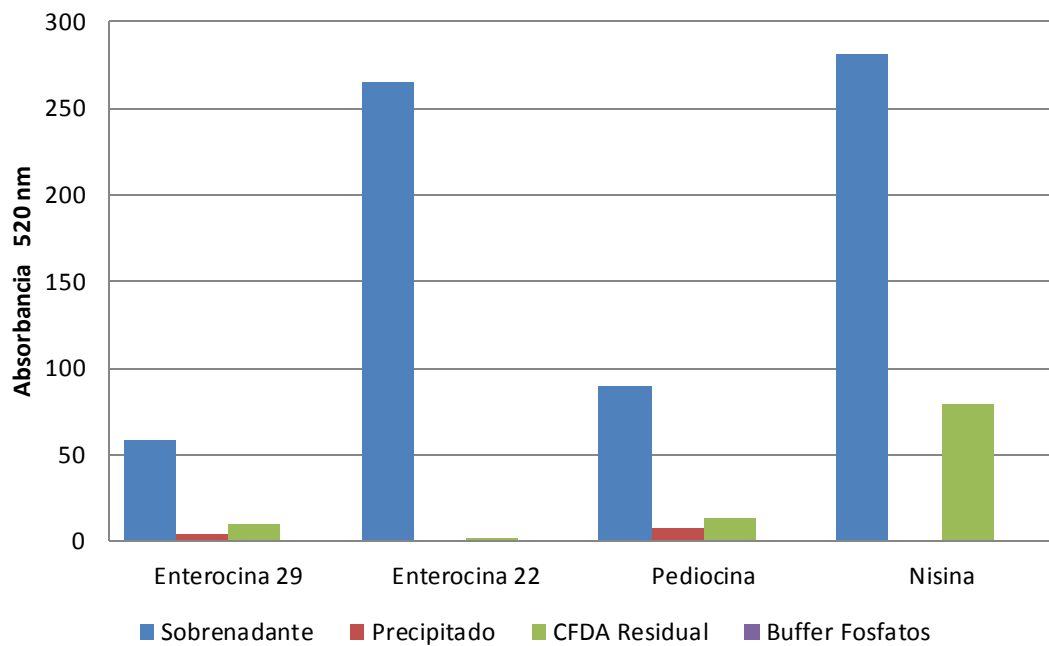
Tabla 10. Absorbancia λ_{Ex} 490nm y λ_{Em} 520nm de la carboxifluoresceína en células de *Listeria innocua* expuestas a las bacteriocinas.

		Buffer Fosfatos	Enterocina 29	Enterocina 22	Pediocina	Nisina
2x CMI (mg/mL)	Sobrenadante	0	115	155	126	149
	Precipitado	0	8	2	10	0
	CFDA Residual	0	22	7	16	100
CMI (mg/mL)	Sobrenadante	0	59	265	90	281
	Precipitado	0	4	0	8	1
	CFDA Residual	0	10	2	13	79
½ x CMI (mg/mL)	Sobrenadante	0	62	3	91	100
	Precipitado	0	0	0	6	0
	CFDA Residual	0	9	2	9	21
0 CMI	CFDA	572	570	571	572	565

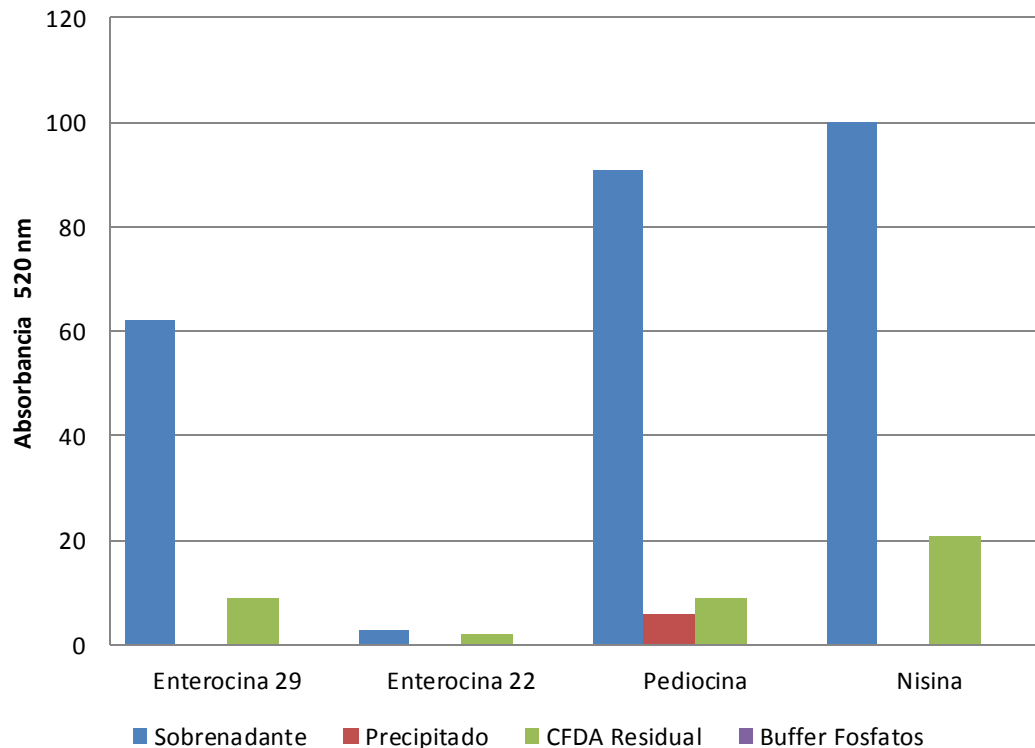
Estos datos muestran que la fuga del material intracelular de las células es causado por el efecto de la adición de las diferentes bacteriocinas, ya que el fundamento de la técnica consiste en marcar dichas células con un compuesto que no se pueda fugar de la célula, más que por la ruptura de la membrana celular de estas, lo cual se evidencia con las gráficas 3, 4 y 5, en las cuales se observa como el compuesto fluorescente con el cual se marcaron las células está en mayor proporción en el sobrenadante, el cual se obtuvo posterior a la adición de la bacteriocinas; mientras que el compuesto fluorescente que queda en el precipitado (biomasa) es menor. Lo anterior muestra que posiblemente las bacteriocinas en estudio sean del tipo IIa ya que una de las características de este tipo de bacteriocinas es la formación de poros a nivel de la membrana celular, por lo que este experimento brinda más información de cómo actúan las bacteriocinas, ya que al comparar los datos en las gráficas 3 - 5, se observa que la acción de la nisina (una bacteriocina de tipo I) es mayor, puesto que no queda prácticamente nada del marcador en la biomasa, como se observa en la tabla 10.



Gráfica 3. Absorbancia del marcador (CFDA) cuando se adicionan las diferentes bacteriocinas con el doble de la concentración de la CMI.



Gráfica 4. Absorbancia del marcador (CFDA) cuando se adicionan las diferentes bacteriocinas con la CMI.



Gráfica 5. Absorbancia del marcador (CFDA) cuando se adicionan las diferentes bacteriocinas con la mitad de la concentración de la CMI.

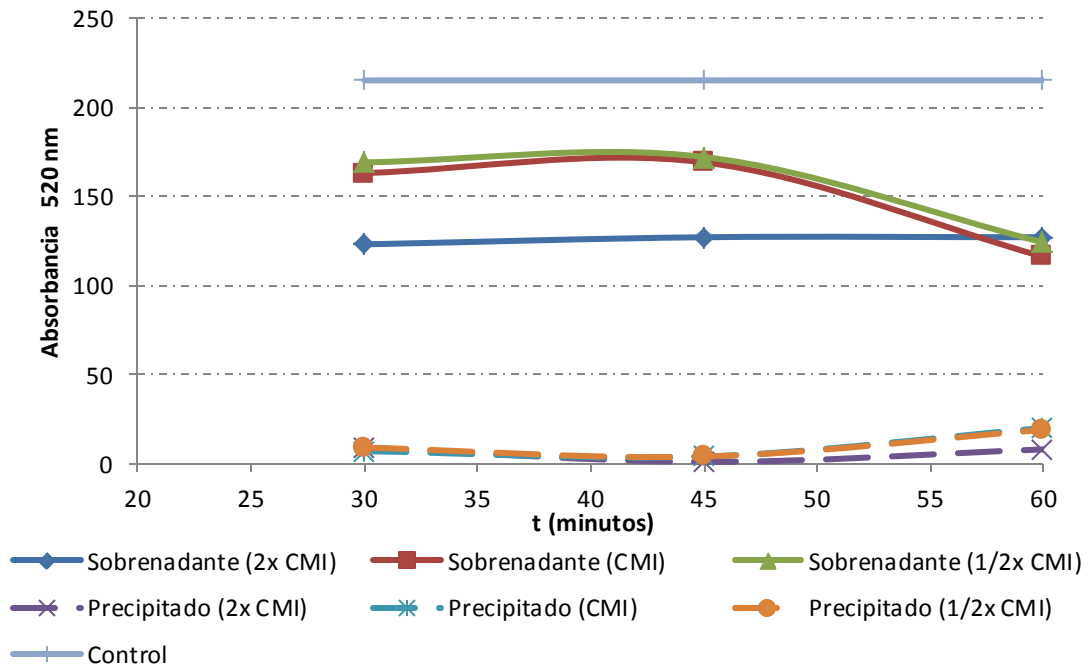
6.8.1 Cinética de crecimiento de organismos sensibles en presencia de la bacteriocina.

Las cinéticas se realizan durante 1 hora de incubación con el mismo tratamiento que el inciso 6.8, pero se toman muestras a los 30, 45 y 60 minutos, a las cuales se les determina la fluorescencia para observar la fuga del material intracelular. En la tabla 11 se pueden observar los datos correspondientes a el promedio de 2 réplicas de cada cinética, que para cada caso la fuga de material intracelular y el marcador fluorescente (carboxifluoresceína) medido en unidades de fluorescencia (UF) aumenta conforme va pasando el tiempo, lo cual indica que las bacteriocinas en estudio posiblemente tenga un mecanismo de acción del tipo IIa, ya que estas tienen sitios específicos en la membrana celular para que las bacteriocinas puedan interactuar y crear los poros.

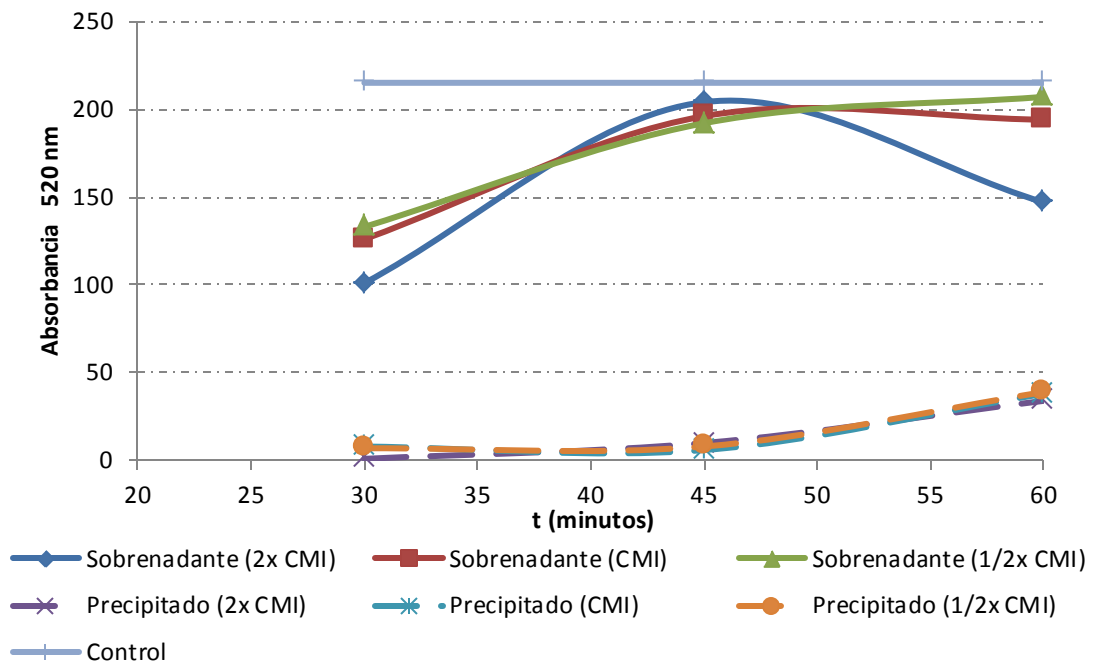
Tabla 11. Fluorescencia de las células sensibles respecto al tiempo.

		CFDA	Enterocina29			Pediocina			Enterocina22			Nisina		
			30'	45'	60'	30'	45'	60'	30'	45'	60'	30'	45'	60'
2x CMI (mg/mL)	Sobrenadante	650	53	68	83	101	204	147	123	127	127	79	221	216
	Precipitado	0	0	13	16	1	10	34	9	1	8	3	3	11
CMI (mg/mL)	Sobrenadante	542	77	96	121	126	196	194	163	169	116	120	158	301
	Precipitado	0	5	20	20	8	6	38	7	4	20	0	2	0
½ x CMI (mg/mL)	Sobrenadante	670	80	123	116	133	192	207	169	172	124	123	158	318
	Precipitado	0	7	24	22	7	8	39	9	4	19	0	1	3
0 CMI	Buffer Fosfatos	634	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

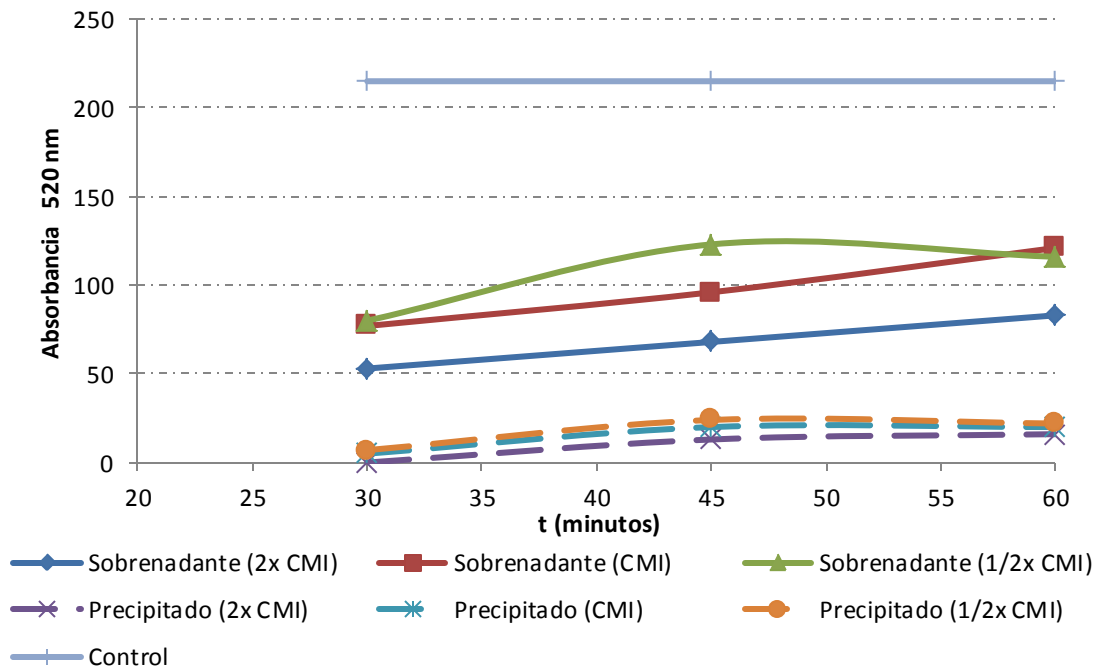
Las gráficas 6 – 9, muestran las cinéticas de acción de las diferentes bacteriocinas en concentraciones basadas en la CMI de cada una de ellas, así como el doble de dicha concentración y la mitad de la CMI. Se puede observar una tendencia del aumento del efecto de cada una de las bacteriocinas, es proporcional al tiempo transcurrido. En algunos experimentos la cantidad de marcador que se detectó es menor cuando se aplican concentraciones mayores a la CMI de las bacteriocinas, lo cual posiblemente se atribuya a que la cantidad de inóculo varía entre $10^7 - 10^8$ UFC/mL o porque la superficie de contacto se ve reducida, ya que al haber más cantidad de moléculas de bacteriocina estas interaccionan entre si formando agregados proteicos y necesitan más tiempo para relacionarse con la membrana celular. Así mismo en concentraciones menores o iguales a la CMI, se presenta el mismo fenómeno, sin embargo este se debe a que existe un agotamiento del reactivo limitante (bacteriocina) o a que el compuesto generado (5(6)-carboxyfluoresceína) pierda fluorescencia, tal como se describe en Molecular Probes Handbook (Life Technologies & Haugland, 2010).



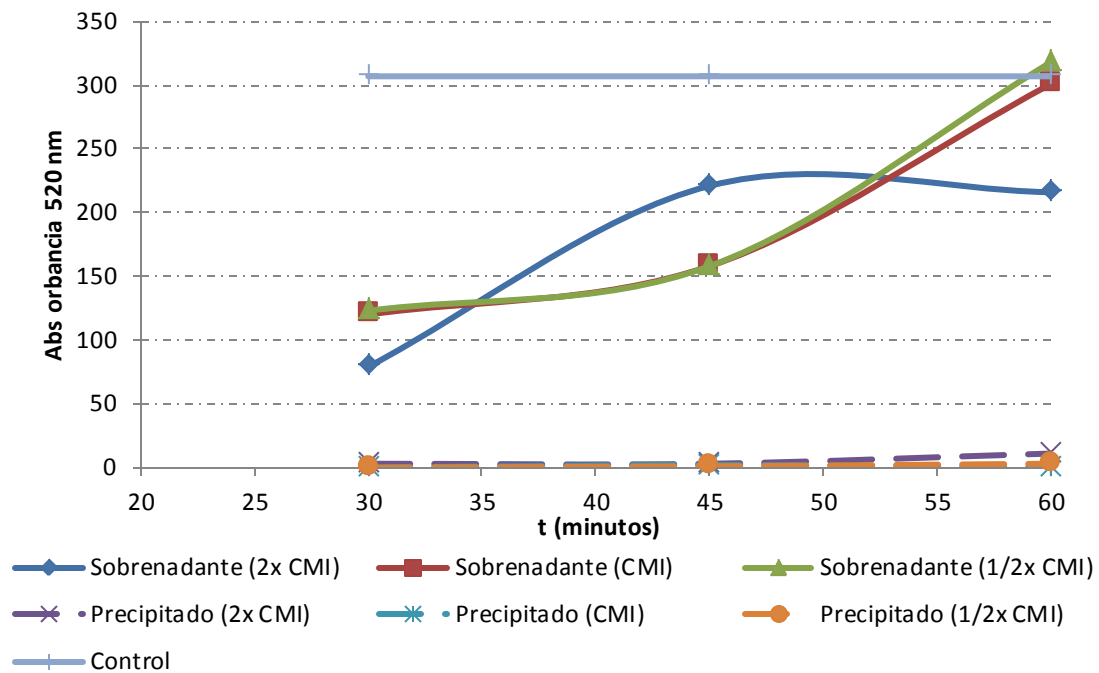
Gráfica 6. Cinética de la fuga del marcador (CFDA) cuando se adiciona enterocina22.



Gráfica 7. Cinética de la fuga del marcador (CFDA) cuando se adiciona pediocina133.



Gráfica 8. Cinética de la fuga del marcador (CFDA) cuando se adiciona enterocina29.



Gráfica 9. Cinética de la fuga del marcador (CFDA) cuando se adiciona Nisina.

6.9 Micrografías.

Para complementar los resultados obtenidos, se realizaron observaciones en un microscopio electrónico de transmisión (TEM), cuyas imágenes fueron procesadas con el software ImageJ® v.1.46r (Rasband, 1997-2012). Las imágenes de la 8 a la 11, muestran las células de *Listeria innocua* ATCC33090 sin tratamiento (ausencia de las bacteriocinas), se puede observar que las células están íntegras tanto en la pared celular como en la membrana citoplasmática durante la fase logarítmica de crecimiento. Hay que señalar que las micrografías deben ser interpretadas de manera correcta ver el anexo C, en donde se incluyen algunos ejemplos de cómo interpretarlas.



Imagen 8. Micrografía de *Listeria innocua* ATCC33090 sin tratamiento en el TEM. (80 Kv, 10 000x).

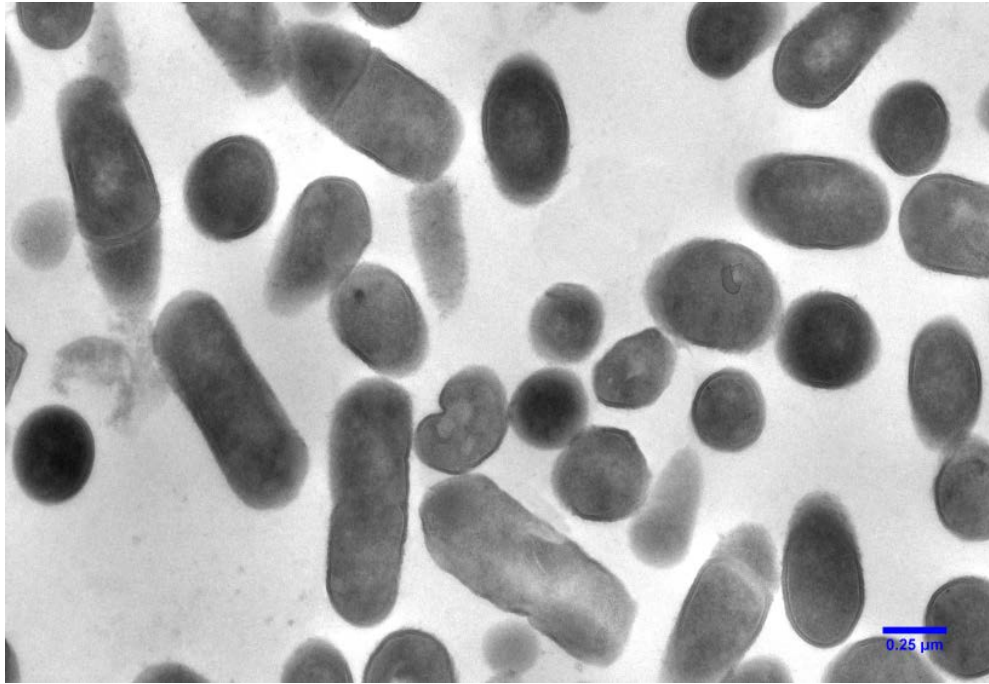


Imagen 9. Micrografía de *Listeria innocua* ATCC33090 sin tratamiento en el TEM.
(80 Kv, 5 000x).



Imagen 10. Micrografía de *Listeria innocua* ATCC33090 sin tratamiento en el TEM.
(80 Kv, 7 500x).

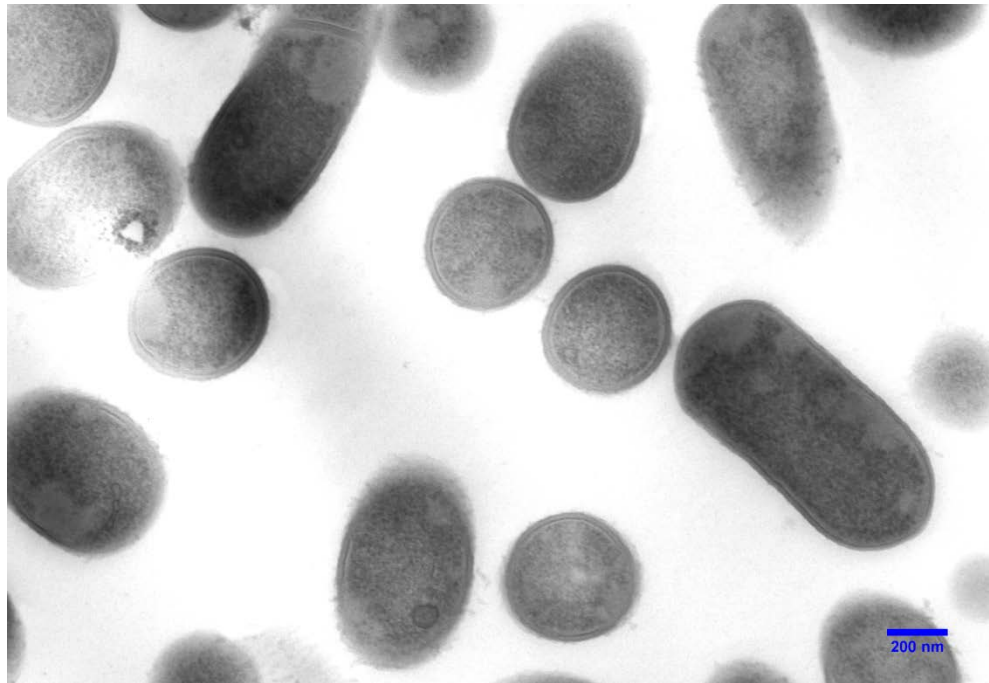


Imagen 11. Micrografía de *Listeria innocua* ATCC33090 sin tratamiento en el TEM. (80 Kv, 6 000x).

En las imágenes 12 – 14 se observan las micrografías de las células de *Listeria innocua* ATCC33090 tratadas con la bacteriocina nisina (control positivo); las imágenes muestran un conglomerado (indicado con flechas) entre las células, que posiblemente puede ser la nisina formando oligómeros alrededor de las bacterias (McAuliffe *et al.*, 2001), que se adhiere a la pared celular del microorganismo sensible. En la imagen 13, las partes más oscuras, al interior de las células posiblemente sea material genético ya que el OsO_4 es muy afín a este (Ayache *et al.*, 2010).

En la imagen 14, se puede apreciar como lo que posiblemente sea la nisina esta incrustada en la pared celular de la célula que se encuentra en el centro de la fotografía (con el núcleo más oscuro) y como se empieza a fugar el material genético (indicado con una flecha).

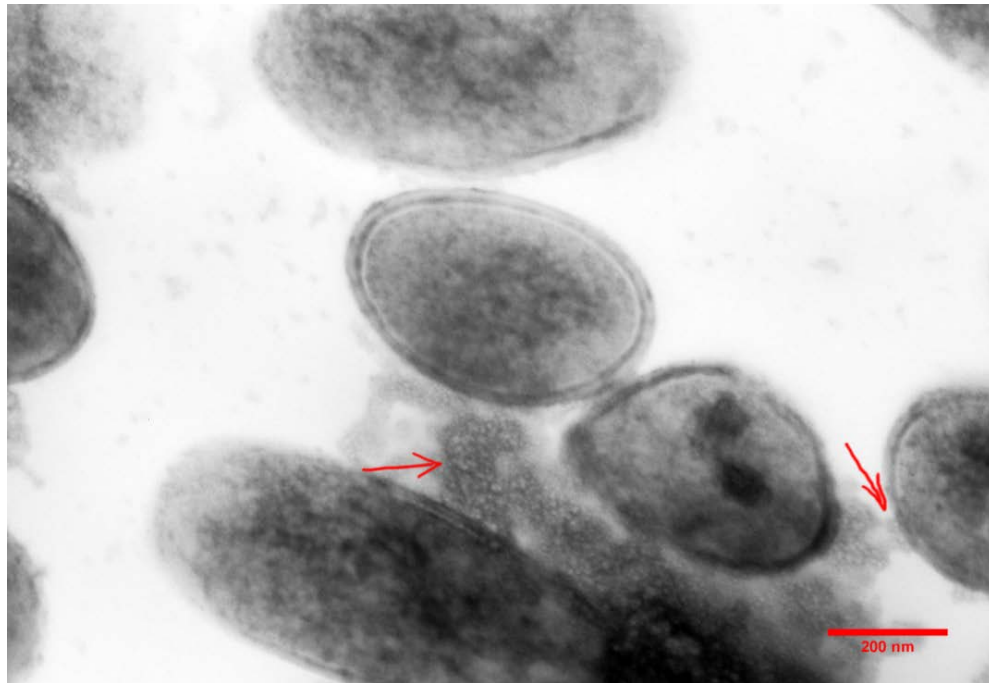


Imagen 12. *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.66 UA/mL de Nisina en el TEM.
(80 Kv, 12 000x).

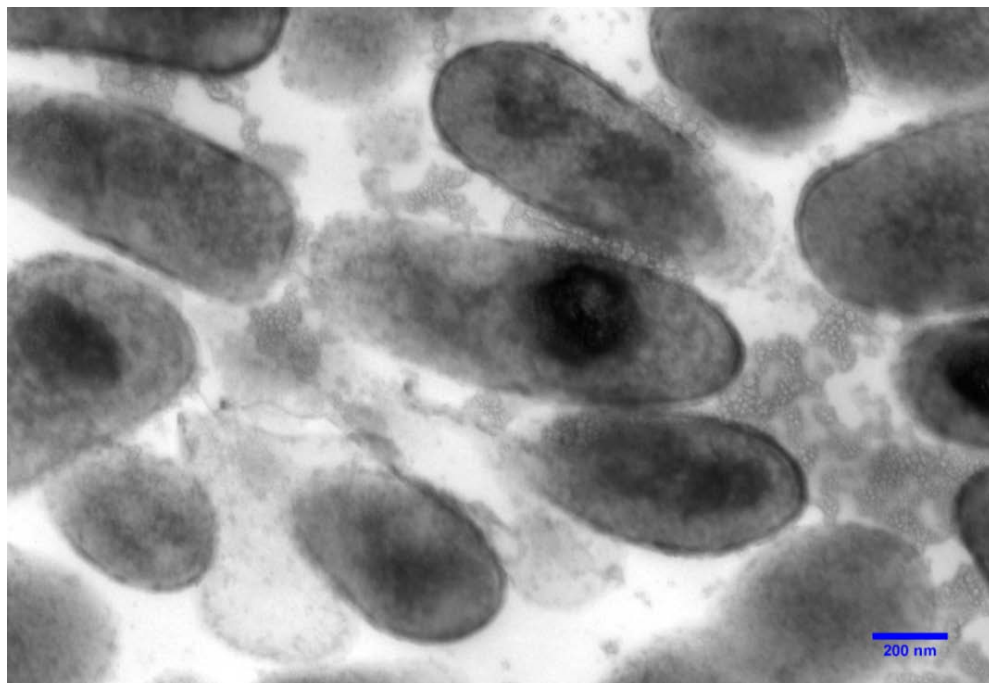


Imagen 13. *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.66 UA/mL de Nisina en el TEM.
(80 Kv, 7 500x).



Imagen 14. *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.66 UA/mL de Nisina en el TEM.
(80 Kv, 7 500x).

En las imágenes 15 – 16 se observa el conglomerado antes mencionado, así como algunas células lisadas, trozos de pared y membrana celular (flechas).



Imagen 15. *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.66 UA/mL de Nisina en el TEM.
(80 Kv, 7 500x).

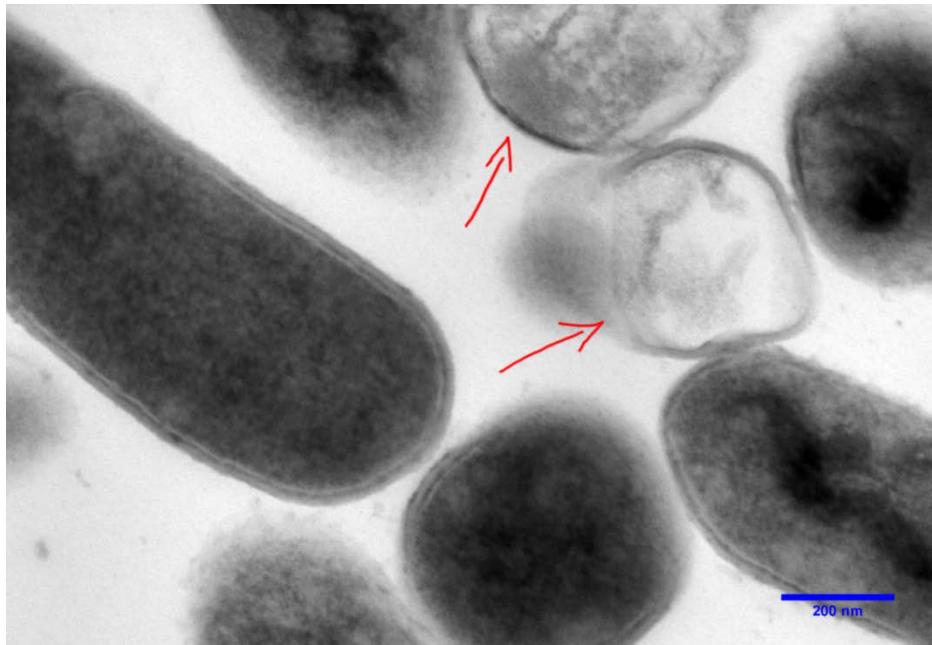


Imagen 16. *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.66 UA/mL de Nisina en el TEM. (80 Kv, 12 000x).

En la imagen 17 se observa como el contenido celular se vierte de las células, así como células deformadas a causa de la aplicación de nisina.

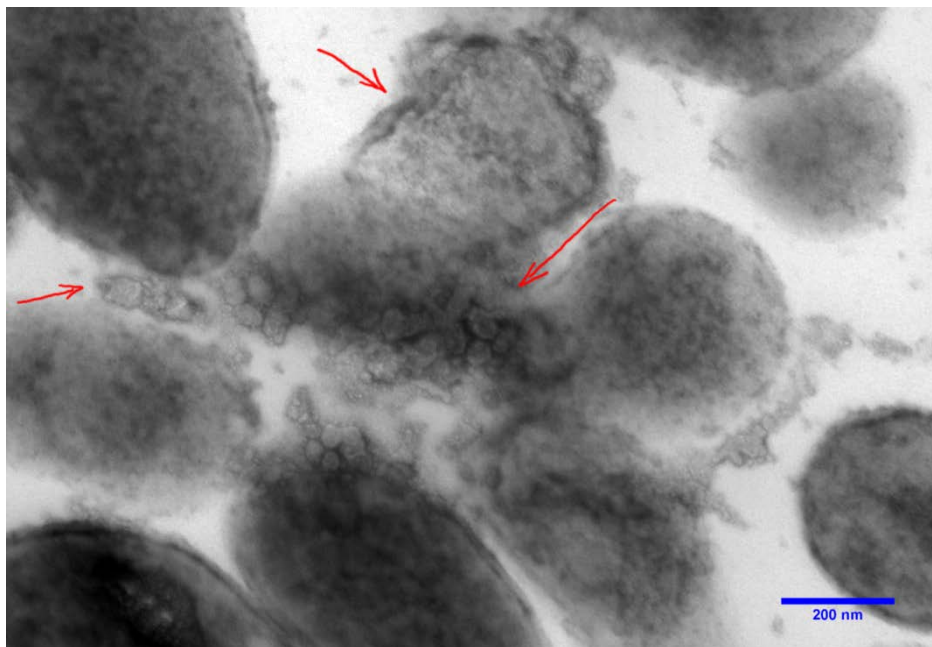


Imagen 17. *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.66 UA/mL de Nisina en el TEM. (80 Kv, 12 000x).

Las imágenes 18 – 19 muestran el daño causado en la pared y membrana celular de *Listeria innocua* ATCC33090, causando la fuga del material intracelular.



Imagen 18. *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.66 UA/mL de Nisina en el TEM. (80 Kv, 12 000x).



Imagen 19. *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.66 UA/mL de Nisina en el TEM. (80 Kv, 12 000x).

Las imágenes 20 – 22 se observa la presencia de un conglomerado producido posiblemente por la pediocina133 que se adhiere a la membrana celular, indicado con las flechas. La imagen 22 es un acercamiento de la imagen 21 en la que se detalla fuga del material intracelular de *Listeria innocua*.

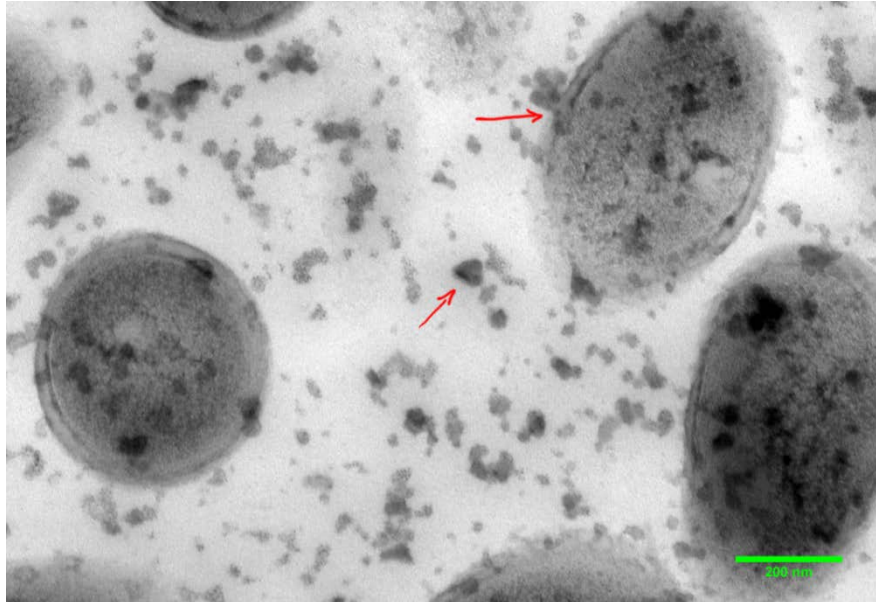


Imagen 20. *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.56 UA/mL de pediocina133 en el TEM (80 Kv, 12 000x).

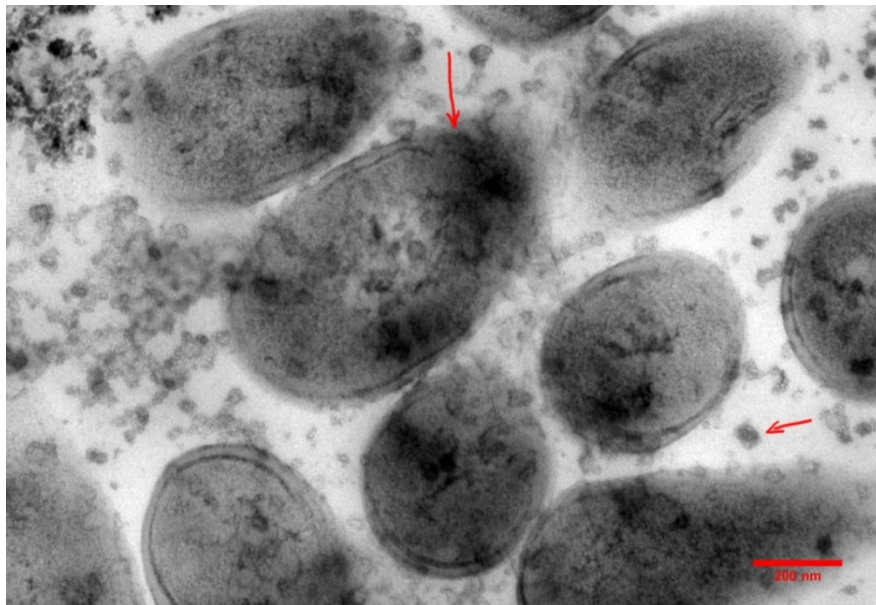


Imagen 21. *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.56 UA/mL de pediocina133 en el TEM. (80 Kv, 10 000x).

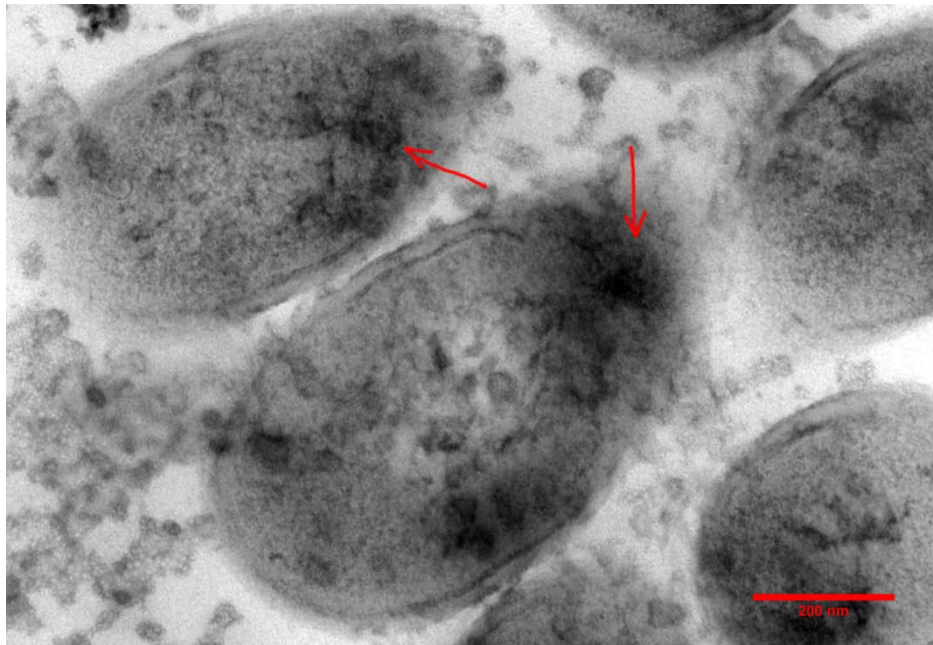


Imagen 22. *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.56 UA/mL de pediocina133 en el TEM. (80 Kv, 15 000x).

En las imágenes 23 – 27 se indica con flechas la fuga del material intracelular, así como el daño sobre la pared celular y algunas células sin contenido intracelular.

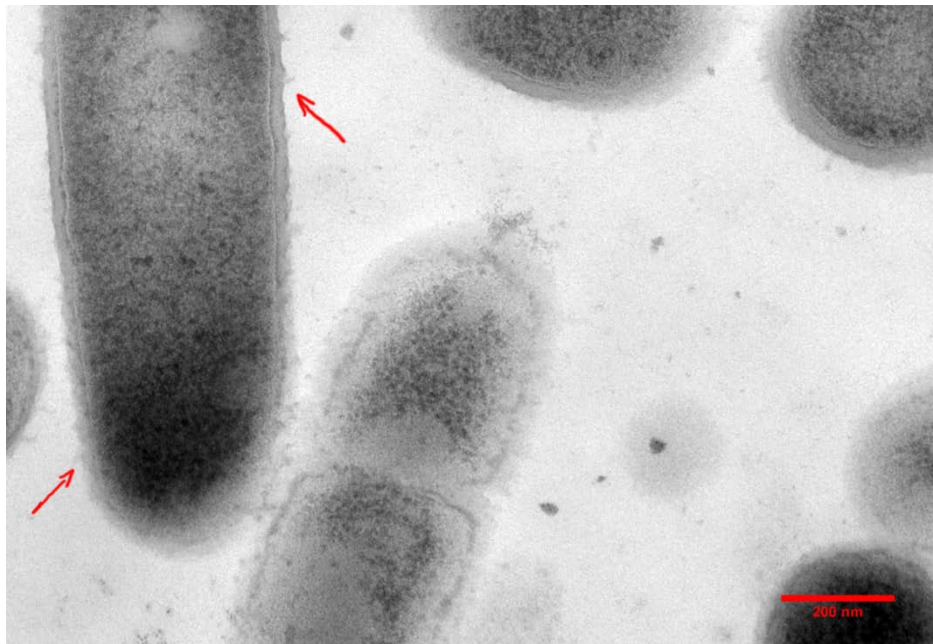


Imagen 23. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.56 UA/mL de pediocina133 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 12 000x).



Imagen 24. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.56 UA/mL de pediocina133 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 12 000x).

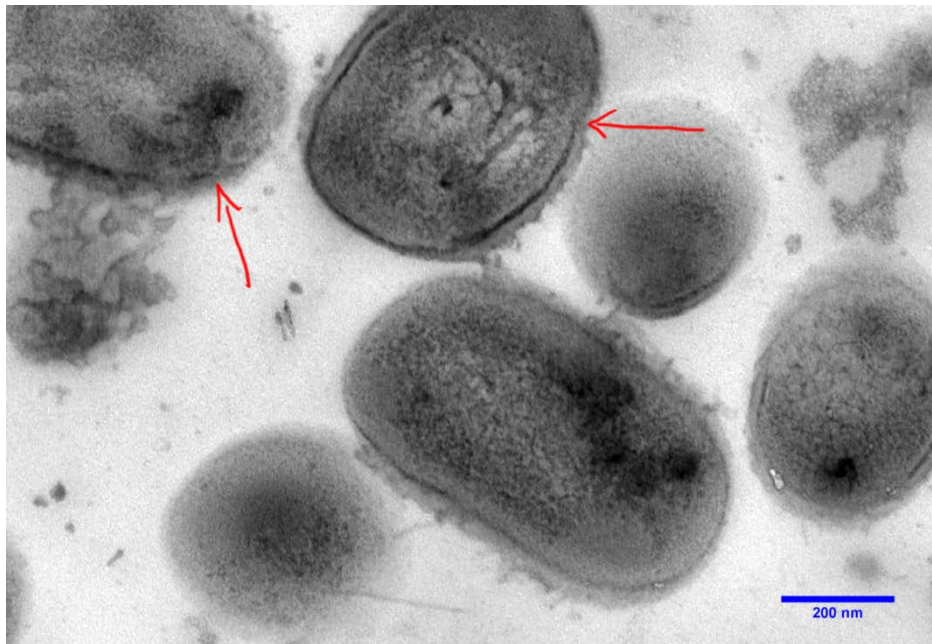


Imagen 25. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.56 UA/mL de pediocina133 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 12 000x).

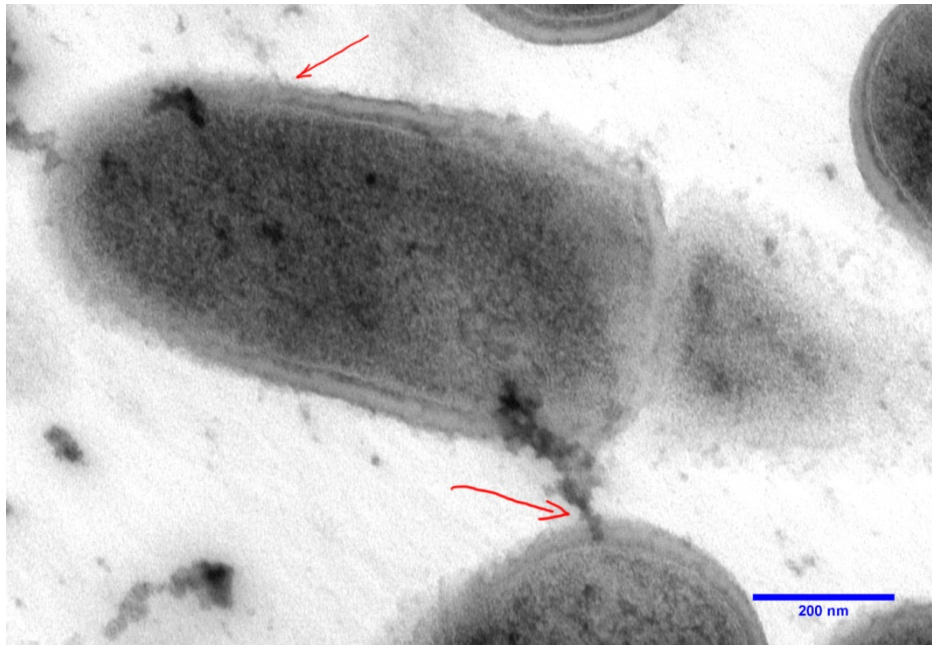


Imagen 26. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.56 UA/mL de pediocina133 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 15 000x).



Imagen 27. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.56 UA/mL de pediocina133 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 12 000x).

Las imágenes 28 – 35 se señala con flechas la fuga del material intracelular, causada por la aplicación de la enterocina29, alguna membrana y pared celular vacía.

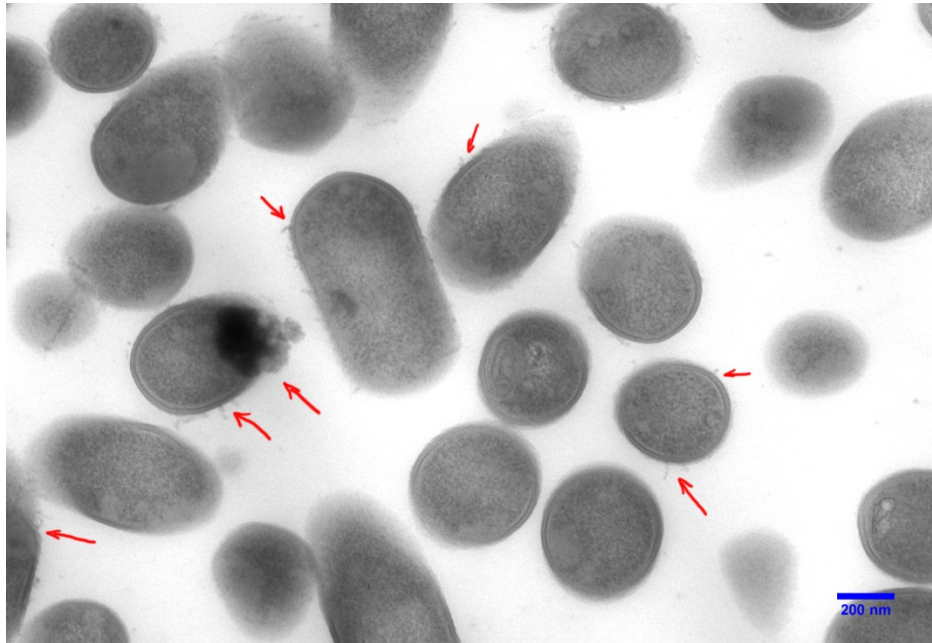


Imagen 28. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.56 UA/mL de enterocina29 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 6 000x).

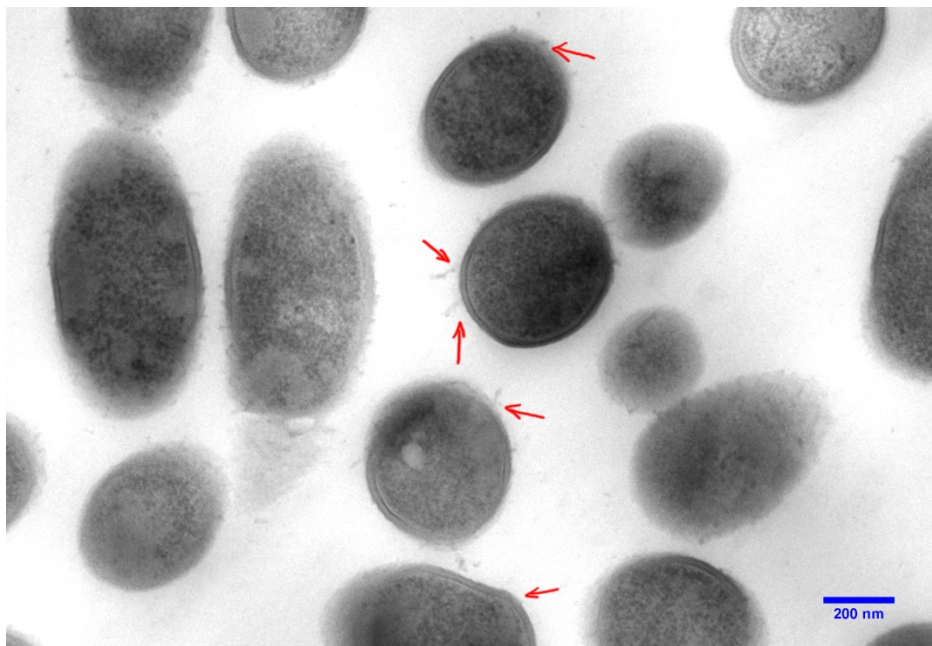


Imagen 29. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.56 UA/mL de enterocina29 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 7 500x).



Imagen 30. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.56 UA/mL de enterocina29 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 7 500x).



Imagen 31. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.56 UA/mL de enterocina29 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 10 000x).



Imagen 32. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.56 UA/mL de enterocina29 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 10 000x).

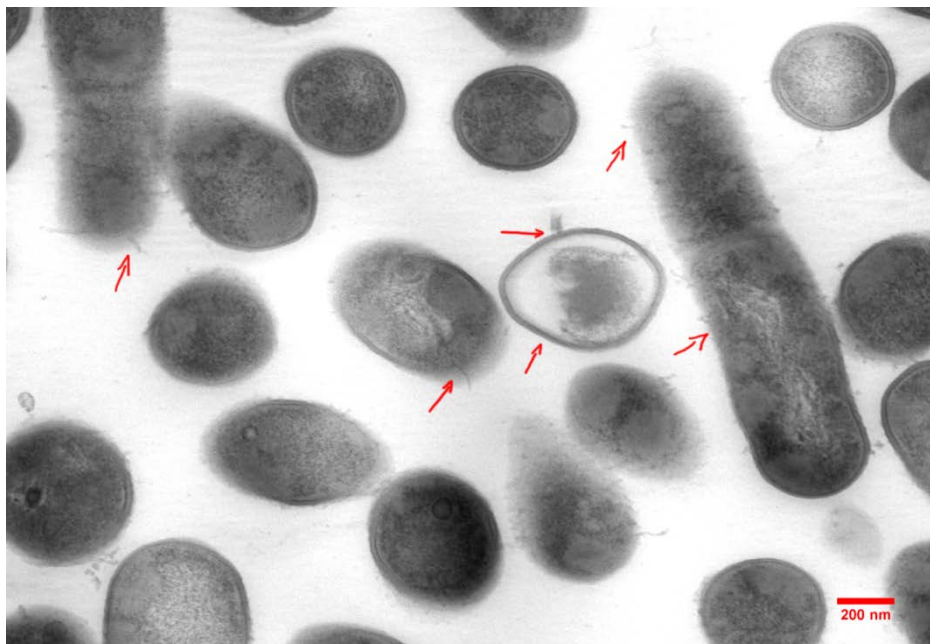


Imagen 33. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.56 UA/mL de enterocina29 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 6 000x).



Imagen 34. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.56 UA/mL de enterocina29 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 6 000x).

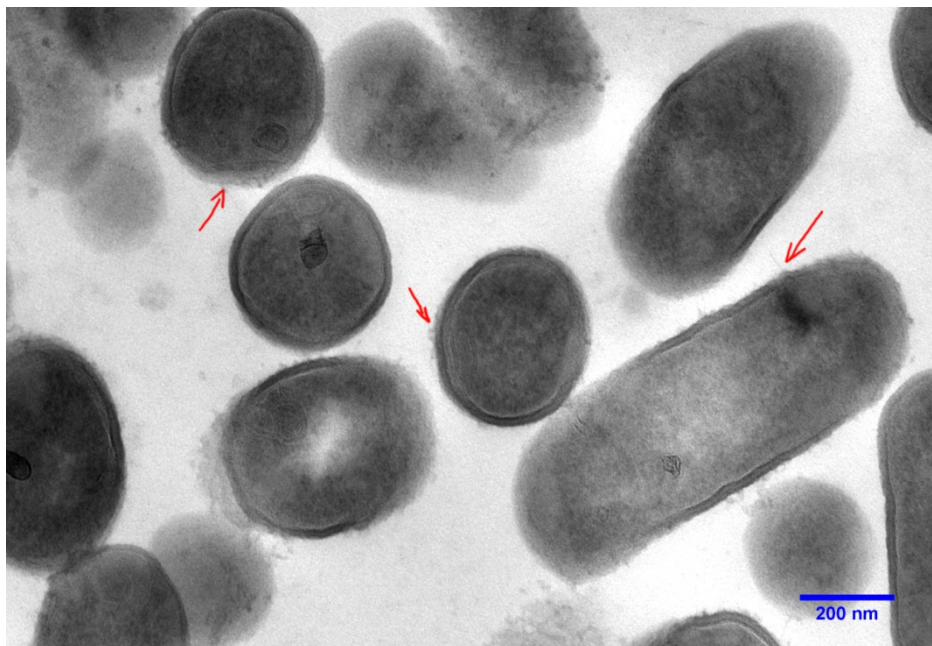


Imagen 35. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.56 UA/mL de enterocina29 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 10 000x).

Las imágenes 36 – 43 se observa el efecto sobre *Listeria innocua* ATCC33090 producido por la enterocina 22. Se ven celular vacías, con daño en la membrana y pared celular.



Imagen 36. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.24 UA/mL de enterocina22 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 10 000x).

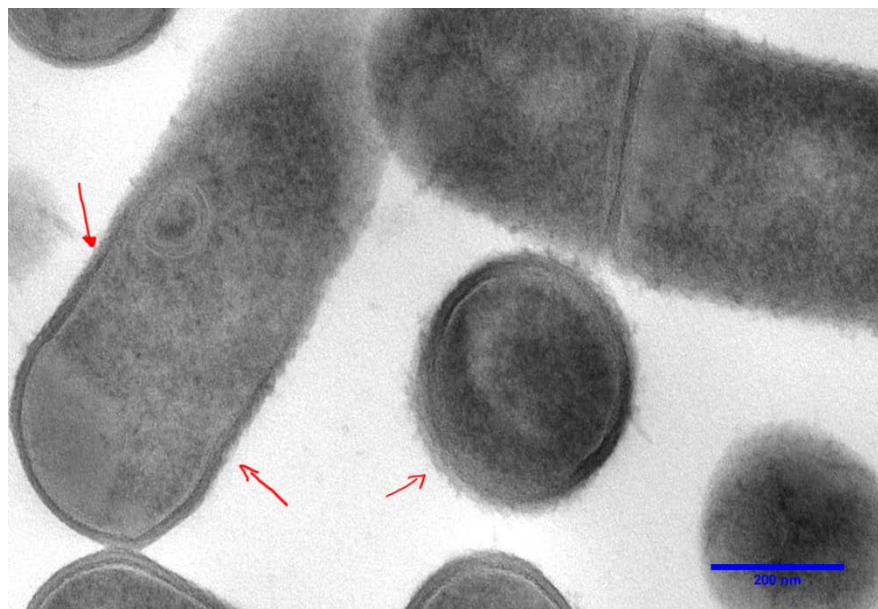


Imagen 37. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.24 UA/mL de enterocina22 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 15 000x).

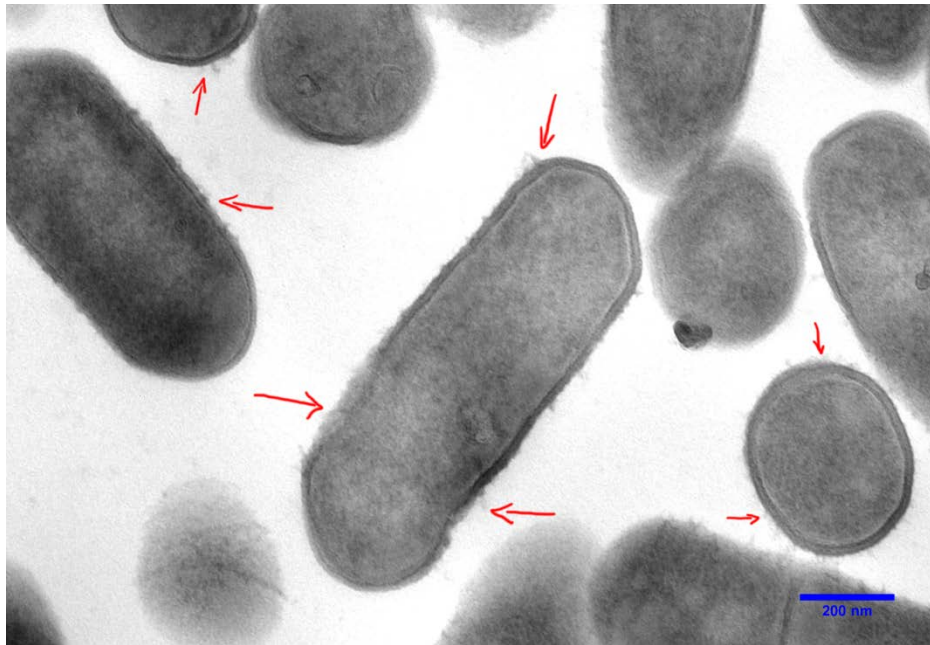


Imagen 38. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.24 UA/mL de enterocina22 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 10 000x).

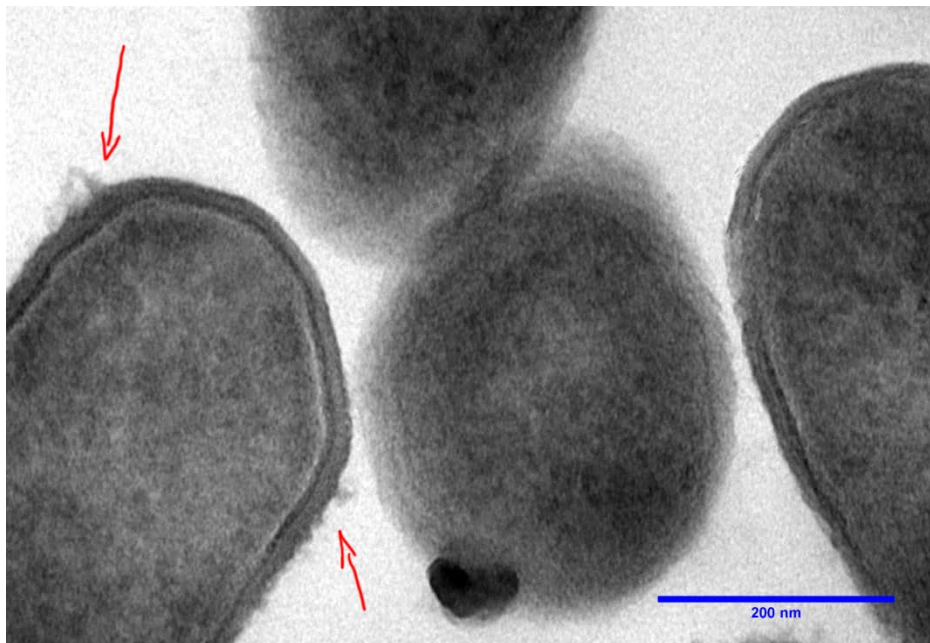


Imagen 39. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.24 UA/mL de enterocina22 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 25 000x).

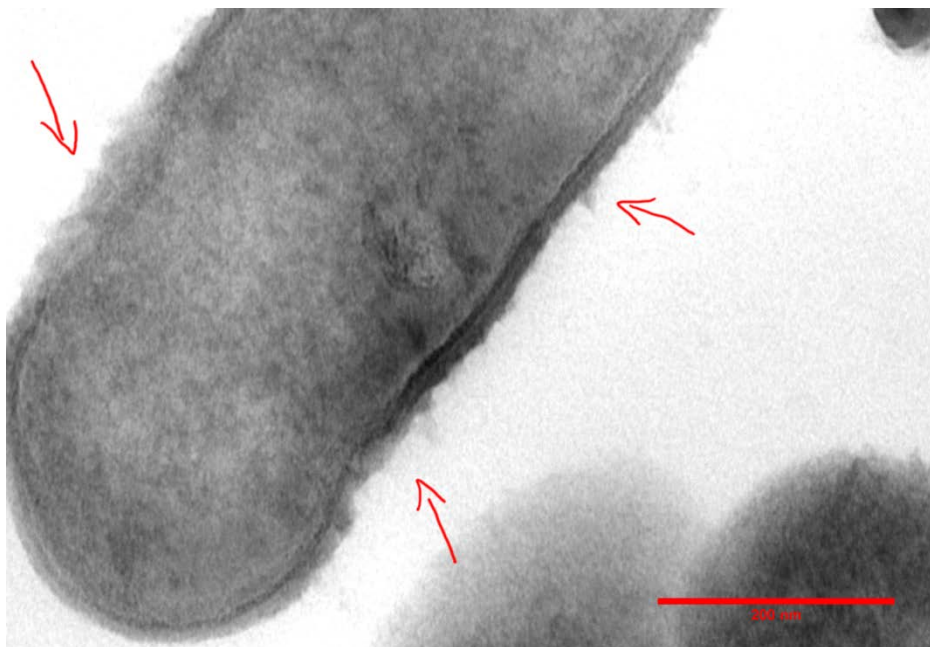


Imagen 40. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.24 UA/mL de enterocina22 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 25 000x).



Imagen 41. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.24 UA/mL de enterocina22 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 10 000x).

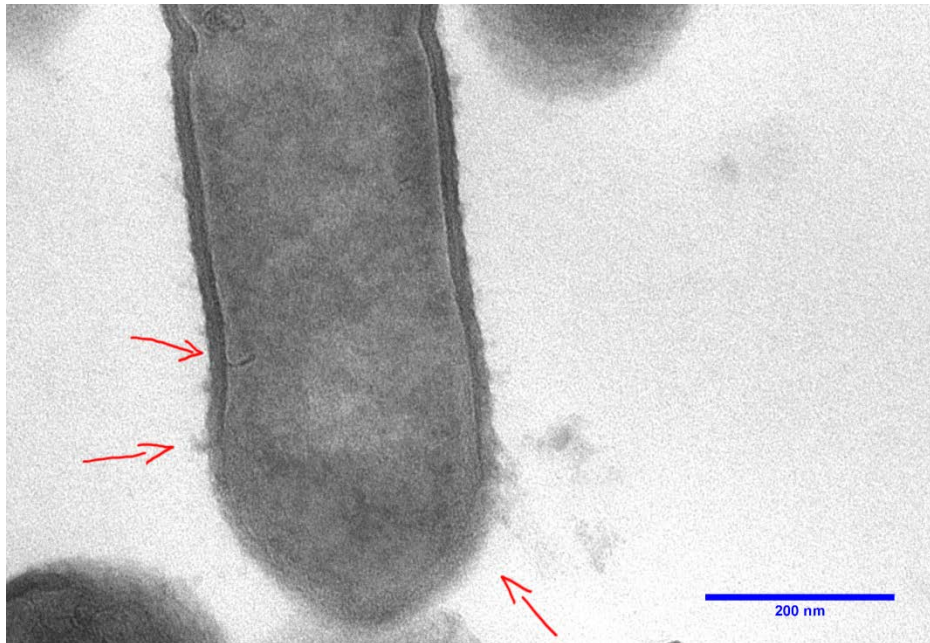


Imagen 42. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.24 UA/mL de enterocina22 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 20 000x).

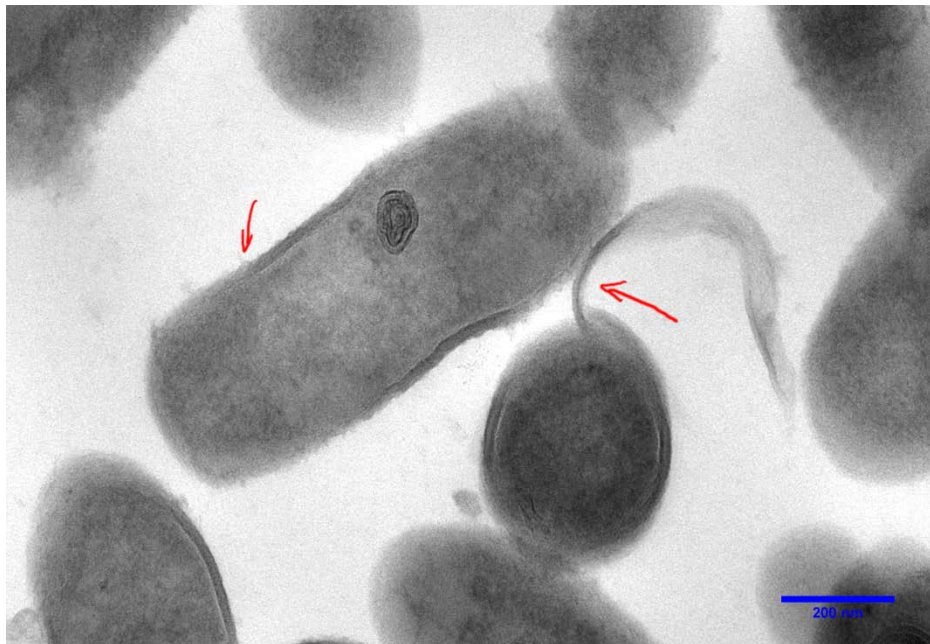


Imagen 43. Morfología de *Listeria innocua* ATCC33090 tratada con 66.24 UA/mL de enterocina22 bajo el microscopio electrónico de transmisión. (80 Kv, 12 000x).

7. Conclusiones

- Se corroboró la formación de poros en la membrana celular de las células de *Listeria*, por la adición de cada una de las 3 bacteriocinas analizadas, debido a que se detectó la fuga del material intracelular por UV, la salida de la carboxifluoresceína de las células de *Listeria*, así como por la observación directa de las células tratadas en el microscopio de transmisión electrónica.
- Es posible que el mecanismo de acción de la pediocina 133, enterocina 22 y 29 sea de tipo IIA, ya que la disminución en la carga microbiana de 2 ciclos logarítmicos contra *Listeria* indica que son menos eficaces que la nisina y tienen una acción bacteriostática. También porque las micrografías de las enterocinas 22 y 29 y la pediocina 133 no muestran trozos de membrana y pared celular como las de la nisina.
- Adicionalmente la recuperación de las células expuestas a la pediocina 133, enterocina 22 y 29 prueba que el mecanismo de acción no causa la muerte celular, a diferencia de la nisina, lo cual puede ser debido a que la nisina tiene un mecanismo de acción del tipo IA que actúa sobre la membrana y la pared celular.
- La determinación del mecanismo de acción, está dada por un conjunto de características, por lo que con base en los resultados obtenidos en este trabajo (como la inhibición de *Listeria innocua* y la fuga del material intracelular causada por el daño en la membrana celular, visible en las micrografías del microscopio óptico de transmisión), aunado a los obtenidos por Álvarez, *et al.* (2010) y Schenider, (2005) quienes observaron una inhibición característica de las bacteriocinas IIA y la presencia de una secuencia de aminoácidos (YGNGV), se concluye que el mecanismo de acción de la pediocina 133, y las enterocinas 22 y 29 es del tipo IIA.

Perspectivas

Si bien los datos reportados en esta tesis presentan un avance en la caracterización general de las enterocinas 22 y 29, así como la pediocina 133 y apuntan a que el mecanismo de acción es del tipo IIa; aún resta la profundización sobre sus efectos toxicológicos, así como su obtención de manera eficiente.

Por otra parte también es necesario obtener mayores datos de las micrografías obtenidas en este trabajo, ya que los conglomerados observados pueden ser las bacteriocinas estudiadas o pueden ser material intracelular, por lo que se requieren micrografías de los péptidos solos, así como del material intracelular.

La utilización del microscopio electrónico de barrido puede aportar datos más detallados de la formación de poros, ya que se generan imágenes en 3D, sin embargo para su uso es mejor el empleo de bacteriocinas con un alto grado de purificación.

Bibliografía

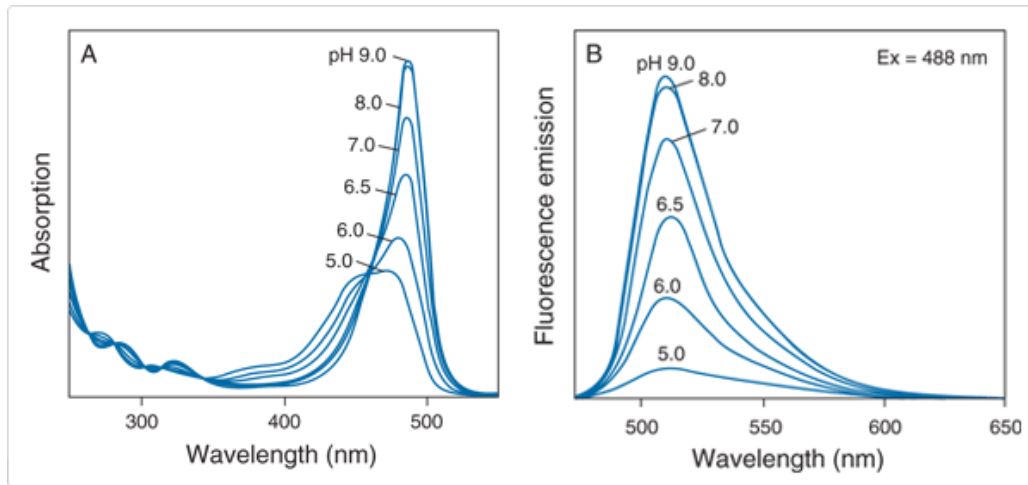
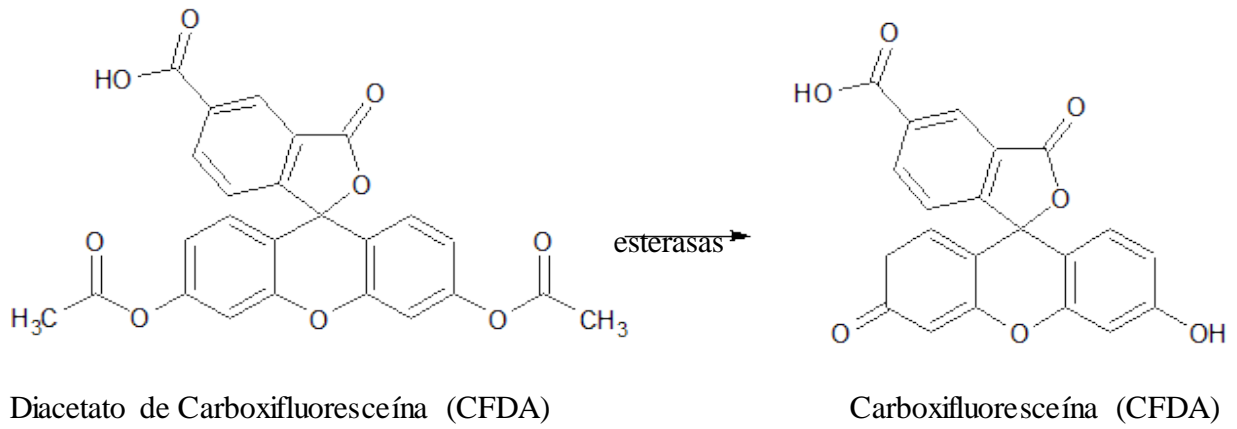
- Aguado Bautista, L. (2011). *Estudio de la combinación de la bacteriocina 29 con conservadores comerciales sobre la calidad sanitaria de una emulsión cárnica*. Tesis, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Aguado Bautista, L. A., Álvarez Cisneros, Y. M., & Ponce Alquicira, E. (2010). Evaluación del efecto antimicrobiano in vitro del extracto crudo de bacteriocina en combinación con conservadores químicos utilizados en la industria cárnica. *Nacameh*, 4(2), 69-84.
- Álvarez Cisneros, Y. M. (2011). *Aspectos de seguridad de Enterococcus faecium MXVK29 y Enterococcus faecalis MXVK22 aislados de productos cárnicos y caracterización molecular de sus bacteriocinas*. Tesis, Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa, México, D.F.
- Álvarez-Cisneros, Y. M., Fernández, F. J., Wachter-Rodarte, C., Del Rosario Sáinz E., T., & Ponce-Alquicira, E. (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.
- Ayache, J., Beaunier, L., Boumendil, J., Ehret, G., & Laub, D. (2010). *Sample preparation handbook for transmission electron microscopy - Methodology*. New York: Springer.
- Baranyi, J. & DMFit. *Software de modelamiento dinámico, plugin para Microsoft Office*. Institute of Food Research, <http://www.ifr.ac.uk/safety/dmfit/>.
- Baranyi, J., Roberts, T. A., & Baranyi, J. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3), 277-294.
- Bhunia, A., Johnson, M., Ray, B., & Kalchayanad, N. (1991). Mode of action of pediocin AcH on sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Bacteriology*(70), 25-33.
- Cassens, R. G. (1996). Preservation against what. En *Meat preservation - Preventing losses and assuring safety* (Vol. 4, págs. 46, 61, 62). U.S.A.: Food and Nutrition Press.
- Chen, H., & Hoover, D. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*(2), 81-100.
- Chikindas, M. L., García-Garcera, M. J., Driessen, A. J., Ledebøer, M. A., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., y otros. (1993). Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11), 3577-3584.
- Chikindas, M., Chi-Zang, Y., & K.L., Y. (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.
- Cintas, L., Casaus, M., Herranz, C., Nes, I., & Hernández, P. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*(74), 281-305.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, L. F., & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20.
- Clinton, J. (1971). Biological Techniques in Electron Microscopy. En *International Textbook Series* (pág. 63). Florida, U.S.A.
- Cotter, P., Hill, C., & Ross, R. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Microbiology Reviews*(3), 777-788.

- Dykes, G., & Hastings, J. (1998). Fitness cost associated with class IIa bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* b73. *Letters in Applied Microbiology*(26), 5-8.
- El-Ziney, M., Debevere, J., & Jakobsen, M. (2000). Reuterin. En A. Naidu (Ed.). London: CRC Press.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., & Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.*(24), 85-106.
- Faruk, B. T., & Bibek, R. (1996). *Lactic acid bacteria*. Berlin, Alemania.
- Franz, C. A., Van Belkum, M. J., Holzapfel, W. H., Abriouel, H., & Gálvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 293-310.
- Gálvez, A., Abriouel, H., & Lucas, R. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*(120), 51-70.
- García Rodríguez, J. A., & Gómez-Lus, M. L. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En J. J. Picazo (Ed.), *Procedimientos en microbiología clínica* (Vol. 11, págs. 18-24). España: SEIMC.
- Heng, N. C., & Tagg, J. R. (2006). Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*, 4, C1-C2.
- Heng, N. C., Wescombe, P. A., & Burton, J. P. (2007). The Diversity of bacteriocins in Gram positive bacteria. En M. Riley, & M. Chavan (Edits.), *Bacteriocins: Ecology and Evolution* (págs. 54, 55, 69 - 80). Heidelberg: Springer-Verlag.
- Holzapfel, W. H., Geisen, R., & Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to proactive cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*(24), 343-362.
- Jack, R., Tagg, J., & Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiological Reviews*(59), 171-200.
- Katla, T., Netersatd, K., Vancanneyt, M., Swings, J., & Axelsson, L. (2003). Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to Sakacin P, Sakacin A, Pediocin PA-1 and Nisin. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4431-4473.
- Klaenhammer, T. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*(12), 39-86.
- Leistner, L., & Gould, G. (2005). Capítulo 19: Update on hurdle technology approaches to food preservation. En P. Davidson, J. Sofos, & A. Branen (Edits.), *Antimicrobials in food* (págs. 621, 624, 629-630). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Life Technologies, & Haugland, R. (2010). *Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labelling Technologies* (11 ed.). (L. Johnson, & M. Spence, Edits.) Life Technologies.
- Magnuson, J., & Schnürer, J. (67). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 1-5.
- McAuliffe, O., Ross, R., & Hill, C. (2001). Lantibiotics: Structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(3), 285-308.
- Mustapha, A., Ariyapitipun, T., & Clarke, A. (2002). Survival of *Escherichia coli* 0157:H7 on vacuum-packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid and nisin. *Journal of food science*(67), 262-267.

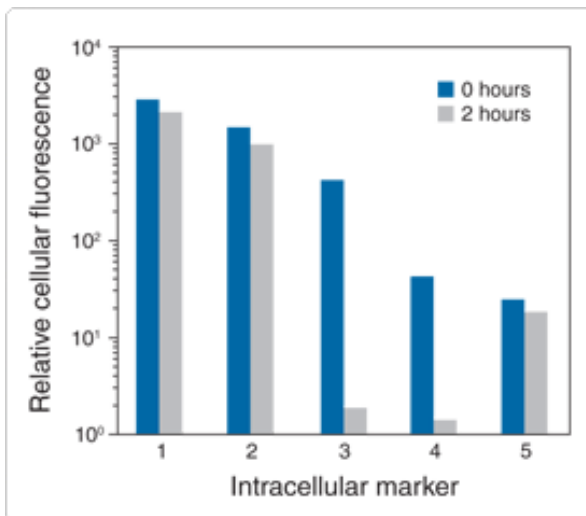
- Nes, I., & Holo, H. (2000). Class II antimicrobial peptides from lactic bacteria. *Biopolymers*, 55, 50-61.
- Nettles, C. (1993). Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 56, 338-356.
- Price, F. J., & Schweigert, S. B. (1994). *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. Zaragoza, España: Acribia.
- Pucci, M., Vedamuthu, E., Kunka, B., & Vandenberg, P. (1988). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10), 2349-2353.
- Raloff, J. (1998). Staging germ warfare in foods. *Science News*(153), 89-90.
- Rasband, W. S. ImageJ. <http://imajej.nih.gov>. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- Regininni Sirtori, L., De Souza da Motta, A., & Brandelli, A. (2008). Mode of Action of Antimicrobial peptide P45 on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Basic Microbiology*(48), 393-400.
- Rekhif, N., Atrih, A., & Lefebvre, G. (1994). Selection and properties of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains. *Current Microbiology*(28), 237-241.
- Riley, M., & Wertz, J. (2002). Bacteriocins: Evolution, Ecology and Application. *Annual Review of Microbiology*(56), 117-137.
- Rosa, C., Franco, B., Montville, T., & Chikindas, M. (2002). Purification and mechanistic action of a bacteriocin produced by a Brazilian sausage isolate, *Lactobacillus Sake 2a*. *Journal of Food Safety*, 22, 39-54.
- Ross, R. P., Galvin, M., McAuliffe, O., Morgan, S. M., Ryan, M. P., Twomey, D. P., y otros. (1999). Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie Van Leeuwenhoek*(76), 337-346.
- Sahl, H., & Bierbaum, G. (1998). Lantibiotic - Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annual reviews of microbiology*(52), 41-47.
- Schillinger, U., & Lücke, F. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*(55), 1901-1906.
- Schneider Schanzenbach, R. (2005). *Caracterización bioquímica y molecular de las bacteriocinas producidas por *Pediococcus parvulus* MXVK133 y *Enterococcus faecalis* MXVK22 aisladas de productos cárnicos mexicanos*. Tesis, Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa, México, D.F.
- Schöbitz T., R. (2006). *Bacteriocinas y su aplicación en alimentos*. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Silva Rivas, R. N. (2004). *Acción antimicrobiana de dos bacteriocinas lácticas sobre *Listeria monocytogenes* adherida a una superficie de acero inoxidable*. Tesis, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Song, H., & Richard, J. (1997). Antilisterial activity of three bacteriocins used at subliminal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. *International Journal of Food Microbiology*(36).

- Špelina, V., Schelemmerová, L., Landfeld, A., Kýchos, K., Měříčka, P., & Houška, M. (2007). Thermal inactivation of enterococcus faecium. *Czech Journal of Food Science*, 25(5), 283-290.
- Tagg, J., Dajani, A., & Wannamaker, L. (1976). Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriol*(40), 722-756.
- Van Belkum, M., & Stiles, M. (2000). Nonantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Natural product reports*(17), 323-335.
- Vicent, J., Veomett, R., & Riley, R. (1959). Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. *Bacteriol*(78), 477-484.
- Vignolo, G., Palacios, J., Farias, M., Sesma, F., & Schillinger, U. (2000). Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Current Microbiology*(41), 410-416.
- Wu, C.-W., Yin, I.-J., Hsu, T., & Jiang, S.-T. (2005). Comparative Study on Antibacterial Effect of Pediocin ACCEL and Nisin Against Fluorescence-stained *Listeria monocytogenes* BCRC 14845. *Journal of Food Science*, 70(1), 75-80.
- Yin, L., Wu, C., & Jiang, S. (2003). Bacteriocins from *Pediococcus pentosaceus* L and S from pork meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 1071-1076.
- Yin, L., Wu, C., & Jiang, S. (2004). Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1146-1151.

Anexo A



Dependencia de la fluorescencia respecto al pH. A) absorción B) emisión.



Variación de la fluorescencia de derivados de la fluoresceína respecto al tiempo. El 4 corresponde al CFDA, una vez que es hidrolizado. Fuente: (Life Technologies & Haugland, 2010).

Anexo B - Medios de Cultivo y Formulaciones.

Tabla B1. Composición de medio caldo caseína-glucosa (CCG).

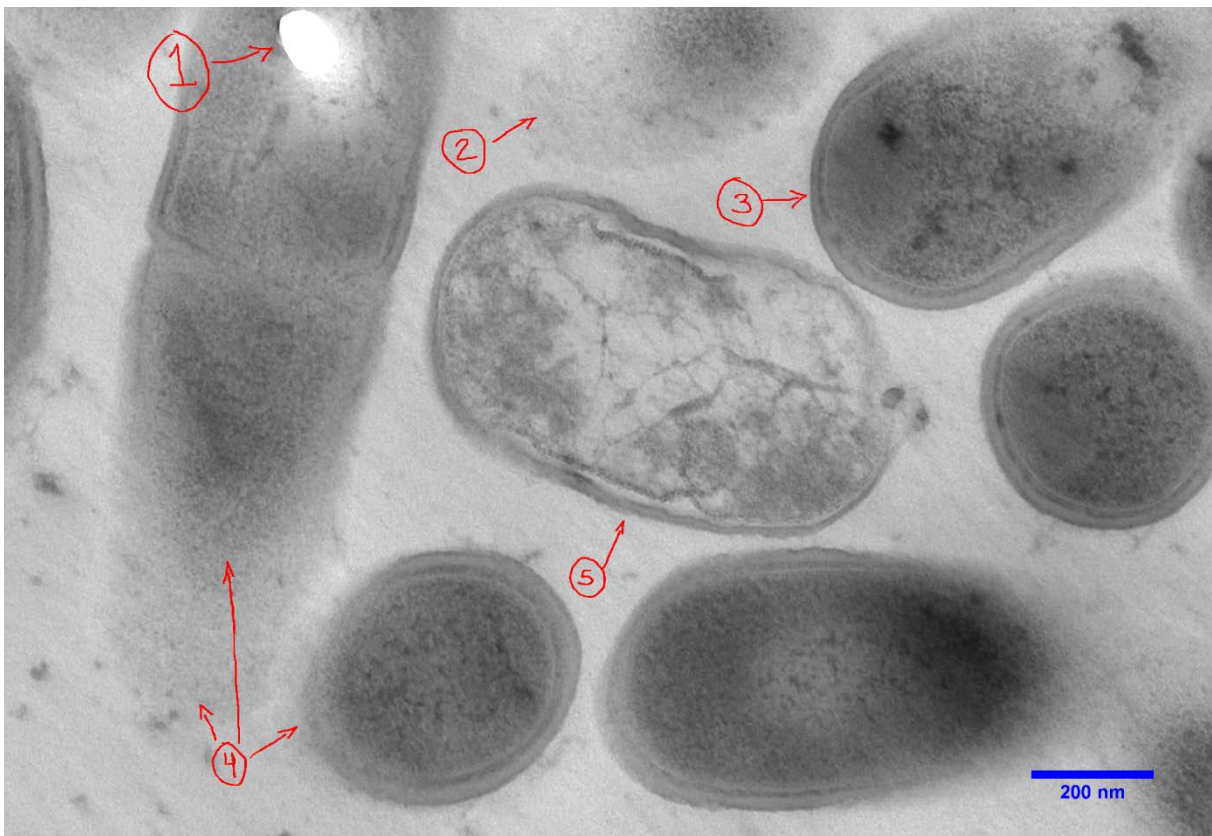
Compuesto	Gramos por litro
Peptona biotriptasa	20
Glucosa	10
Extracto de levadura	5
Citrato de amonio	2
Fosfato disódico	2
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Tween 80	1 mL
pH	7.0

Tabla B2. Composición de medio caldo soya tripticaseina (TSB).

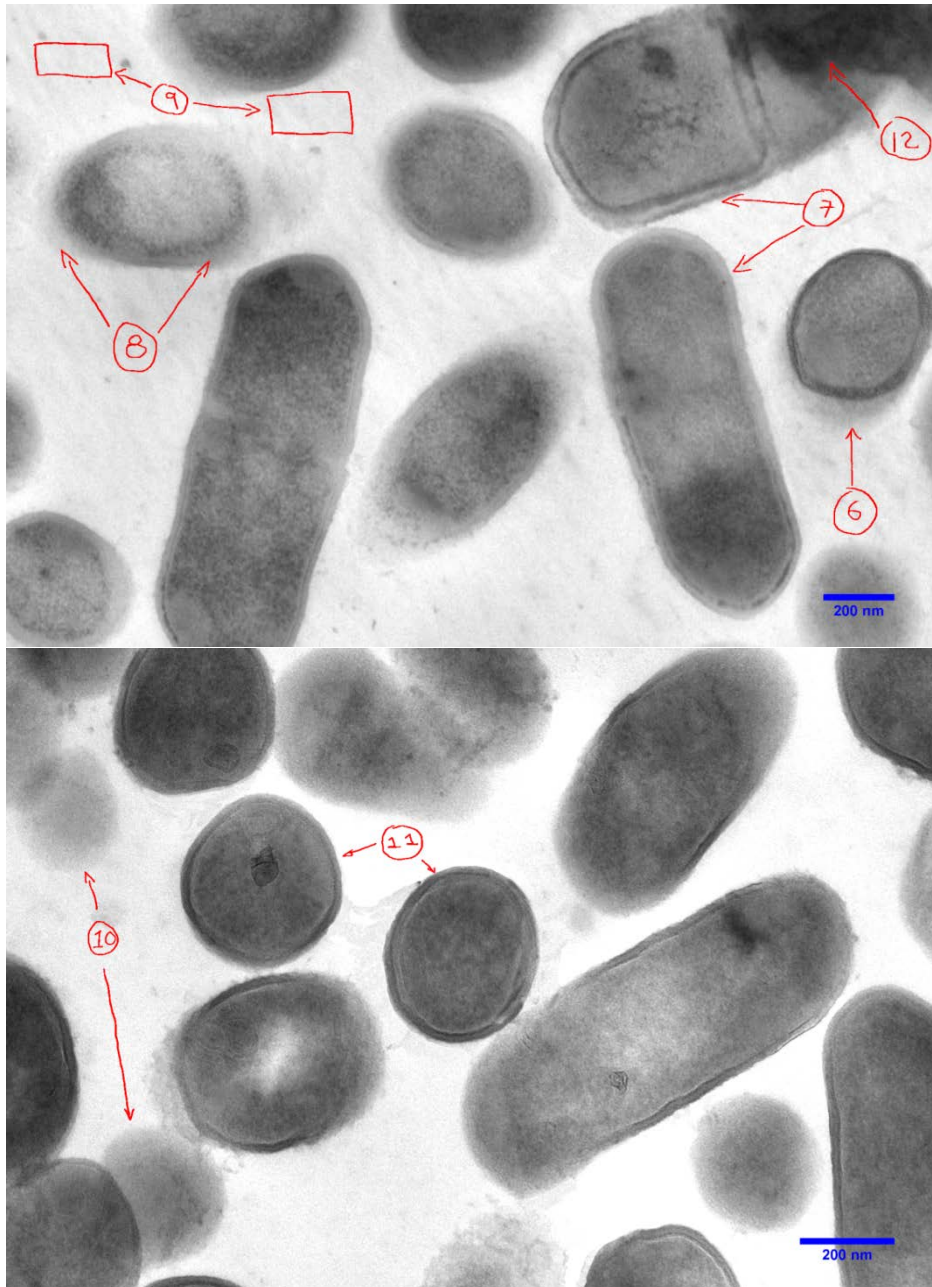
Compuesto	Gramos por litro
Cloruro de sodio	5
Dextrosa	2.5
Fosfato dipotásico	2.5
Peptona de caseína	17
Peptona de soya	3
pH	7.0

Micrografías en práctica

Las siguientes micrografías son de *Listeria innocua* ATCC33090 y que sirven para indicar algunos tips de lo que es válido y lo que no es válido en la lectura de una micrografía, también hay que aclarar que se debe tener una buena bibliografía teórica y práctica sobre TEM.



1. Artefacto generado, porque no se cubrió bien con la resina.
- 2, 4. Sombras, generadas por la posición de las bacterias.
- 3, 5. Membrana y pared celular intactas.

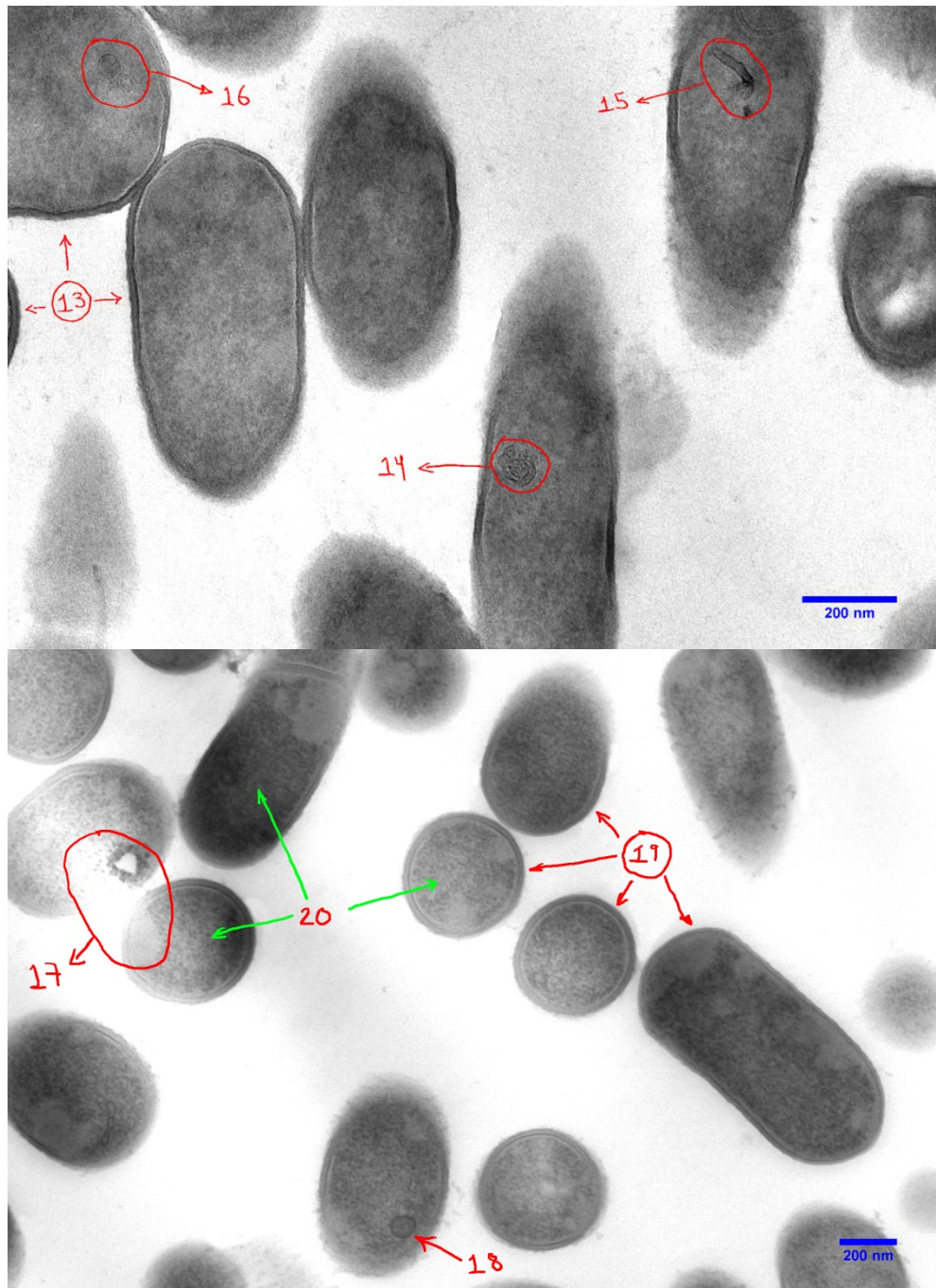


6, 8, 10 Sombras generadas por la posición de las bacterias.

7, 11. Membrana y pared celular intactas.

9. Fondo que aparece según las condiciones de visualización, se considera normal. Sin mayor importancia.

12. Defecto generado durante la preparación de las muestras, exceso de citrato de plomo, se considera normal. Sin mayor importancia.

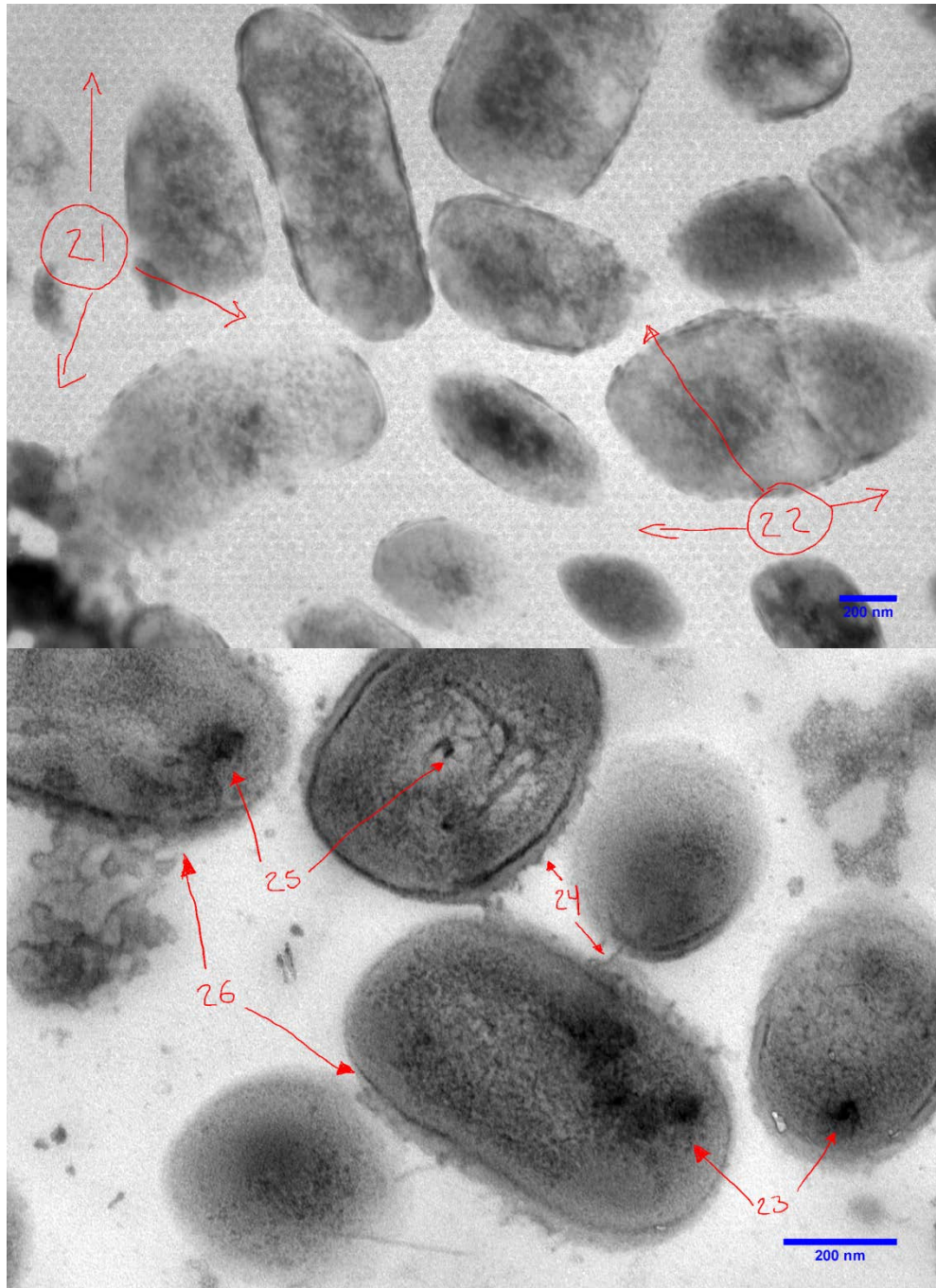


13, 19. Células de *Listeria* normales (sin aplicación de bacteriocina).

14, 15, 16, 18. Posible material genético o plásmidos.

17. Defecto de enfoque de la cámara, se considera normal. Sin mayor importancia.

20. Material intracelular de *Listeria* teñido según la metodología de esta tesis.



- 21, 22. Defecto por enfoque de la cámara (grano), importante, imagen inservible.
 23, 25. Material genético de las células de *Listeria* (zonas más oscuras).
 24, 26. Células de *Listeria* que muestran daño en la pared y membrana celular.

Producción Científica

Presentaciones en congresos internacionales.

1. **L. Aguado Bautista**, Y.M. Álvarez-Cisneros, E. Ponce-Alquicira. (2013) Mechanism of action of bacteriocins produced by lactic acid bacteria against *Listeria innocua* ATCC33090. Congreso Internacional del Institute of Food Technologists del 13 al 16 de Julio en Chicago, Illinois, USA. Poster
2. **Aguado-Bautista L.A.**, Álvarez-Cisneros Y.M., Ponce-Alquicira, E. (2012) Combination of Bacteriocin 29 with Nitrites to Control of *Brochothrix thermosphacta* in Vacuum Packaged Sausage. Congreso Internacional del Food Science and Food Biotechnology In Developing Countries del 24 al 26 de Octubre en Nuevo Vallarta, Nayarit, México. Poster