



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE
COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS POR *ENTEROCOCCUS SP.*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

MYRNA ELENA OLVERA GARCÍA



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Profesor: <u>Olga del Carmen Velázquez Madrazo</u>
VOCAL	Profesor: <u>María Guadalupe Tsuzuki Reyes</u>
SECRETARIO	Profesor: <u>Maricarmen Quirasco Baruch</u>
1er. SUPLENTE	Profesor: <u>Vanessa Rebeca Maya Ampudia</u>
2do. SUPLENTE	Profesor: <u>María del Pilar Granada Macias</u>

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de alimentos y biotecnología. Edificio E laboratorio 312.

Proyecto financiado por el PAPIIT IN213109, "El Queso Cotija: una fuente de compuestos funcionales y de microorganismos importantes en la inocuidad de alimentos". La alumna agradece la beca recibida por este mismo proyecto.

Asesor del tema: _____

Maricarmen Quirasco Baruch

Supervisor técnico: _____

Israel García Cano

Sustentante: _____

Myrna Elena Olvera García



AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue financiada por el proyecto PAPIIT IN213109, "El Queso Cotija: una fuente de compuestos funcionales y de microorganismos importantes en la inocuidad de alimentos". La alumna agradece la beca recibida por este mismo proyecto.

Al Q.F.B. Alejandro Camacho, responsable del Cepario de la Facultad de Química



Agradecimientos

Esta tesis representa el final de una de las etapas más fructíferas de mi vida, así como el principio de un nuevo camino que me obliga a ser mejor. A lo largo de esta experiencia universitaria recibí la ayuda y comprensión de muchas personas que han marcado mi vida.

A mi mami, porque te debo todo. En algún momento debía tener la oportunidad de agradecerte por ser mi madre, mi amiga, mi confidente, mi maestra y sobretodo mi guía en este mundo tan raro. Porque lloraste conmigo y sufriste lo que yo, porque me hiciste reír cuando más triste me sentía y porque para ti siempre fui la mejor.

Papá, por tus palabras de ánimo y esa constante exigencia que me enseñaron a darlo todo. Siempre estuviste ahí para levantarme, cuidarme y darme todo lo que necesitaba. Jamás olvidaré: “prefiero tener una hija sana, que una hija loca”. Siento decirte que tienes a la hija loca.

A mi hermana Vicky por ser mi acompañante. Me has regalado las experiencias más inolvidables. Caminando juntas las cosas siempre serán más divertidas.

A mi hermano David, siempre has sido mi mayor ejemplo. Admiro tu entrega y tu inteligencia.

A Lalo por darle a mi vida todo lo que le faltaba. Porque gracias a ti entendí que siempre hay un mañana y la vida nos da otra oportunidad para hacer bien las cosas y que allá afuera siempre hay algo mejor. Si hoy tuviera que escoger a la persona que me hace más feliz, sin dudarlo te elegiría a ti.

Pero que hubiera sido de mí sin estos amigos. Unos hostiles, otros amargados, divertidos, borrachos, rockeros, inteligentes, cultos, protectores, tontos, con frases célebres, fanáticas de Suecia y de los comics, cursis y sensibles, pésimos en el fútbol y peor en el americano, compañeros en los mejores conciertos y las mejores películas. Piffs, Esteban, Memo, Caro, Alicia, Eva, Pao, Marysol, Paulina y todos los que me faltan, los quiero tanto.



No puedo dejar de mencionar a la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch, por darme la oportunidad de pertenecer su grupo de trabajo. Agradezco enormemente su confianza, las palabras de aliento, la comprensión, el tiempo brindado y los consejos.

A Israel García Cano, futuro doctor en Ciencia Bioquímicas. El éxito de este trabajo te lo debo a ti. Muchas gracias. Te admiro.

Al laboratorio 312, ya que esas 12 horas al día eran casi nada gracias su compañía. Gracias Minos, Pily, Sergio, Liliana y Blanquita.

A los excelentes profesores que me dio esta gran universidad.



EFFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS POR *Enterococcus sp.*

Índice general

Resumen.....	2
1. Introducción.....	4
1.1 Generalidades los <i>Enterococcus sp.</i>	5
1.2 Crecimiento bacteriano.....	5
1.2.1 Curva de crecimiento equilibrado	6
1.2.2 Efecto de nutrientes en el crecimiento bacteriano	8
1.3 Metabolismo bacteriano	10
1.3.1 Metabolismo de <i>Enterococcus sp.</i>	10
2. Antecedentes.....	14
2.1 Generalidades del queso Cotija.....	14
2.2 Importancia de los enterococos en los alimentos artesanales	16
2.3 Producción de compuestos antibacterianos en diferentes medio de cultivo ..	19
3. Justificación	22
4. Hipótesis	23
5. Objetivos	23
5.1 Objetivos particulares:	23
6. Metodología	25
6.1Caracterización de las cepas	25
6.2 Cinéticas de crecimiento	27
6.3 Cosecha y obtención del sobrenadante.....	27
6.4 Determinación de proteína	28
6.5 Difusión en agar.....	28
6.6Espectro de inhibición.....	29
6.7Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-Tris-Tricina y zimogramas.....	30
7. Resultados y discusión.....	32
8. Conclusiones.....	68
9. Bibliografía.....	69



Resumen

La aplicación de bacterias ácido lácticas (BAL) en alimentos fermentados tiene como objetivos desarrollar sabores y olores característicos durante la fermentación, además de inhibir la microbiota competitiva mediante la reducción del pH del medio. Entre los microorganismos representativos de BAL se encuentra a los enterococos, los cuales se han reportado comúnmente en productos fermentados artesanales y que producen ciertos compuestos antibacterianos que proporcionan inocuidad a los alimentos.

Como parte de la caracterización del queso Cotija se logró aislar e identificar, mediante técnicas moleculares y bioquímicas a microorganismos pertenecientes a las BAL, principalmente enterococos y lactobacilos (Zuñiga, 2009). Se ha reportado que la microbiota del queso Cotija cambia durante su maduración. Después de 3 meses no se encuentran levaduras y las cuentas de coliformes disminuyen drásticamente, hasta alcanzar cuentas aceptables. Además se plantea que no son sólo las condiciones de humedad y pH, que prevalecen en el queso Cotija, las que ejercen control sobre las poblaciones microbianas; sino que podrían existir sustancias que contribuyen a la selección de los microorganismos que son capaces de sobrevivir en las etapas avanzadas de maduración (Bravo, 2008). Recientemente se encontró que de seis cepas de enterococos aisladas del queso Cotija, sólo una logró sintetizar compuestos con actividad antibacteriana cuando se cultivó medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe). Los demás enterococos se cultivaron en medio de cultivo APT (All purpose tween), por lo que en este trabajo se explora la producción de actividad antibacteriana de estos microorganismos en varios medios de cultivo que se han utilizado para la obtención de este tipo de compuestos en BAL.

En este trabajo se demostró que el crecimiento celular y la acumulación de productos del metabolismo son fuertemente influenciados por la composición del medio de cultivo, principalmente: la fuente de carbono, fuente de nitrógeno, factores de crecimiento y sales inorgánicas. Al mismo tiempo se confirmó que la fase logarítmica tardía y la estacionaria temprana son las fases en donde se



presenta la mayor producción de compuestos antibacterianos. Las seis cepas de enterococos lograron sintetizar dichos compuestos en medio MRS, sólo tres lo lograron en medio CGB y no hubo producción en los medios APT y TSB.

Se presentó actividad antibacteriana contra microorganismos importantes en inocuidad alimentaria, como: *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica* y *Micrococcus lysodeikticus*

Por último se concluyó que los extractos crudos obtenidos de las tres cepas capaces de producir compuestos antibacterianos en los medios MRS y CGB presentan un patrón de bandas muy similar, al realizar un perfil electroforético y zimogramas, lo que podría indicar que en ambos medios se producen los mismos compuestos extracelulares. Así bien, los extractos crudos de una cepa en medio MRS y CGB son los únicos que muestran bandas de actividad sobre *M. lysodeikticus*, a los 90 kDa y 63 kDa aproximadamente.



1. Introducción

Los enterococos son una parte esencial de la microbiota intestinal endógena de los seres humanos y animales. Se cree que juegan un papel clave en el equilibrio de la misma, por lo que tendrían potencial como probióticos. Además, siendo Bacterias Ácido Lácticas (BAL) participan en la fermentación espontánea de diversos alimentos como el queso, salchichas y aceitunas (Izquierdo *et.al.*, 2008 y Franz *et. al.*, 2003).

Por otra parte la contaminación bacteriana y el aumento de las enfermedades infecciosas de origen alimentario provocaron, desde 1980, un aumento en las investigaciones de compuestos con actividad sobre agentes patógenos o deteriorantes.

En este ámbito, las BAL producen sustancias con acción antibacteriana, principalmente ácido láctico o acético, diacetilo, peróxido de hidrógeno y reuterina (Signorini, 2007), pero la preservación de los alimentos por estos agentes no siempre es organolépticamente aceptable. Entre los enterococos existen cepas productoras de proteínas y otras sustancias de bajo peso molecular, como bacteriocinas, con capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos que puedan estar presentes en los alimentos (Salminen *et. al.*, 2004). Las BAL son “generalmente reconocidas como seguras” (GRAS) en la producción de alimentos y con ello el uso de sus metabolitos como conservadores son de gran interés en el ámbito de la investigación. A pesar de que el género *Enterococcus* es responsable de efectos benéficos en los alimentos, no son considerados como GRAS debido a su uso como indicadores de contaminación fecal y la frecuente asociación con enfermedades transmitidas por alimentos y la producción de aminas biógenas. Por ello, los reglamentos en Europa estipulan que la seguridad de cepas probióticas o “iniciadoras de cultivo” es responsabilidad del productor, por lo tanto, cada cepa destinada a tal uso debe ser cuidadosamente evaluada (Franz *et. al.*, 2003).



1.1 Generalidades de los *Enterococcus sp.*

Son bacterias ácido lácticas, Gram positivas, no esporuladas, no móviles, no formadoras de pigmentos, catalasa, reductasa y oxidasa negativas; así mismo, no cuentan con la capacidad de reducir los nitratos y tienen la capacidad de producir ácido láctico por fermentación de azúcares (Giraffa, 2003). Se pueden distinguir fácilmente de otras Gram positivas, catalasa negativas y cocos homofermentativos, como los estreptococos y lactococos, por su capacidad de crecer a 10° y 45 °C, con 6.5 % de NaCl , en presencia de 40 % de bilis y con un pH entre 4 y 9.6 (Giraffa, 2003; Franz *et. al.*, 2003). Tienen un metabolismo biosintético bastante limitado por lo que requieren medios de cultivo ricos en aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas. Su metabolismo de azúcares los clasifica como bacterias homolácticas, es decir, el metabolismo de este grupo es a través de la ruta Embden- Meyerhof (Vía Glucólisis) de la cual se obtiene como producto principal ácido láctico (López-Munguía, 2002).

Sin embargo en las categorías metabólicas de BAL por fermentación de azúcares, los enterococos son clasificados dentro del grupo III junto con pediococos, estreptococos, tetragenococos, algunos lactobacilos y vagococos. Estos microorganismos se caracterizan por ser estrictamente homofermentativos ya que poseen la enzima fructosa-1,6-difosfatoaldolasa, mediante la cual hacen uso de la glicólisis para la fermentación de hexosas. Así bien, en el caso de las pentosas y presumiblemente de gluconato, éstas inducen la síntesis de fosfocetolasas, dando como resultado una fermentación heteroláctica. Entonces se podría decir que los enterococos son homofermentativos con respecto a las hexosas y heterofermentativos para las pentosas y algunos otros sustratos y, por tanto podrían ser llamados heterofermentativos facultativos (Salminen *et. al.*, 2004).

1.2 Crecimiento bacteriano

En microbiología el crecimiento se define como un incremento ordenado de todos los constituyentes químicos de la célula. El aumento de masa, por sí solo, podría



no indicar un crecimiento real, ya que las células podrían estar incrementando su contenido únicamente en productos de reserva, tales como el glucógeno o el poli- β -hidroxibutirato. En un medio adecuado, y al cual se han adaptado perfectamente, las bacterias se encuentran en un estado de *crecimiento equilibrado*, durante el cual la duplicación de la biomasa va acompañada de una duplicación de todas las demás propiedades medibles de la población, por ejemplo, proteínas, ARN, ADN y agua intracelular. En otras palabras, los cultivos en *crecimiento equilibrado* mantienen una composición química constante (Stanier, 1996).

1.2.1 Curva de crecimiento equilibrado

La curva de crecimiento normalmente se representa como el número de células en una escala logarítmica frente al tiempo de cultivo (Figura 1). Tales representaciones muestran el estado de las poblaciones bacterianas y no de microorganismos individuales.

En un sistema cerrado, cultivo no renovado o medio de cultivo monofásico se tiene una curva de crecimiento típica. Esta curva de crecimiento se divide en fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

Fase de latencia: Las células transferidas de un cultivo en fase estacionaria a un medio fresco de igual o diferente composición experimentan un cambio de composición química antes de ser capaces de iniciar el crecimiento, y al tiempo necesario para esta adaptación se le conoce como fase de latencia. Durante este período, los microorganismos aumentan su actividad metabólica, se embeben en agua, se incrementa la tasa de síntesis de ARN, principalmente ribosómico (esencial para la síntesis de nuevas proteínas bacterianas), y se producen; posiblemente, enzimas inducibles para utilizar las nuevas sustancias que se les ofrecen. En definitiva, hay un aumento de volumen celular, pero no división, dado que no hay replicación de ADN cuyos niveles permanecen constantes durante toda la fase.



Fase logarítmica o exponencial: Una vez iniciado el desarrollo, se manifiesta pronto una ascendente inflexión de la curva, llamada fase de crecimiento acelerado. Durante la primera parte de este período, cuando la división es lenta, el tamaño de las células es grande; casi el máximo alcanzable por las respectivas especies. Este hecho se debe, probablemente a la absorción de agua con la hinchazón consiguiente y al comienzo de la actividad metabólica.

Durante la fase de crecimiento acelerado, el tiempo requerido para que cada célula se divida va disminuyendo gradualmente y la velocidad de división alcanza su máximo, el cual está determinado por la especie del microorganismo y las condiciones de crecimiento.

Cuando las bacterias se multiplican a velocidad constante y exponencial, se alcanza la auténtica fase de desarrollo.

Esta fase de desarrollo logarítmico está mediada por una serie de factores limitantes intrínsecos, como la velocidad de difusión osmótica, y factores extrínsecos diversos, como la concentración del sustrato, presencia de oxígeno, etc. La temperatura es un factor importante, ya que para cada bacteria se tiene una óptima de crecimiento.

Por otro lado, la actividad metabólica es máxima, el tamaño bacteriano se reduce, las estructuras (pared celular, membrana) presentan un espesor mínimo, la sensibilidad a los agentes físicos, químicos, antibacterianos y fisiológicos son más evidentes. Por lo anterior, también es durante esta fase cuando las bacterias sintetizan compuestos de defensa, tal es el caso de las bacteriocinas.

Al cabo de pocas horas (o días, dependiendo de la velocidad de crecimiento celular) del inicio de la fase logarítmica, los microorganismos encuentran dificultades para continuar la multiplicación. Los nutrientes se agotan, las materias residuales tóxicas se acumulan, el pH se modifica, los aceptores de hidrógenos desaparecen, las transferencias de energía disminuyen y las células se obstaculizan mutuamente. La tasa de división celular comienza a declinar y hay microorganismos que mueren en número creciente, de tal modo que el progreso



numérico de las células vivas se retarda considerablemente. Este proceso se designa como fase de aceleración negativa del crecimiento.

Fase estacionaria: Hay un crecimiento desequilibrado debido a que los componentes bacterianos (ADN, ARN, proteínas, etc.) se sintetizan a tasas diferentes. Se produce una estabilización, de modo que el número de células que se reproducen equivalen a las que mueren. Esto se debe principalmente a la disminución de factores esenciales para la respiración o a la falta de elementos nutritivos del sustrato. La acumulación de productos finales del metabolismo (ácidos orgánicos o alcoholes) obtenidos a partir de la degradación de los carbohidratos, y enzimas autocatalíticas del tipo de las proteasas y de las nucleasas actúan como inhibidores de crecimiento.

Fase de muerte: Luego de la fase estacionaria, la tasa de muerte se incrementa, el número de bacterias viables disminuye rápidamente, por lo que la curva declina en forma drástica (Masson Salvat, 1995).

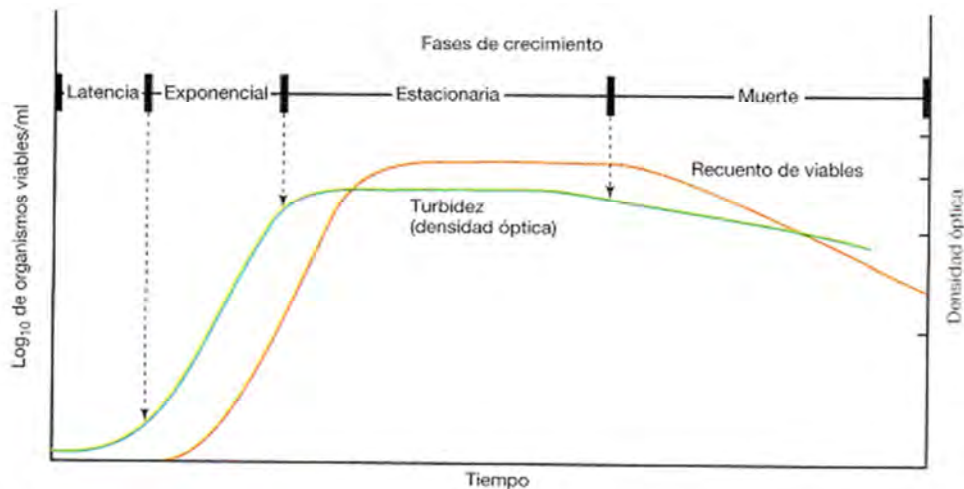


Figura 1. Curva de crecimiento equilibrado (Stanier, 1996).

1.2.2 Efecto de nutrientes en el crecimiento bacteriano

En muchos aspectos, el crecimiento bacteriano puede compararse a una reacción química en la cual los componentes del medio (reactivos) producen nuevas células (el producto de reacción), un proceso catalizado por la población



bacteriana. La velocidad de las reacciones químicas viene determinada por la concentración de los reactivos, pero, tal como se ha visto, la velocidad de crecimiento bacteriano permanece constante hasta que en el medio prácticamente se ha agotado el nutriente limitante. Esta se explica por la acción de las permeasas, que son capaces de mantener concentraciones intracelulares saturantes de nutriente en un amplio margen de concentraciones externas. No obstante, a concentraciones extremadamente bajas de nutrientes externos, los sistemas de las permeasas no son ya capaces de mantener las concentraciones intracelulares saturantes, con lo que disminuye la velocidad de crecimiento (Garrido, 2001).

Por lo general, la concentración de solutos en el interior de una célula bacteriana es mucho mayor que en el medio extracelular, tanto si el crecimiento se realiza en un medio de cultivo artificial como en un medio natural; además los solutos presentes intracelularmente difieren significativamente de los del medio externo. Estas diferencias son mantenidas e incluso, en algunos casos, creadas por la membrana celular y algunas proteínas asociadas a tal estructura. Normalmente, la membrana celular es impermeable a las moléculas grandes y a los iones, por lo que su paso por la membrana se realiza gracias a las actividades de proteínas que están asociadas a la membrana celular o insertadas en ella.

Los mecanismos de transporte cumplen dos cometidos esenciales en la función celular. En primer lugar, mantienen las concentraciones intracelulares de todos los substratos primarios en valores lo suficientemente altos como para asegurar el funcionamiento de las rutas catabólicas y biosintéticas a velocidades cercanas a las máximas, incluso cuando las concentraciones de los nutrientes en el medio externo son bajas. Esto lo demuestra el hecho de que las velocidades de crecimiento exponencial de las poblaciones bacterianas permanecen constantes hasta que la concentración de un nutriente esencial en el medio se hace muy baja, próxima al agotamiento. A esta concentración limitante de nutriente, la velocidad de crecimiento de la población desciende rápidamente. En segundo lugar, los mecanismos de transporte intervienen en la osmorregulación manteniendo los



solutos (principalmente las moléculas pequeñas y los iones) en valores óptimos para la actividad metabólica, incluso cuando la osmolaridad del medio varía en un margen relativamente amplio. La mayoría de las bacterias no necesitan regular su osmolaridad interna con precisión porque están protegidas por una pared celular capaz de resistir una considerable presión osmótica interna. Las bacterias mantienen siempre su osmolaridad muy por encima de la del medio (Stanier, 1996).

1.3 Metabolismo bacteriano

Se denomina metabolismo al conjunto de reacciones químicas catalizadas enzimáticamente que de forma regulada y coordinada tienen lugar en las células vivas. El metabolismo se divide en catabolismo, que es la fase degradativa, y en anabolismo que es la fase constructiva o biosintética (Gottschalk, 1986). El catabolismo es el proceso por el que los nutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas) provenientes del medio ambiente o de los depósitos celulares pueden ser degradados a moléculas sencillas como ácido láctico, CO₂ o urea. El catabolismo se realiza con la liberación de la energía inherente de los nutrientes, la cual se conserva en forma de ATP. En el anabolismo, las moléculas precursoras se unen para formar componentes moleculares de células como polisacáridos, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Puesto que este proceso aumenta la complejidad de la estructura, requiere energía libre, que es proporcionada por la hidrólisis del ATP (Garrido, 2001). Por tanto, el metabolismo es un tema muy amplio: tan solo el número de reacciones es enorme. En forma colectiva tales reacciones se encargan de mantener la viabilidad del organismo (Cuamatzi, 2004)

1.3.1 Metabolismo de *Enterococcus sp.*

La característica esencial del metabolismo de BAL es la eficiente fermentación de carbohidratos junto con la fosforilación a nivel sustrato. El ATP generado es subsecuentemente usado para la biosíntesis. Las BAL como grupo exhiben una enorme capacidad para degradar diferentes carbohidratos y compuestos



relacionados. Generalmente, el producto final predominante es el ácido láctico (>50% de azúcar como carbono). Es evidente, sin embargo, que las BAL adaptadas a diversas condiciones tienen como consecuencia un cambio en su metabolismo. Esto puede dar lugar a productos finales muy diferentes. Anteriormente se mencionó que los *Enterococcus* llevaban a cabo la fermentación homoláctica, siguiendo la ruta de glicólisis o glucólisis si el carbohidrato degradado es la glucosa (Salminen *et. al.*, 2004).

Glicólisis

La Glicólisis (vía Embden-Meyerhof-Parnas), ejemplificada en la Figura 2, es utilizada por los enterococos y se caracteriza por la formación de fructosa-1-6-difosfato (FDP), que es dividida por una FDP aldolasa en dihidroxiacetonafofato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (GAP). GAP se convierte a piruvato en una secuencia metabólica como sustrato de fosforilación a nivel de dos sitios. La degradación enzimática de glucosa se lleva a cabo mediante 10 reacciones consecutivas. Esta secuencia de reacciones en el citosol transforma a la glucosa en dos moléculas de piruvato con la generación simultánea de 2 ATP y 2 NADH.

Bajo condiciones de exceso de azúcar y limitando oxígeno, el piruvato se reduce a ácido láctico por una lactato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (nLDH), lo que reoxida al NADH formado durante los primeros pasos de la vía glucolítica. Así se obtiene un balance redox, el ácido láctico es prácticamente el único producto final, y el metabolismo se refiere como una fermentación homoláctica (Salminen *et. al.*, 2004).

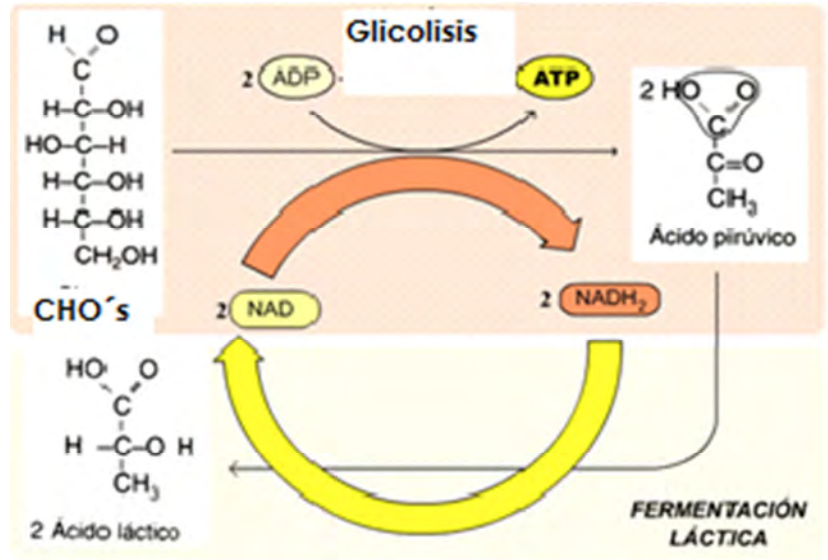
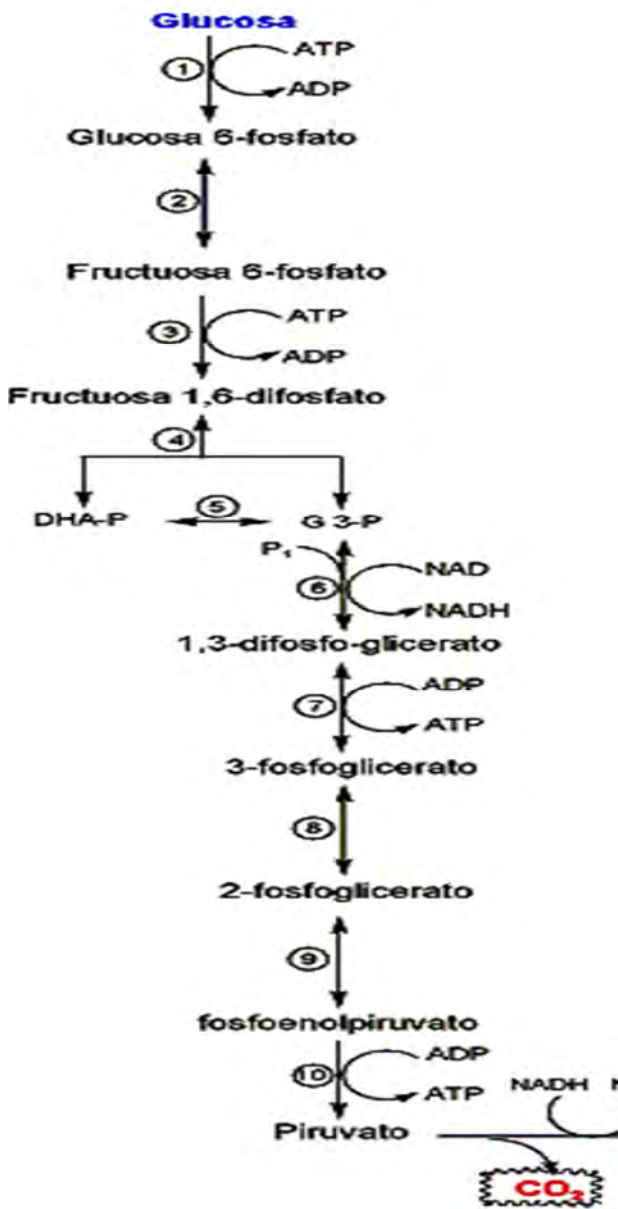


Figura 2. Esquema de los intermediarios sintetizados durante la Glucolisis

Fermentación de pentosas y otras fuentes de carbono

Las pentosas son fácilmente fermentadas por muchas BAL. En general, permeasas específicas son usadas para el transporte de azúcares dentro de la célula. En el interior, las pentosas son fosforiladas y convertidas a ribulosa-5-fosfato o xilulosa-5-fosfato por las epimerasas o isomerasas. Esos componentes pueden ser entonces metabolizados por la vía de la 6-fosfogluconato/fosfocetolasa (Figura 3). Esto implicaría que sólo las BAL



heterofermentativas pueden utilizar pentosas, pero este no es el caso, ya que todas las BAL son pentosa positivo con la única excepción de los lactobacilos del grupo I, que son homofermentativos estrictos, tal es el caso de *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrüeckii*, *Lb. helveticus* y *Lb. salivarius* (Salminen *et. al.*, 2004).

Como las pentosas, el gluconato es fermentado por la vía de la 6-fosfogluconato/fosfocetolasa, obteniendo una fermentación heteroláctica por especies consideradas como homofermentativas. En los enterococos el gluconato es transportado por la vía PTS-gluconato (PTS: carbohydrate phosphotransferase system) inducible, dando como resultado 6-fosfogluconato que entra a la vía de fermentación antes mencionada.

Metabolismo de la lactosa en las bacterias lácticas heterofermentativas

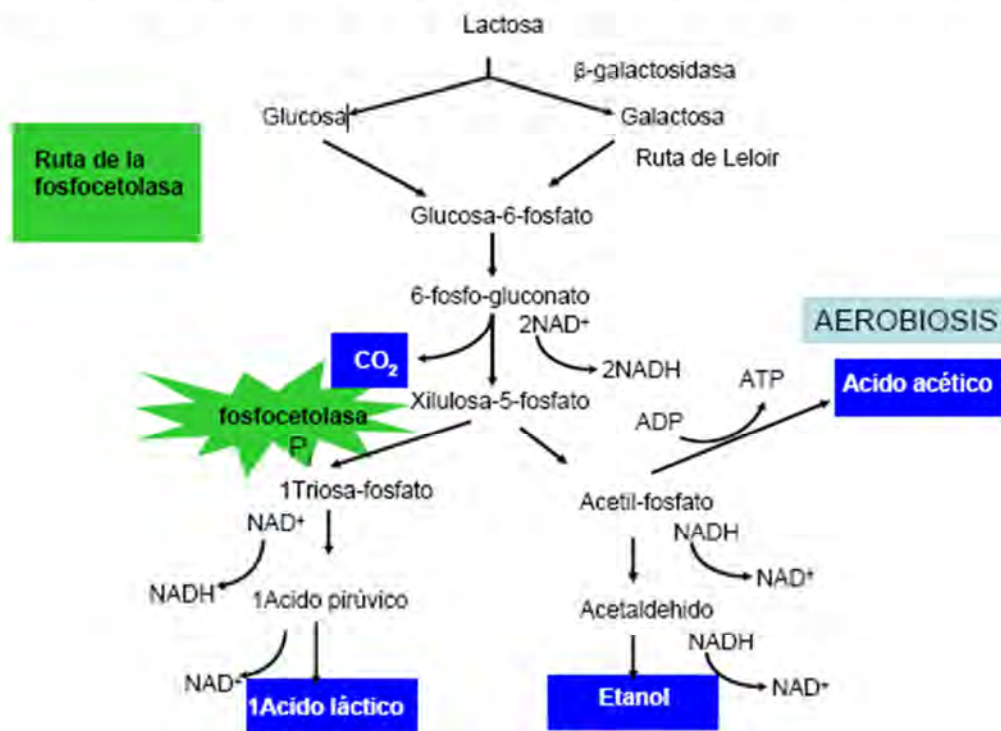


Figura 3. Esquema del metabolismo heterofermentativo para la utilización de lactosa (vía de la 6-fosfogluconato/fosfocetolasa) en BAL.



2. Antecedentes

2.1 Generalidades del queso Cotija

El queso Cotija es uno de los principales quesos mexicanos genuinos. Se elabora de manera artesanal desde hace más de cuatro siglos y es originario de las laderas serranas de la cuenca media del río Tepalcatepec, donde Jalisco y Michoacán comparten territorio.

Es un queso de gran formato pues se produce en voluminosas piezas cilíndricas de 22 kg en promedio, de pasta firme, prensada y normalmente friable. Cuando es auténtico, se madura en el lugar donde se produce, antes de salir al mercado, durante tres a cuatro meses, por tanto, posee aromas, olores y sabores característicos, en general más intensos que la mayoría en los quesos frescos nacionales (Cervantes *et. al.*, 2008, Referencia en línea 1)

Actualmente se desea obtener la Denominación de Origen y para lograr este objetivo se han realizado, en nuestro grupo de trabajo, diversos análisis fisicoquímicos y microbiológicos, entre los que destacan: la identificación y caracterización de los microorganismos presentes en el lácteo, la búsqueda de microorganismos patógenos y el dilucidar qué microorganismos están involucrados en el desarrollo del olor y sabor característicos de este queso.

En estudios de poblaciones microbianas del queso Cotija se han encontrado diferentes cepas de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) las cuales podrían tener un interés biotecnológico (Bravo A., 2008). Se ha reportado que la microbiota del queso Cotija cambia durante su maduración y que después de 3 meses no se encuentran levaduras y los coliformes están en cuentas aceptables (Figura 4), además de que predominan las bacterias lácticas pertenecientes al género de enterococos (Zúñiga, 2009). Se ha planteado que no son sólo las condiciones de humedad y pH que prevalecen en el queso Cotija, las que ejercen un control sobre las poblaciones microbianas; sino que podrían existir sustancias que contribuyen a la selección de los microorganismos que son capaces de sobrevivir en las etapas avanzadas de maduración (Bravo, 2008)

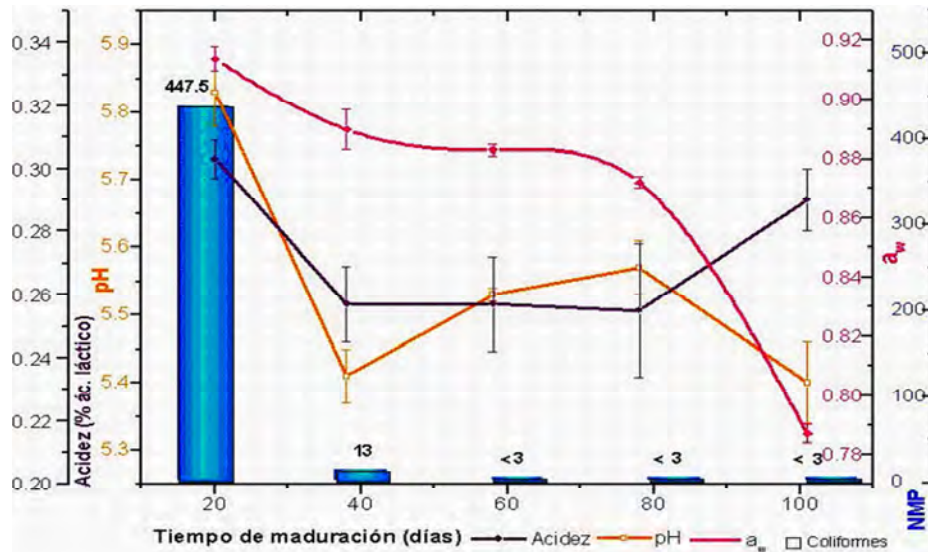


Figura 4. Cuenta de coliformes, a_w , pH y %acidez, respecto al tiempo en una muestra de queso Cotija proveniente de la región de origen. (Bravo, 2008)

La identificación y descripción de estas BAL aisladas del queso Cotija, se realizaron por métodos moleculares (secuenciación de la región V3 del gen ARNr 16S) (Zúñiga, 2009). Posteriormente se lograron identificar 3 lactobacilos (*Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus brevis*) (Delgado-Arciniega, 2010).

Recientemente se encontró que de las nueve cepas de BAL, los tres lactobacilos encontrados y una cepa de enterococos presentaban actividad antibacteriana, al cultivarse en medio de cultivo MRS, contra los microorganismos indicadores *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Figura 5), y otras 5 cepas de enterococos cultivados en medio APT no presentaban actividad (Delgado-Arciniega, 2010). Esa actividad se conservaba incluso después de someter el extracto a altas temperaturas y variaciones drásticas de pH (Hernández-Alcántara, 2010), pero después de ser tratadas con tripsina dicha actividad se veía afectada (Serrano, 2010).

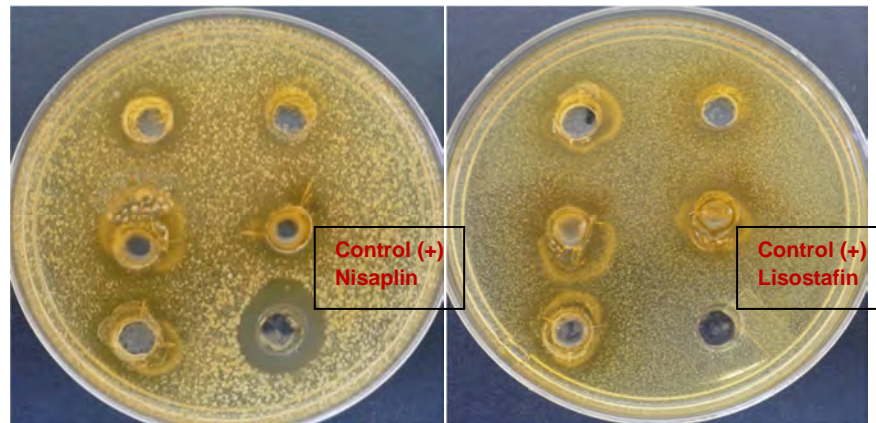


Figura 5. Prueba presuntiva de la actividad antibacteriana por difusión en agar de *Enterococcus faecalis* (G) usando como microorganismo indicador *S. aureus* (izquierda) y *E. coli* (derecha), (Delgado-Arciniega, 2010).

2.2 Importancia de los enterococos en los alimentos artesanales

La presencia de enterococos en alimentos tiene especial incidencia en los que son fermentados. En la actualidad, no existe un consenso sobre la cantidad de enterococos permitida en los alimentos y la posible patogenicidad de las diferentes especies del género sigue en estudio. Actualmente, el género *Enterococcus* incluye más de 20 especies, con *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus durans* como las especies más encontradas en alimentos (Giraffa, 2003).

En los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios en los que se concluye que los enterococos tienen un importante papel en la maduración de quesos tradicionales elaborados a partir de leche de oveja, vaca y cabra, contribuyendo al desarrollo del sabor y aroma característico de dichos quesos (Referencia en línea 2). Su presencia se atribuye a su excepcional aptitud para sobrevivir y resistir ambientes desfavorables, así como a las fuentes de contaminación ambientales que hacen posible la colonización de alimentos crudos, tal es el caso de la leche y carne, y su multiplicación en esos productos durante la fermentación. Sin embargo, otros estudios demuestran que la resistencia térmica (62.8 °C por 30 min) explica su presencia en alimentos lácteos producidos a partir de leche pasteurizada (Giraffa, 2003). La presencia de



enterococos en quesos tradicionales puede ser deseable ya que muchos estudios indican que cepas de este género pueden tener una influencia positiva en la producción y maduración de algunos quesos como: Manchego, Armada, Cebreiro, Picante, Majoero, Feta, Teleme, Mozzarella, Monte Veronese, Fontina, Caprino, Serra, Venaco y Comté (Giraffa, 2003).

Recientemente se han desarrollado estudios sobre las propiedades probióticas de los enterococos, así como sobre la capacidad de síntesis de bacteriocinas contra agentes patógenos. Las enterocinas pertenecen a las bacteriocinas de clase II, que son pequeñas, estables a la temperatura y no lantibioticas con fuerte efecto antilisterial (Giraffa, 2003), y en algunos casos han llegado a mostrar actividad contra bacterias Gram negativas como: *Salmonella enterica serovar Enteritidis*, *S. enterica serovar Choleraesuis*, *S. enterica serovar Typhimurium*, *S. enterica serovar Gallinarum*, *Escherichia coli O157:H7*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* (Line et. al., 2008; Izquierdo et al 2008). Simonetta y colaboradores en 1997 reportaron la actividad antibacteriana sobre *Vibrio cholerae* de 7 cepas de *Enterococcus faecalis*, 5 de *Enterococcus faecium* y 4 de *Enterococcus durans*, aislados de leche y productos lácteos de Santa Fe (Argentina), esta actividad era susceptible a los tratamiento con tripsina y pronasa E y resistía los tratamientos térmicos a 100°C durante 10-30 min., con esos resultados se sospecha que se trata de sustancias inhibitorias parecidas a bacteriocinas (BLIS).

Entre las sustancias antibacterianas producidas por las BAL se han reportado los ácidos orgánicos, principalmente el ácido láctico, acético y el propiónico. De estos ácidos, el acético es el principal inhibidor y tiene una amplia gama de actividad contra levaduras, mohos y bacterias, mientras que el ácido propiónico se ha observado que ejerce un fuerte efecto antimicrobiano, en particular hacia levaduras y mohos. Cuando una mezcla de ácidos está presente, es probable que el ácido láctico contribuya principalmente a la reducción en el pH, mientras que el ácido propiónico y acético, sin disociar, son los agentes antimicrobianos efectivos.



(Salminen *et al.*, 2004). Otras sustancias con actividad antibacteriana son: el dióxido de carbono, peróxido de hidrogeno y diacetilo, este último se ha reportado para especies del género *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (Signorini, 2007; Salminen *et. al.*, 2004). En el queso, el desarrollo del olor y sabor característico, se debe a la producción de proteasas y lipasas extracelulares y adicionalmente a las autolisinas producidas intracelularmente por BAL. Dicha actividad es el resultado de la acción de enzimas que hidrolizan enlaces covalentes del péptidoglucano, principal componente de la pared celular de bacterias. Este tipo de enzimas son llamadas péptidoglucano hidrolasas (PGH) y se clasifican dependiendo del tipo de enlace que hidrolicen: muramidasa, glucoamidasa, amidasa y endopeptidasas, así bien, también pueden funcionar como compuestos con la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos (García- Cano, 2009).

Las BAL suelen producir sustancias antibacterianas de bajo peso molecular. Estas moléculas comparten otras propiedades: (a) son activas a pH bajo, (b) termoestables, (c) tienen un amplio espectro de actividad, y (d) son solubles en acetona. La reuterina, reuteriicina, ácido 5-carboxil-2-pirrolidona y las bacteriocinas son representantes de esta clasificación, siendo estas últimas las más reportadas (Salminen *et. al.*, 2004).

El ácido 5-carboxi-2-pirrolidona es principalmente producido por *Lactobacillus casei ssp. casei*, *L. casei ssp. pseudopantarum* and *Streptococcus bovis*, y se ha observado que tiene actividad inhibitoria sobre *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida*, y *Pseudomonas fluorescens*. Una cepa de *Lactobacillus reuteri* fue recientemente reportada como productora de reuteriicina (349 Da), con una actividad que aumenta drásticamente a altas concentraciones de sal (2%) y bajo pH (4.5). La concentración mínima inhibitoria se encontró en aproximadamente 0.05-1 mg / L para las bacterias Gram-positivas, pero las bacterias Gram-negativas y levaduras no se consideraron sensibles aún con 100 mg/L. La reuteriicina no parece formar poros en la membrana de las células



blanco, sino más bien funciona como un ionóforo de protones. Se distribuye en la membrana citoplasmática, debido a su hidrofobicidad, y selectivamente se dispersa ocasionando un cambio en el transporte de nutrientes. Por otro lado las bacteriocinas son péptidos antibacterianos con un reducido espectro de inhibición (Cotter, 2005; Salminen *et. al.*, 2004); son sintetizados ribosomalmente por una bacteria y son activos sobre otra bacteria, cuando son de la misma especie se dice que son de reducido espectro de inhibición y cuando actúan sobre otros géneros son de amplio espectro (Cotter, 2005;). Muchas bacteriocinas son producidas por BAL y se consideran grado alimentario, un fenómeno que ofrece una nueva posibilidad de prevención del desarrollo de especies de bacterias indeseables en alimentos (Salminen *et. al.*, 2004).

Todos estos ejemplos de BAL productoras de compuestos antibacterianos están relacionados filogenéticamente con los enterococos, lo que indicaría la probable capacidad de éstos para producir el mismo tipo de sustancias.

2.3 Producción de compuestos antibacterianos en diferentes medio de cultivo

El crecimiento celular y la acumulación de productos del metabolismo son fuertemente influenciados por la composición del medio, principalmente: la fuente de carbono, fuente de nitrógeno, factores de crecimiento y sales inorgánicas. (Chan *et.al.*, 2002). Se ha reportado ampliamente que el medio de cultivo tiene un efecto directo en la producción de proteínas extracelulares.

Esta influencia ya ha sido observada en cepas de *Enterococcus* por algunos investigadores, quienes probaron diversos medios usados para el crecimiento y producción de sustancias con actividad bactericida por parte de las BAL y encontraron que el medio MRS es el óptimo para lograr la mayor producción de compuestos con naturaleza antibacteriana, debido a que les provee los requerimientos necesarios como la fuente de nitrógeno, carbohidratos y cofactores



que estimulan su producción (Settanni *et. al.*,2008). Sin embargo estos compuestos han logrado ser sintetizados en otros medios.

Los reportes demuestran la facilidad de los enterococos por crecer en medio MRS, el cual es un medio de propósito general para la cuantificación de lactobacilos, pero la formulación MRS fue desarrollada, con el fin de contar con un medio que promoviera un buen crecimiento de las bacterias ácido lácticas en general. Así bien, los géneros que pueden desarrollarse son: lactobacilos, enterococos, estreptococos, pediococos y leuconostoc. Su crecimiento se ve favorecido considerablemente mediante condiciones de microaerofilia. Se puede hacer más selectivo mediante un ajuste en el pH, ya que los lactobacilos toleran más bajos niveles de pH que los estreptococos (pH 5.0-6.5), y los pediococos y leuconostoc crecen mejor dentro de este rango (OXOID Manual, 1990). Como ejemplo se tiene la producción de las enterocinas L50A, L50B e IT, por *Enterococcus faecium* IT62, una cepa aislada de un “rye-grass italiano” o Bacillo (zacate nativo del Mediterráneo), luego del crecimiento de esta cepa en medio MRS (Izquierdo *et. al.*, 2008).

En otras investigaciones el medio de cultivo empleado es el APT (All Purpose Tween), el cual se usa para cultivar lactobacilos heterofermentativos y otros organismos con alto requerimiento de tiamina. Moreno y colaboradores en el 2002 demostraron el rango de actividad antibacteriana de 2 enterocinas, B1 y B2, producidas por *E. faecium* LMG 19827 y *E. faecium* LMG 19828, cuando su crecimiento se había llevado a cabo en medio APT, teniendo actividad inhibitoria sobre 10 cepas de *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus pumilus*, pero sin efecto sobre bacterias Gram-negativas (Moreno *et. al.*, 2002).

El TSB (Caldo Soya Trypticaseína) es un medio utilizado para cultivar una amplia variedad de microorganismos. Éste es recomendado para el cultivo de *Brucella* y, bajo condiciones de anaerobiosis, para el cultivo de *Clostridium*. Algunos autores lo recomiendan para el cultivo de *Histoplasma capsulatum*. Adicionado de 6.5% de



cloruro de sodio puede ser utilizado para el crecimiento selectivo de estreptococos del grupo D. A pesar de no ser un medio selectivo para los enterococos, se ha demostrado su capacidad de crecer en este medio y producir sustancias inhibitorias parecidas a bacteriocinas (BLIS) (Álvarez- Cisneros, en prensa), en este mismo trabajo se adaptaron dos cepas de *E. faecium* (MXVK29 y MXVL22) a un medio denominado Caldo Caseína-Glucosa (CGB), en el cual la cepa de *E. faecium* MXVK29, resultó ser productora de BLIS.

Con lo anterior, podemos inferir que no hay un único medio de cultivo para la obtención de sustancias antibacterianas por el género enterococos y que es necesario que éstos encuentren las condiciones idóneas para lograr la síntesis de dichos compuestos.



3. Justificación

En estudios de poblaciones bacterianas del queso Cotija se han encontrado diferentes cepas de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) las cuales podrían tener un interés biotecnológico (Bravo A., 2008).

Recientemente se encontró que de las nueve cepas de BAL, los tres lactobacilos encontrados y una cepa de enterococos presentaban actividad antibacteriana (Delgado-Arciniega, 2010). Debe destacarse que todas estas fueron cultivadas en medio MRS. Por otra parte, las que no presentaron actividad antibacteriana, se encontraban en medio APT.

Dado que una cepa de enterococos cultivada en medio MRS presenta actividad antibacteriana extracelular, ahora se pretende conocer si existe una relación entre el medio de cultivo y la síntesis de dichos compuestos, cultivando las seis cepas de enterococos en diferentes medios descritos para el crecimiento y producción de compuestos antibacterianos por BAL. Además de probar si hay actividad inhibitoria principalmente sobre *Listeria monocytogenes* y otros microorganismos de interés en los alimentos.



4. Hipótesis

Se ha visto que los enterococos pueden producir compuestos antibacterianos en diferentes medios de cultivo diseñados para BAL, por ello se propone que las seis cepas de enterococos aisladas del queso Cotija presentarán actividad antibacteriana extracelular en alguno de los medios donde ya se ha reportado la producción de compuestos antibacterianos por otras BAL.

5. Objetivos

Determinar la presencia de actividad antibacteriana en seis cepas de enterococos (3 *Enterococcus faecium* y 3 *Enterococcus faecalis*), aisladas del queso Cotija, cultivados en medio MRS, TSB y CGB.

5.1 Objetivos particulares:

- Realizar cinéticas de crecimiento de las BAL aisladas del queso Cotija, en los diferentes medios de cultivo.
- Determinar el espectro de inhibición de los sobrenadantes obtenidos sobre microorganismos patógenos y algunas bacterias ácido lácticas de interés en alimentos, a través de pruebas de difusión en agar.
- Determinar el tamaño aproximado de las proteínas con actividad antibacteriana, a través de zimogramas.

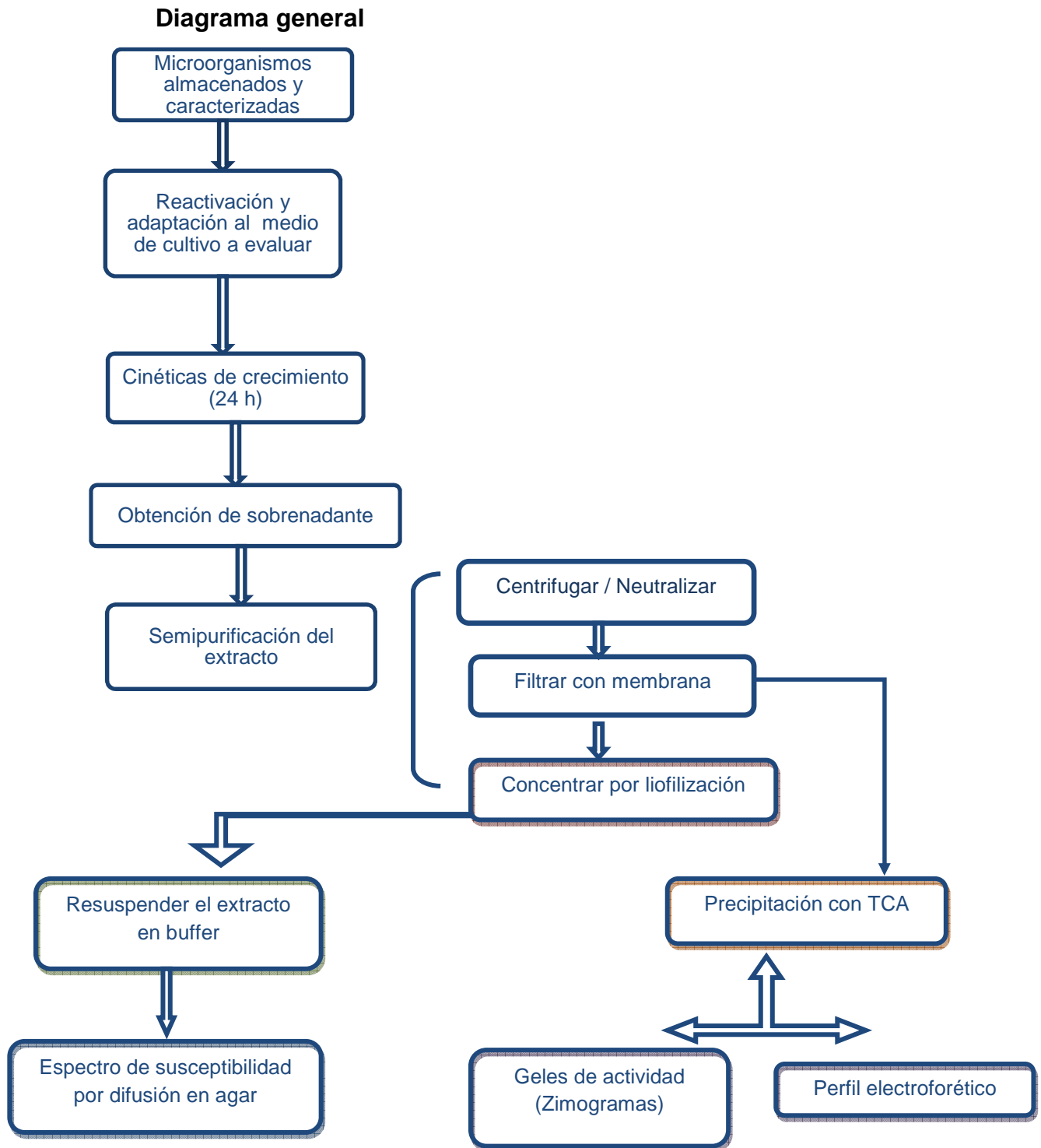


Figura 6. Diagrama general de trabajo



6. Metodología

6.1 Caracterización de las cepas

Se trabajó con seis cepas de enterococos aisladas de queso Cotija (región origen), con una maduración de entre 73 y 78 días. Dichas cepas son las siguientes: *Enterococcus faecalis* (A), *Enterococcus faecium* (B), *Enterococcus faecium* (C), *Enterococcus faecalis* (D), *Enterococcus faecium* (E) y *Enterococcus faecalis* (G) (Bravo A., 2008). Éstas se encontraban conservadas a -20°C en esferas de vidrio perforadas.

Los inóculos se prepararon, adicionando 2 esferas de vidrio con la cepa correspondiente, por cada 20 mL de caldo MRS (OXOID), APT (Difco), TSB (OXOID) y CGB. Estas se incubaron a 250 rpm, 37°C durante 24 h en una incubadora INNOVA 4000, New Brunswick Scientific. A las 24 h de crecimiento, se midió densidad óptica a 600 nm en un Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 3A. De estos inóculos se hicieron tinciones de Gram y se observaron al microscopio para verificar su pureza.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo

MRS		APT	
Nutriente	g/L	Nutriente	g/L
Glucosa	20	Digerido pancreático de caseína	12.5
Peptona	10	Glucosa	10
Bactopectona proteasa	8	Extracto de levadura	7.5
Acetato de sodio 3H ₂ O	5	Citrato de sodio	5
Extracto de levadura	4	Cloruro de sodio	5
Fosfato de potasio dibásico	2	Fosfato de potasio dibásico	5
Citrato de amonio	2	Tween 80	0.2
Tween 80	1mL	Sulfato de magnesio	0.8
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	0.2	Cloruro de manganeso	0.14
Sulfato de manganeso 4H ₂ O	0.05	Sulfato ferroso	0.04
		Clorhidrato de Tiamina	0.001



CGB		TSB	
Nutriente	g/L	Nutriente	g/L
Glucosa	10	Peptona de caseína	17
Bactotripton	20	Glucosa	2.5
Extracto de levadura	5	Peptona de soya	3
Fosfato de potasio dibásico	2	Cloruro de sodio	5
Citrato de amonio	2	Fosfato de potasio dibásico	2.5
Tween 80	1		
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	0.1		
Sulfato de manganeso 4H ₂ O	0.05		

Las seis cepas de *Enterococcus* se sembraron por agotamiento en medio Kanamicina-Escualina-Azida de Sodio (KAA) para caracterizarlos. Las colonias características se observaron al microscopio y se le realizó la prueba de catalasa. La presencia de burbujas indica que la prueba es positiva. Como control positivo se utilizó una colonia de *S. aureus*.

Fundamento del medio Kanamicina-Escualina-Azida de Sodio (KAA): El agar Escualina-Azida de Sodio es un medio selectivo cuando se usa un suplemento de Kanamicina y se emplea para el aislamiento de *Enterococcus* en alimentos. El medio contiene los componentes inhibitorios selectivos sulfato de kanamicina y azida de sodio. También contiene un sistema indicador para detectar el crecimiento de estreptococos hidrolizantes de escualina. Se forman colonias con áreas negras alrededor de las mismas debido a la formación de compuestos fenólicos de hierro, derivados de los productos de hidrólisis de escualina y Fe²⁺. Las colonias de enterococos son circulares, blancas o grises con un diámetro de alrededor de 2 mm, rodeadas de zonas negras de al menos 1 cm de diámetro (Figura 8), (OXOID Manual, 1990).



6.2 Cinética de crecimiento

Se prepararon preinóculos partiendo de las cepas conservadas adicionando 2 esferas de vidrio por cada 20 mL de caldo MRS, TSB y CGB. Las curvas de crecimiento en medio APT fueron realizadas previamente por Delgado-Arciniega en el 2010. Los preinóculos se incubaron a 250 rpm, 37°C durante 24 h o hasta que la densidad óptica a 600 nm fuera aproximadamente de 2. Posteriormente, a 50 mL de caldo fresco se adicionó 1 mL del preinóculo, (inóculo al 2% v/v) y se tomaron alícuotas de 1 mL cada 2 horas, desde las 2 hasta las 24h de crecimiento, bajo las siguientes condiciones de incubación: 250 rpm, 37°C. Así mismo se determinó el pH con un potenciómetro HANNA HI 4211 y la densidad óptica de cada uno de los puntos de la cinética de crecimiento a una longitud de onda de 600 nm. Al final se graficó densidad óptica y pH en función del tiempo.

Una vez realizadas las cinéticas de crecimiento de las cepas en estudio, se determinaron los tiempos a los cuales se obtendrían los sobrenadantes para ser analizados. Ya que anteriormente se había comprobado que al obtener los sobrenadantes de la fase logarítmica tardía o fase estacionaria temprana, se presentaba la máxima actividad antibacteriana (Delgado-Arciniega, 2010).

6.3 Obtención del sobrenadante

A partir de un cultivo de 50 mL, se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 min a 4°C en una centrifuga Beckman J2-MC. Los sobrenadantes obtenidos se neutralizaron a pH 7 con NaOH 50% m/v y posteriormente, se filtraron con una membrana de 0.45 µm (Millipore). Las muestras se congelaron y se liofilizaron en un equipo LABCONCO. Finalmente el sobrenadante liofilizado se resuspendió en buffer de fosfatos (PBS) 100 mM, pH 7.



6.4 Determinación de proteína

A 800 μL de la muestra diluida (dilución 10^{-2}) se le adicionan 200 μL del reactivo de Bradford (Bio-Rad). La concentración de proteína se determinó a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro BIOMATE 3. Los valores obtenidos se interpolaron en una curva patrón de albúmina sérica bovina (0-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Fundamento: Este método depende, de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico (azul brillante de coomasie G-250) y las proteínas en sus residuos básicos y aromáticos. Hay un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm, pasando de un color rojo a azul, y es este aumento en la absorción a 595 nm el que se mide (Bradford, 1976). Es relativamente sensible a la presencia de contaminantes tales como restos de detergente y líquidos orgánicos como el metanol. Su principal ventaja es que resulta más rápido y fácil de emplear que otros métodos alternativos.

6.5 Difusión en agar

Para determinar el efecto antibacteriano se realizaron pruebas de difusión en agar con los sobrenadantes tratados anteriormente. Se hicieron diluciones decimales de *E. coli* y *S. aureus* para obtener el césped bacteriano adecuado.

Para elaborar las cajas donde se realizó el ensayo de difusión en agar, se colocaron 20 mL de agar BHI al 1% m/v y se dejó solidificar. Posteriormente se le adicionaron 10 mL de agar suave al 0.8 % m/v con la concentración de células de los microorganismos seleccionada (20 μL de la dilución óptima). Con un penicilindro se hicieron pozos sobre la doble capa de agar, en cada pozo se agregaron 200 μL de cada uno de los sobrenadantes obtenidos. Las cajas se incubaron a 37°C por 42 h en una estufa estática Gravity Convection E-71.



Finalmente se midió el diámetro del halo de inhibición de los microorganismos, con la ayuda de un vernier. Se consideró como positiva la prueba cuando presentó un halo de inhibición nítido alrededor de la colonia y superior a 1 mm.

Para el estudio del espectro inhibitorio se usaron bacterias “blanco” para demostrar la actividad de las cepas productoras.

Bacterias “blanco”: *Escherichia coli* DH5 α , *Staphylococcus aureus* ATCC 6558 (cepas de la colección del laboratorio 312 Facultad de Química UNAM). Estas bacterias se incubaron previamente en caldo cerebro-corazón (BHI-Difco) durante 6 h, partiendo de un preinóculo de 24 h en el mismo medio.

Como controles positivos se usaron los siguientes compuestos:

Nisaplin ®: Producto comercial cuyo compuesto activo es la nisina, una bacteriocina natural producida por *Lc. lactis*, con actividad frente a una gran cantidad de bacterias Gram (+) incluyendo a los géneros *Listeria*, *Clostridium*, *Bacillus* y las BAL; causando su muerte, inhibiendo el desarrollo de células vegetativas (destrucción de membrana citoplasmática) o la germinación de esporas termorresistentes.

Kanamicina (OXOID): es un antibiótico del grupo de los aminoglucósidos, de amplio espectro, bactericida, activo sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas y *Mycobacterium*, por lo que usa para el tratamiento de una amplia gama de infecciones. La kanamicina es producida por la bacteria *Streptomyces kanamyceticus*.

6.6 Espectro de inhibición

La actividad antagonista fue determinada por medio de la técnica de difusión en agar, tal y como se describió anteriormente. Microorganismos Gram positivos y



Gram negativos fueron empleados como “blancos” para este ensayo. Todos se cultivaron en medio BHI de 8 a 12h a 37°C, partiendo de un preinóculo de 24h en el mismo medio. Estos microorganismos se obtuvieron del cepario y del laboratorio 312 de la Facultad de Química de la UNAM. Los microorganismos fueron los siguientes: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis**, *Lactobacillus paracasei**, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* (cepa B)* y *Enterococcus faecalis* (cepa A)* (*Microorganismos aislados del queso Cotija)

6.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-Tris-Tricina y zimogramas

Perfil electroforético

Con el fin de detectar compuestos proteínicos y su peso molecular se llevó a cabo una electroforesis en geles de SDS-Tris-Tricina al 10% siguiendo la metodología descrita por Bazán-Gómez en 2007 (Mini Protean 3 System, Electrophoresis Module, Bio-Rad Laboratories). Se emplean este tipo de geles ya que se sabe proporcionan una mejor resolución en la separación de proteínas con peso molecular entre 1 a 100 kDa (Schägger y Von Jagow, 1987). Se emplearon muestras del extracto crudo precipitado con TCA (ácido tricloroacético) al 10% v/v durante 1 h a 4°C, y se centrifugaron a 14, 000 rpm durante 15 min en una centrifuga Biofuge Primo R, Haereus. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó tres veces con acetona al 90% v/v. Se utilizaron 1.8 mL de muestra (centrifugada, neutralizada y filtrada) para precipitar y posteriormente resuspender en 20-30 µL de buffer de carga del gel (Tris-HCl 3M/SDS 0.3% buffer, pH 8.45) y se utilizaron marcadores de peso molecular alto (SDS-PAGE Standards, High range. No. de catálogo 161-0303. Bio-Rad Laboratories). Las condiciones de la electroforesis fueron 80 V durante 3 h a temperatura de refrigeración (4°C).



Las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomasie G-250 (metanol 40% v/v, ácido acético 10% v/v y azul de Coomasie al 2.5% m/v). Las imágenes se obtuvieron mediante el uso del densitómetro GS-700 (Bio-Rad) y se calcularon los pesos moleculares aproximados de las proteínas.

Identificación de las bandas con actividad

Para identificar las bandas con actividad antibacteriana se utilizaron geles de SDS-Tris-Tricina al 10% con células embebidas con *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich) al 0.2% v/v.

Las condiciones de electroforesis son las mismas que las anteriores y posteriormente se incubaron a 37°C y 50 rpm durante 18 h en una solución renaturalizante (Tris-HCl 100 mM y Tritón 1%, pH 8) para que las proteínas recobraran su actividad.

La actividad se detectó por la presencia de una banda clara o translúcida sobre un fondo opaco. Para aumentar el contraste, el gel fue teñido con una solución de azul de metileno 0.1% v/v en KOH 0.01%v/v durante 20 minutos y posteriormente desteñido con agua destilada hasta observar la aparición de las bandas. Se utilizaron los mismos marcadores de peso molecular para poderlos comparar entre sí.



7. Resultados y discusión

Se verificó la pureza de todos los microorganismos empleados en la realización de este trabajo, mediante la técnica de tinción de Gram. Ésta es una tinción simple que clasifica a las bacterias como Gram positivas o Gram negativas, en función de la composición y estructura de la pared celular. Se comprobó que las 6 cepas eran cocos Gram positivos, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 2. Caracterización de las cepas de estudio

cepa	microorganismo	Morfología bacteriana (microscopia)
A	<i>Enterococcus faecalis</i>	Cocos en pares Gram positivos
B	<i>Enterococcus faecium</i>	Cocos (pares y cadenas) Gram Positivos.
C	<i>Enterococcus faecium</i>	Cocos (pares y cadenas,) Gram positivos
D	<i>Enterococcus faecalis</i>	Cocos en pares Gram positivos
E	<i>Enterococcus faecium</i>	Cocos (pares y cadenas) Gram positivos
G	<i>Enterococcus faecalis</i>	Cocos en pares Gram positivos

Caracterización de las cepas

Anteriormente se mencionó que los enterococos son bacterias no esporuladas, no móviles, no formadoras de pigmentos, catalasa, reductasa y oxidasa negativas; así mismo son resistentes a la kanamicina. Con estos datos se decidió caracterizar las cepas con respecto a su resistencia a la kanamicina y la ausencia de la enzima catalasa.

En el aislamiento de las 6 cepas de enterococos en medio KAA todas lograron hidrolizar la escualina y además se observaron colonias con áreas negras alrededor de las mismas (Figura7), debido a la formación de compuestos fenólicos de hierro derivados de los productos de hidrólisis de escualina y Fe^{2+} , con lo cual se termina de comprobar la naturaleza de las cepas como enterococos

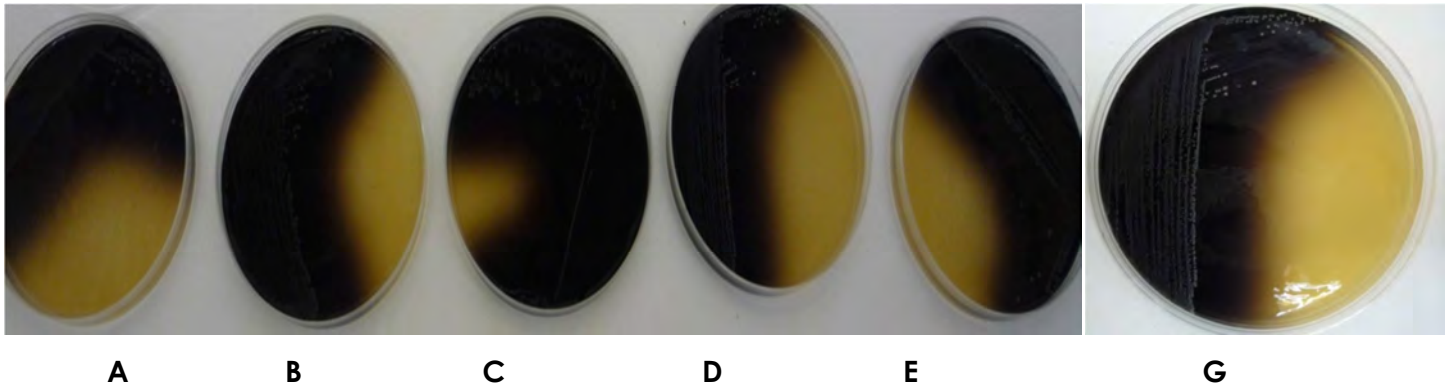


Figura 7. Colonias de *Enterococcus* en medio KAA. A *Enterococcus faecalis*; B *Enterococcus faecium*; C *Enterococcus faecium*; D *Enterococcus faecalis*; E *Enterococcus faecium* y G *Enterococcus faecalis*.

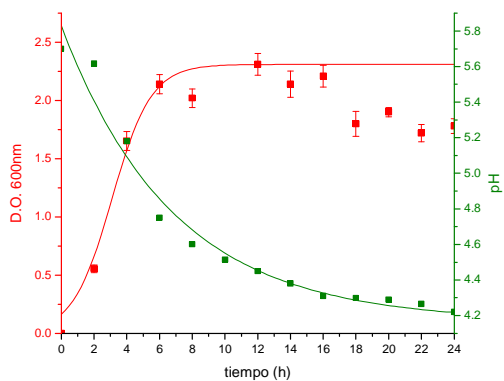
Como parte de la caracterización de estas cepas se realizó la prueba de “catalasa”, en la que todas tuvieron un resultado negativo, corroborando la ausencia de la enzima catalasa. Esta enzima tiene la función de convertir al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.

Cinéticas de crecimiento

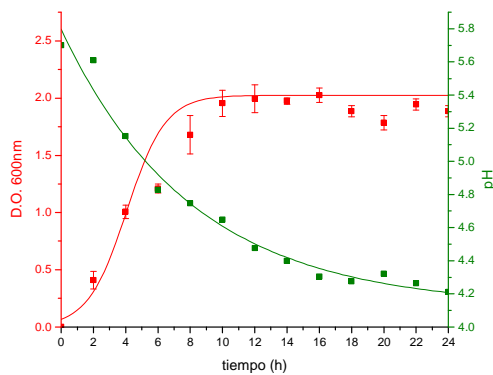
Existen varias técnicas que permiten la cuantificación de los microorganismos. Dentro de los métodos directos, en los cuales se establece la población total de microorganismos existentes en una muestra, se tiene el método de turbidimetría. Este método propone que en una suspensión bacteriana, la cantidad de microorganismos ésta directamente relacionada con la turbidimetría o su densidad óptica, e inversamente relacionada con la cantidad de luz que pasa por la misma (Ramírez Gama *et. al.*, 2006). En la Figuras 8, 9, 10 y 11 se muestran las cinéticas de crecimiento de cada microorganismo en los diferentes medio evaluados. Se presenta el promedio y la desviación estándar de 3 repeticiones para cada experimento.



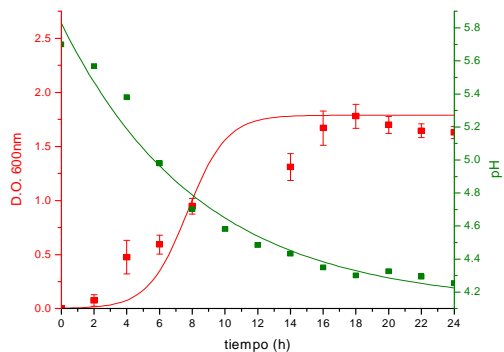
Cepa A: *Enterococcus faecalis*



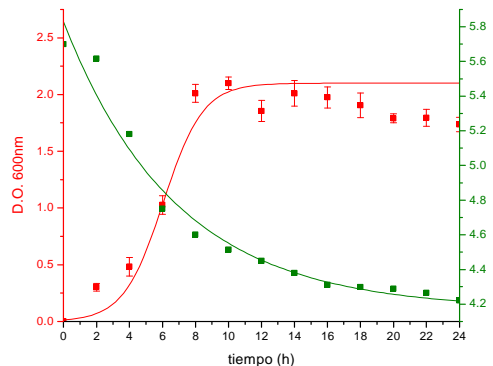
Cepa C: *Enterococcus faecium*



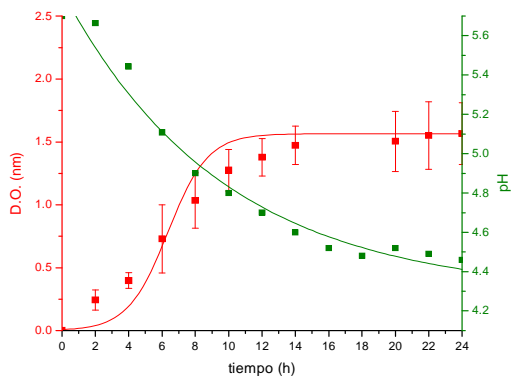
Cepa B: *Enterococcus faecium*



Cepa D: *Enterococcus faecalis*



Cepa E: *Enterococcus faecium*



Cepa G: *Enterococcus faecalis* (Delgado-Arciniega, 20010)

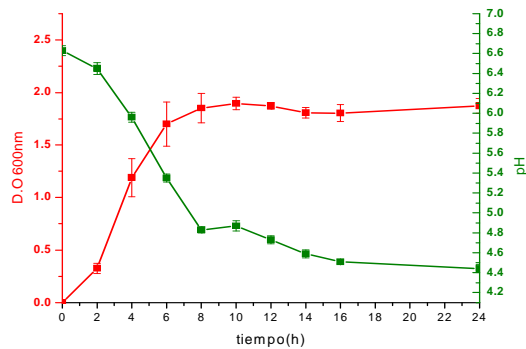
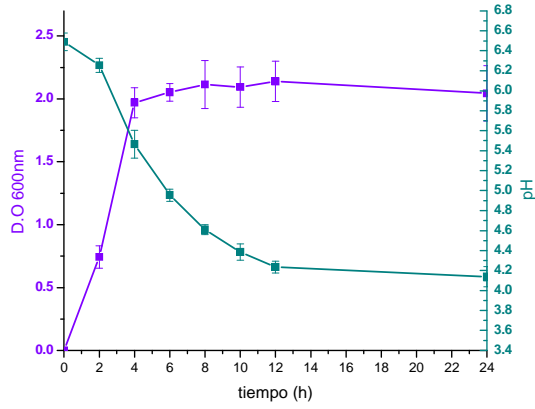


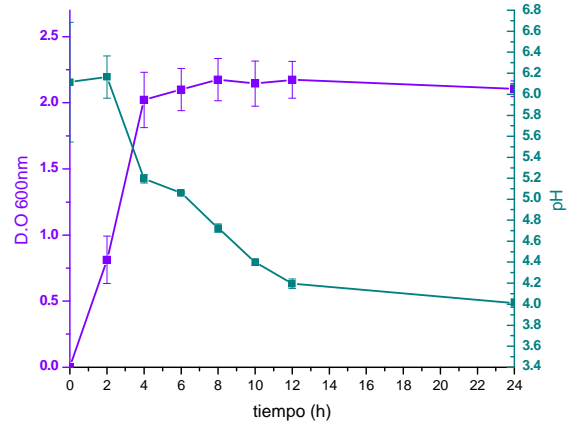
Figura 8. Cinéticas de crecimiento de las cepas en estudio en medio MRS. Se presenta el promedio y desviación estándar de 3 réplicas.



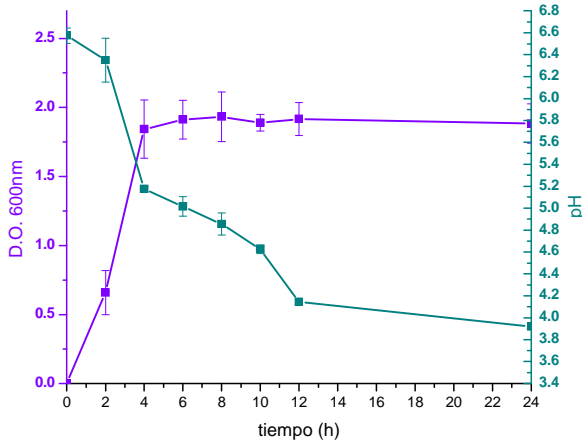
Cepa A: *Enterococcus faecalis*



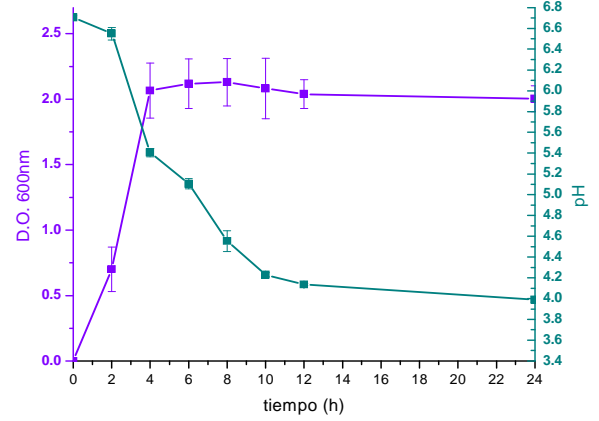
Cepa B: *Enterococcus faecium*



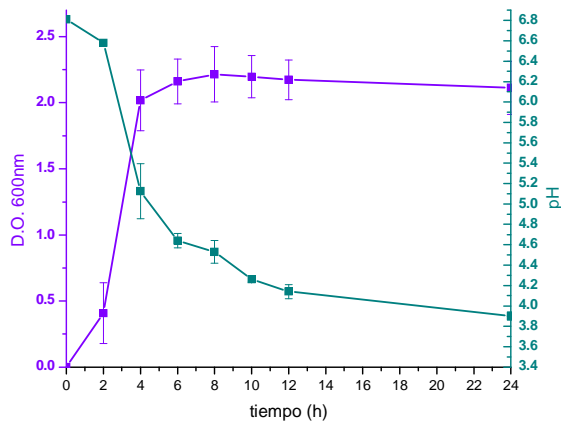
Cepa C: *Enterococcus faecium*



Cepa D: *Enterococcus faecalis*



Cepa E: *Enterococcus faecium*



Cepa G: *Enterococcus faecalis*

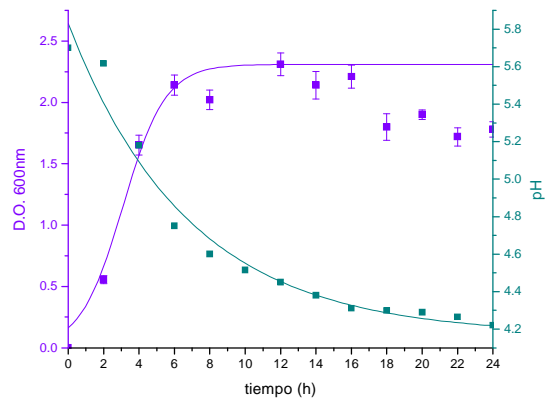
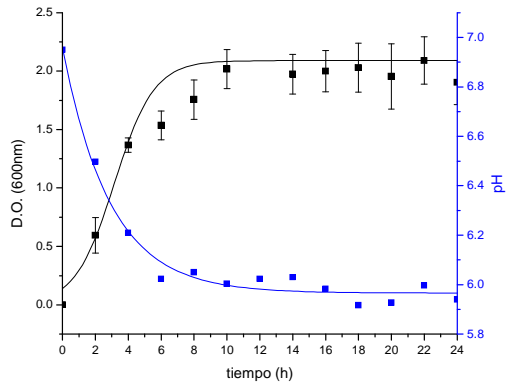


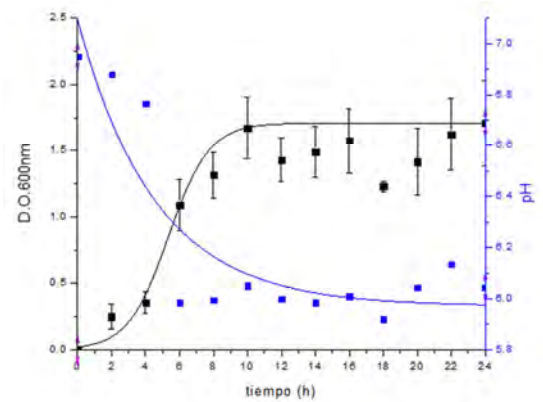
Figura 9. Cinéticas de crecimiento de las cepas en estudio en medio APT. Se presenta el promedio y desviación estándar de 3 réplicas.



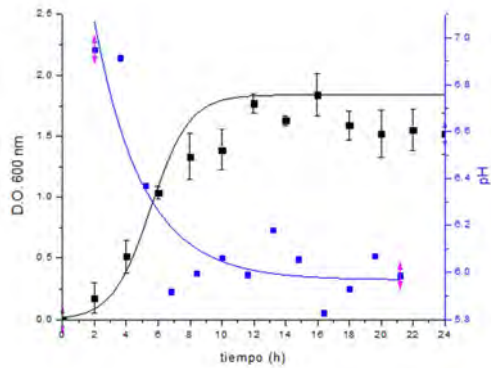
Cepa A: *Enterococcus faecalis*



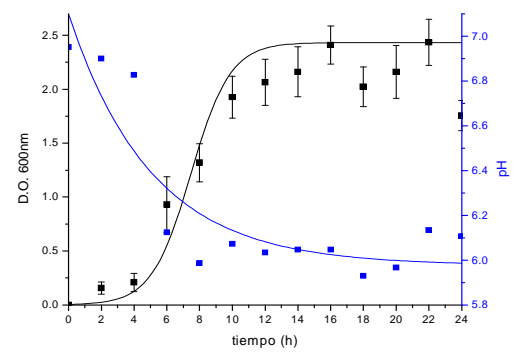
Cepa B: *Enterococcus faecium*



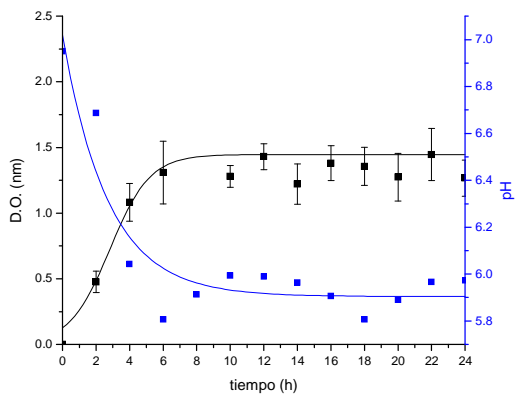
Cepa C: *Enterococcus faecium*



Cepa D: *Enterococcus faecalis*



Cepa E: *Enterococcus faecium*



Cepa G: *Enterococcus faecalis*

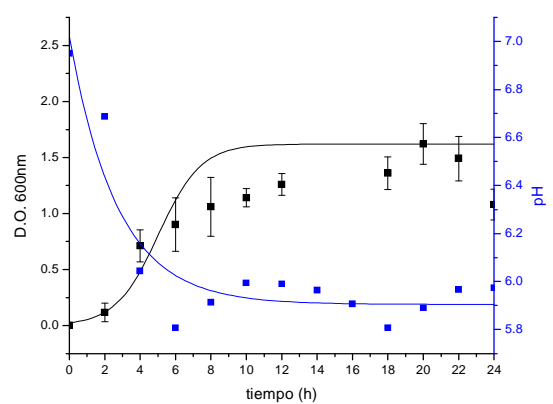
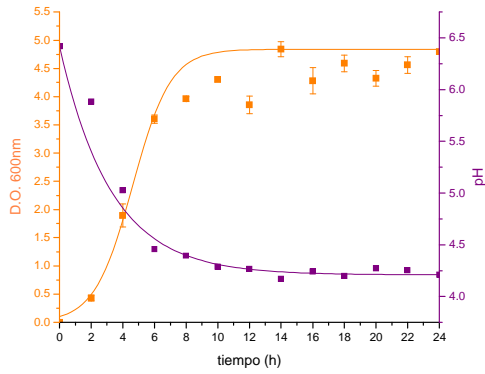


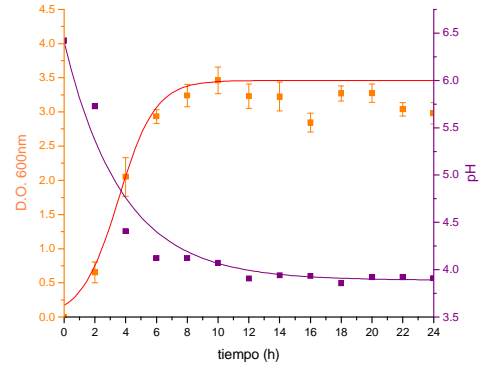
Figura 10. Cinéticas de crecimiento de las cepas en estudio en medio TSB. Se presenta el promedio y desviación estándar de 3 réplicas.



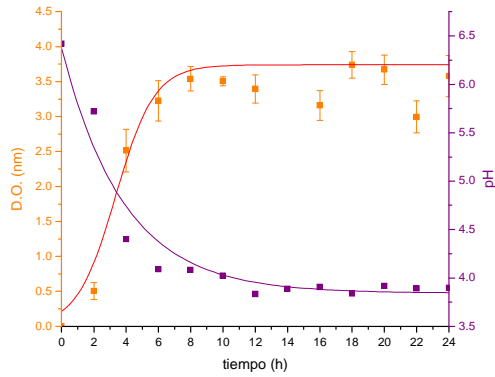
Cepa A: *Enterococcus faecalis*



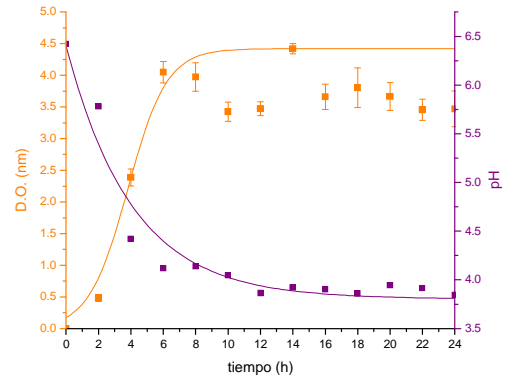
Cepa B: *Enterococcus faecium*



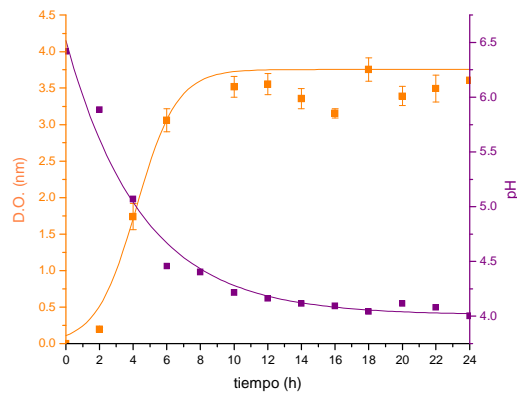
Cepa C: *Enterococcus faecium*



Cepa D: *Enterococcus faecalis*



Cepa E: *Enterococcus faecium*



Cepa G: *Enterococcus faecalis*

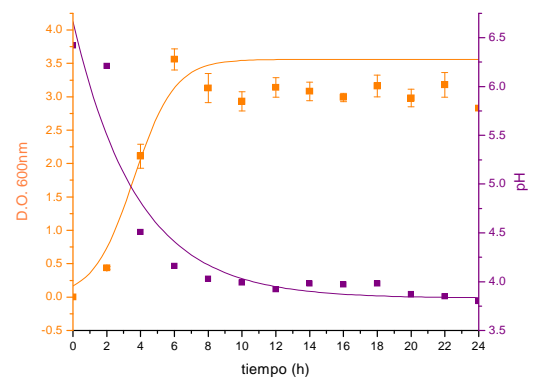


Figura 11. Cinéticas de crecimiento de las cepas en estudio en medio CGB. Se presenta el promedio y desviación estándar de 3 réplicas.



De acuerdo a las cinéticas de crecimiento realizadas en medio MRS, para cada una de las cepas en estudio, se puede observar que éstas alcanzan una densidad óptica de aproximadamente 1.0 (Abs 600nm) en el intervalo de 6 a 8 horas de crecimiento lo cual demuestra su viabilidad y la buena adaptación del inóculo al medio. Otra forma de corroborar esta facilidad de adaptación es la ausencia o la muy corta duración de la fase de latencia (Figura 8). Su máxima densidad óptica se encuentra en el rango de 1.8 a 2.3

En medio APT los enterococos alcanzaron densidades ópticas de alrededor de 2 a las 4 h de crecimiento, lo que corresponde a su fase logarítmica tardía (Figura 9). Esto podría indicar que su capacidad de adaptación al medio MRS es menor dado que tarda más tiempo en llegar a esta fase y de las seis cepas, sólo una (*A: Enterococcus faecalis*) alcanza densidades ópticas por arriba de 2.

En el medio TSB, a pesar de no ser un medio selectivo para BAL, el crecimiento es muy parecido al desarrollado en el medio MRS, con fases de latencia cortas y en algunos casos alcanzando densidades ópticas por arriba de 2 (Figura 10).

Cuando las cepas de enterococos se cultivaron en medio CGB (Figura 11), el comportamiento fue muy diferente al desarrollado en los otros 3 medios. Las fases latencia eran muy cortas, pero a diferencia de las presentes en los demás medios, en éste se alcanzaban densidades ópticas mayores a 2 y al llegar a la fase logarítmica tardía éstas ya tenían una densidad óptica de 4.

Por otro lado la cinética de crecimiento de cada una de las cepas de estudio fue diferente, aunque las condiciones de crecimiento: temperatura y agitación fueron las mismas (Tabla 3). Esto indica que cada una de las cepas es diferente con respecto a las otras, aunque se trate de la misma especie.

Dado que los enterococos presentan un metabolismo homofermentativo, es decir, que su fuente de carbono la degradan principalmente a ácido láctico, esto se vio reflejado en la disminución del pH. En medio MRS se parte de un pH 5.7 inicial hasta 4.43 para la menor acidificación y 4.2 para la mayor, pertenecientes a la cepa E y la D respectivamente, es decir que disminuye más de una unidad. Pero en medio



APT, el descenso de pH es mucho mayor ya que se parte de un pH de casi 6.7 y en algunos casos cae a 4.2. Este fenómeno se repite en el medio CGB el cual inicia en un pH de 6.42 y desciende hasta 3.8 para la máxima acidificación por parte de las cepas B, C y D. En TSB el comportamiento es diferente ya que no se presentó un descenso tan importante en el pH, este inicia en un valor de 6.95 y en su máximo descenso toma valores de 5.9 por efecto del metabolismo de las cepas A, C y E, lo cual se debe a que dicho medio es el que tiene la menor cantidad de glucosa (2.5 g/L) por lo tanto no hay mucho sustrato para la formación de ácido láctico.

Velocidad específica de crecimiento

La constante específica de la velocidad de crecimiento microbiano (μ) se utiliza para caracterizar el comportamiento de una población. Su valor depende principalmente de la composición y concentración del medio de cultivo, presencia de inhibidores, temperatura y pH. Existen diversas expresiones para μ : la más difundida es la ecuación de Monod, que relaciona el valor de μ con la concentración de un componente del medio de cultivo que está en defecto respecto de los requerimientos del microorganismo: el sustrato limitante.

Tabla 3. Velocidad específica de crecimiento de los enterococos en los diferentes medios de cultivo

cepa	MRS (μ)	APT (μ)	TSB (μ)	CBG (μ)
Cepa A	0.24	1.42	0.14	0.37
Cepa B	0.39	1.49	0.31	0.38
Cepa C	0.22	1.41	0.26	0.46
Cepa D	0.32	1.43	0.29	0.53
Cepa E	0.25	1.17	0.19	0.47
Cepa G	0.34	1.2	0.34	0.52

Al analizar la tabla anterior vemos que los mayores valores de constantes de velocidad pertenecen a las cepas en medio de cultivo APT, donde la fase logarítmica dura tan sólo 2 horas. Muy al contrario en medio TSB se presenta los valores más bajos demostrando la baja adaptabilidad de las cepas de enterococos a dicho medio.



Tiempo de obtención del sobrenadante

Una vez realizadas las cinéticas de crecimiento de la cepas en estudio en cada medio de cultivo, se determinaron los tiempos a los cuales se haría la obtención de los sobrenadantes, ya que anteriormente se ha comprobado que al obtener los sobrenadantes en fase logarítmica tardía o fase estacionaria temprana, estos presentan la máxima actividad antibacteriana (Delgado-Arciniega, 2010; Maisnier-Patin, *et al.*, 1996)

Tabla 4. Tiempos de obtención de los sobrenadantes de las cepas en estudio

cepa (h)	MRS		APT		TSB		CGB	
	F. logarítmica	F. estacionaria	F. logarítmica	F. estacionaria	F. logarítmica	F. estacionaria	F. logarítmica	F. estacionaria
A	8	14	4	8	6	9	4	9
B	8	14	4	8	6	10	4	8
C	8	14	4	8	6	10	4	8
D	6	14	4	8	8	10	4	10
E	8	14	4	8	6	10	5	10
G	10	15	6	8	6	10	4	10

En numerosos estudios se ha observado que la estabilidad de los compuestos antibacterianos, en especial las bacteriocinas, disminuye de manera considerable al incrementarse la concentración y purificación de las mismas (De Vuyst y Vandamme, 1994; Moreno *et. al*, 2002).

La concentración y purificación de compuestos antibacterianos de origen proteínico no resulta fácil, algunas de las complicaciones se encuentran relacionadas con la tendencia que tienen dichos compuestos para interaccionar con otras moléculas (grasa o partículas proteínicas) presentes en el medio de cultivo, dado a su alto grado de hidrofobicidad y formación de agregados proteínicos (De Vuyst, 1995).

Con respecto a lo anterior, en el grupo de trabajo se ha implementado una técnica para concentrar el sobrenadante, la cual incluye una centrifugación, en la cual se eliminan las células presentes en el medio, seguido de una neutralización que asegura que el efecto inhibitorio no sea por causa de la presencia de ácido láctico, después se filtra con una membrana para cerciorarnos de la completa eliminación de células y finalmente se liofiliza para concentrar la cantidad de compuestos presentes



en el mismo. Por medio de este sistema se logró determinar la actividad inhibitoria de los extractos.

Determinación de proteína

En la siguiente tabla se muestran las concentraciones de proteína, de cada uno de los sobrenadantes crudos de las 6 cepas de enterococos, producidas en los diferentes medios de cultivo.

Tabla 5. Determinación de proteína por método de Bradford

cepa	MRS		APT		TSB		CGB	
	F. logarítmica	F. estacionaria	F. logarítmica	F. estacionaria	F. logarítmica	F. estacionaria	F. logarítmica	F. estacionaria
A	2.16	3.79	3.55	3.50	1.71	1.78	0.97	1.49
B	4.64	6.81	2.5	2.22	2.52	2.00	1.69	2.54
C	4.99	4.87	3.27	1.89	1.97	2.37	2.428	2.69
D	5.16	4.65	1.02	1.94	2.24	3.03	1.542	2.21
E	2.81	3.76	2.31	2.46	1.74	3.14	2.669	4.04
G	3.68	2.52	2.48	2.9	2.24	2.09	1.616	2.46
Medio de cultivo	2.52		2.48		1.91		1.69	

Se observa que la cantidad de proteína presente en los extractos de los 4 medios, es muy diferente. Podemos ver que en medio MRS y APT se dan las máximas concentraciones, mientras que en medio CGB están las menores. Esto podría deberse a varias razones: la influencia del medio de cultivo en la síntesis de proteínas o la concentración de proteína perteneciente a cada medio.

Pruebas presuntivas en difusión en agar

Los métodos de susceptibilidad antimicrobiana o antibiogramas son métodos in vitro que determinan la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos, bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas (Palavecino, 1997). El método de difusión en agar consiste en poner en contacto al agente antimicrobiano, en una concentración determinada, con el microorganismo en una placa de agar y cuando este difunde se produce una zona



de inhibición. La zona de inhibición se mide y se relaciona inversamente con la concentración del agente.

En seguida pueden observarse las placas obtenidas en la prueba de difusión en agar; usando como microorganismos “blanco” a *S. aureus* y *E. coli*. En cada placa se probaron los sobrenadantes de la fase logarítmica y de la fase estacionaria con los tiempos señalados en la Tabla 4.

El extracto obtenido del crecimiento, de las cepas de enterococos, en medio MRS dio como resultado un leve efecto inhibitorio contra *S. aureus* (Figura 12), ya que el crecimiento de éste se ve disminuido notablemente, pero no por completo. En el caso de *E. coli* el comportamiento es diferente ya que aquí sí se presenta una completa ausencia de crecimiento alrededor de los pozos (Figura 13). Muy pocos reportes revelan la producción de compuestos antibacterianos producidos por enterococos, que tengan actividad sobre bacterias Gram negativas, entre los pocos ejemplos se encuentra una bacteriocina de 3.9 kDa producida por *Enterococcus mundtii* ST15 el cual fue cultivado en medio MRS (De Kwaadsteniet *et al.*, 2005).

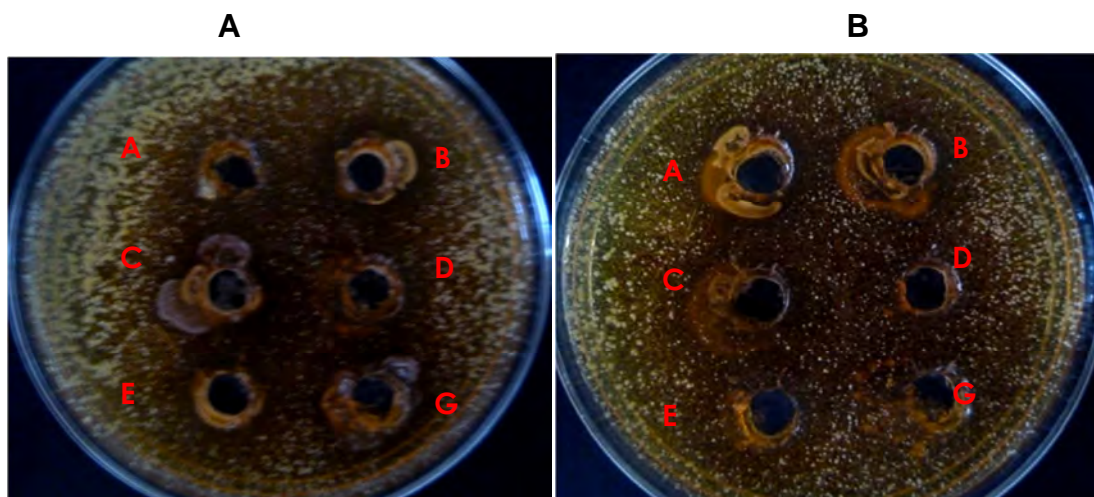


Figura 12. Técnica de difusión en agar, donde se muestran los halos de inhibición de las cepa A, B, C, D, E y G en medio MRS contra *S. aureus*. A fase logarítmica; B fase estacionaria

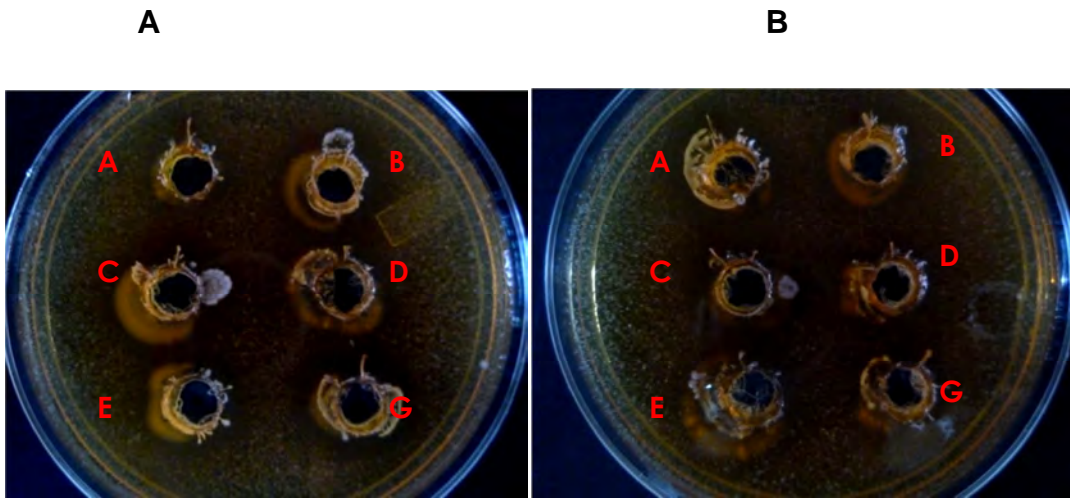


Figura 13. Técnica de difusión en agar, donde se muestran los halos de inhibición de las cepa A, B, C, D, E y G en medio MRS contra *E. coli*. A fase logarítmica; B fase estacionaria

Aparentemente los resultados obtenidos con los sobrenadantes del crecimiento en medio APT, indican un efecto inhibitorio (Figura 14 y 15). Sin embargo al aplicar como control negativo el medio de cultivo (APT) con el mismo tratamiento de semipurificación que los concentrados, se observa que el efecto viene dado por éste (Figura 20) y no por una producción de compuestos antibacterianos por parte de las cepas de *Enterococcus*.

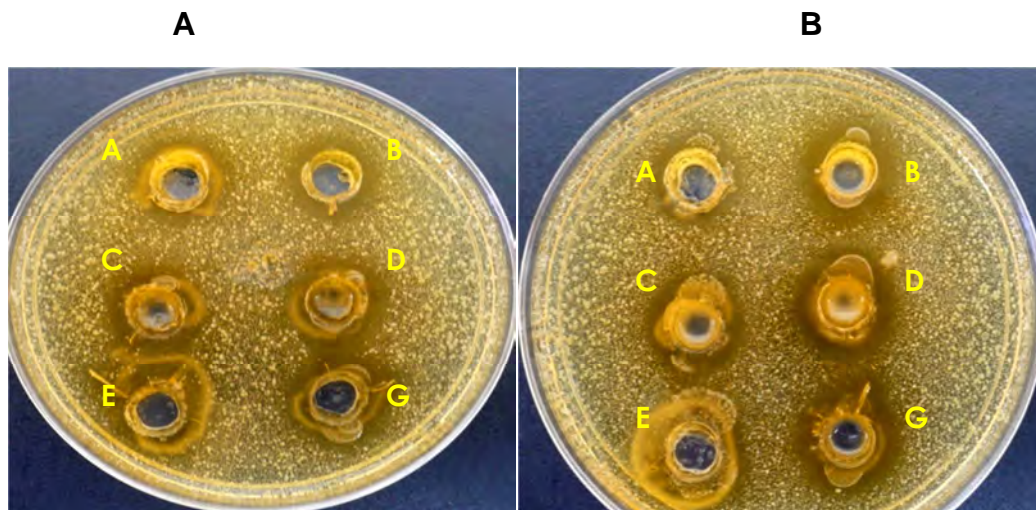


Figura 14. Técnica de difusión en agar, donde se muestran los halos de inhibición de las cepa A, B, C, D, E y G en medio APT contra *S. aureus*, A fase logarítmica; B fase estacionaria.

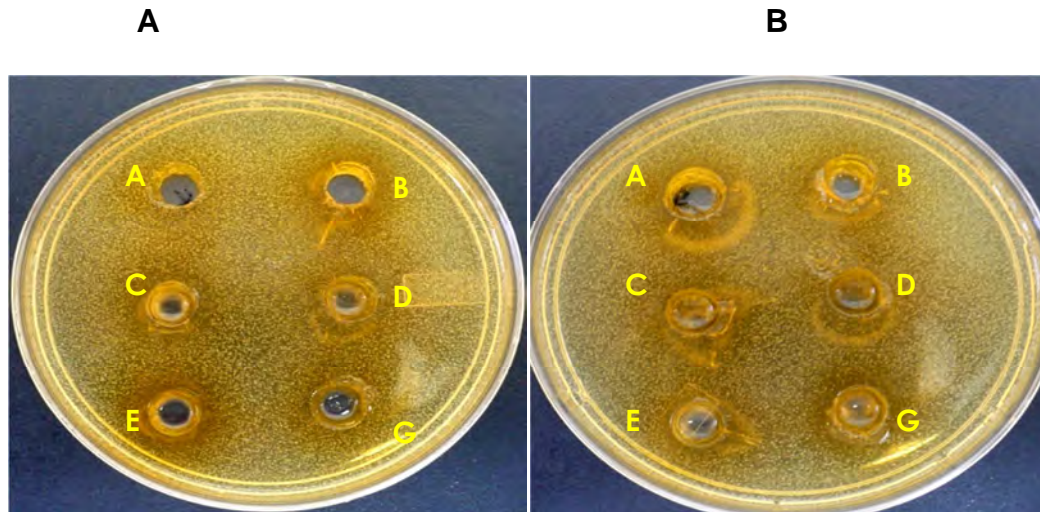


Figura 15. Técnica de difusión en agar, donde se muestran los halos de inhibición de las cepa A, B, C, D, E y G en medio APT contra *E. coli*, A fase logarítmica; B fase estacionaria.

En las Figuras 16 y 17 se puede observar que cuando las cepas son cultivadas en medio TSB, estas no logran sintetizar ningún tipo de compuesto antibacteriano contra los microorganismos indicadores, ya que el césped bacteriano no muestra halos de inhibición, por el contrario, alrededor de los pozos se incrementa el crecimiento bacteriano, lo que indica que los microorganismos están aprovechando los nutrientes y/o compuestos presentes en el extracto para desarrollarse.

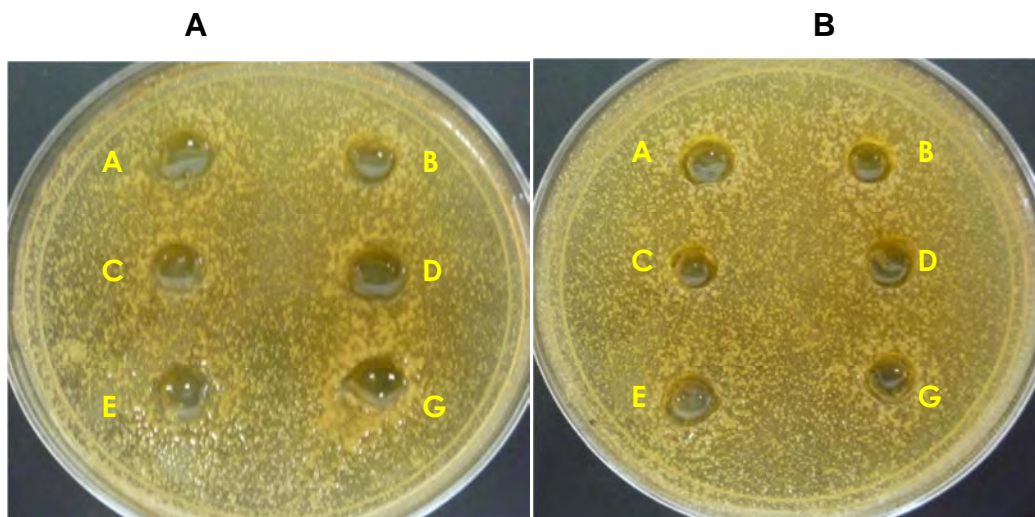


Figura 16. Técnica de difusión en agar, donde se muestran los halos de inhibición de las cepa A, B, C, D, E y G en medio TSB contra *S. aureus*, A fase logarítmica; B fase estacionaria.

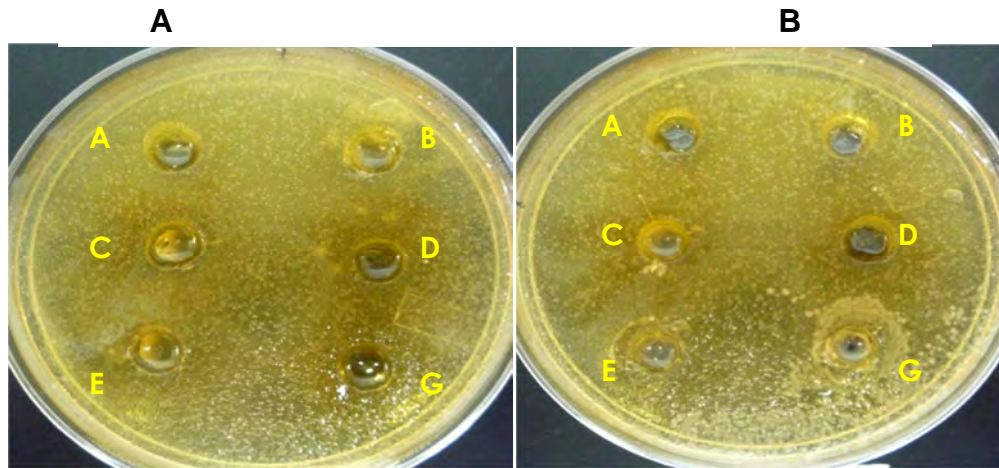


Figura 17. Técnica de difusión en agar, donde se muestran los halos de inhibición de las cepa A, B, C, D, E y G en medio TSB contra *E. coli*, A fase logarítmica; B fase estacionaria.

Los resultados obtenidos después de emplear el medio CGB indican que el crecimiento de *S. aureus* disminuye pero no es significativo, ya que las colonias que están alrededor de los pozos, logran ser de un tamaño considerable. Por otro lado el extracto alcanza a inhibir por completo el crecimiento de *E. coli*. Más adelante se hablará de reportes de enterocinas, BLIS y péptidos producidos por enterococos que tienen actividad contra bacterias Gram positivas y en algunos casos contra Gram negativas.

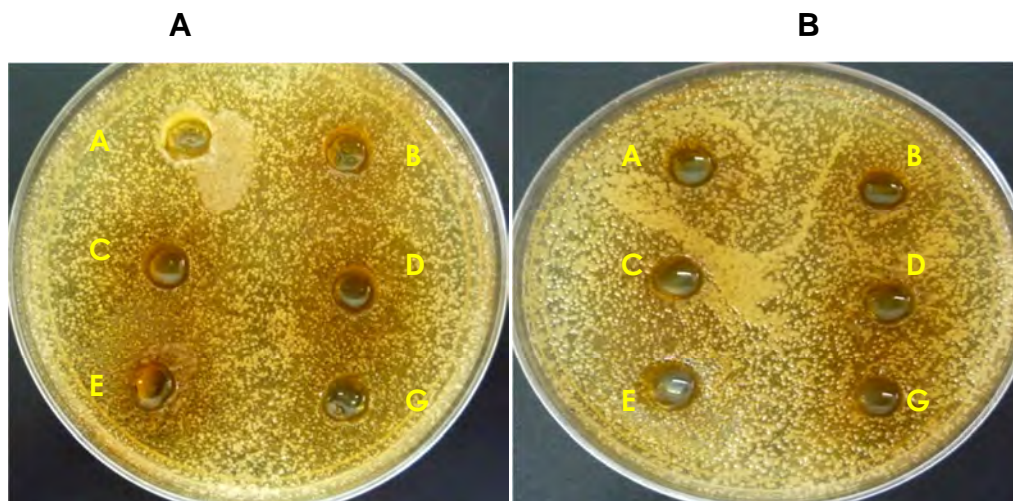


Figura 18. Técnica de difusión en agar, donde se muestran los halos de inhibición de las cepa A, B, C, D, E y G en medio CGB contra *S. aureus*, A fase logarítmica; B fase estacionaria.

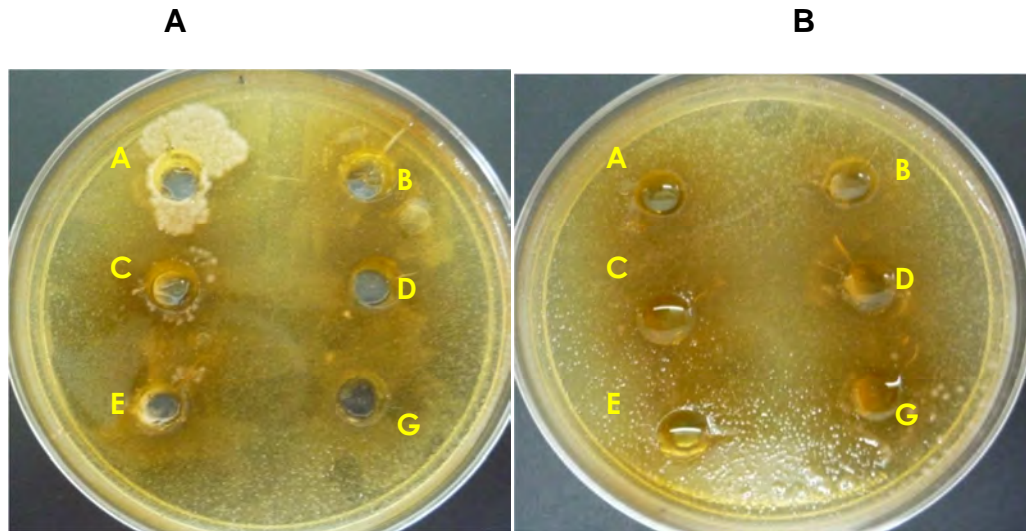


Figura 19. Técnica de difusión en agar, donde se muestran los halos de inhibición de las cepa A, B, C, D, E y G en medio CGB contra *E.coli*, A fase logarítmica; B fase estacionaria.

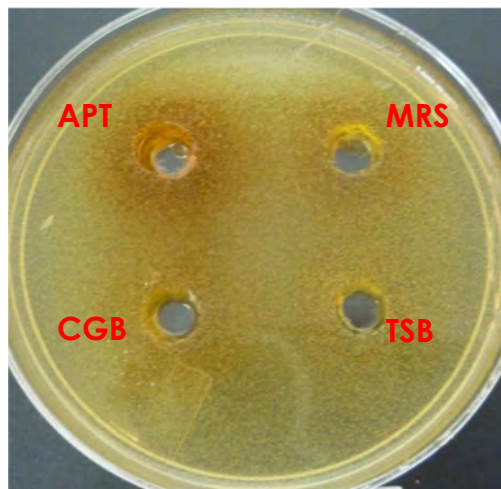


Figura 20. Técnica de difusión en agar, donde se muestra el efecto de los medio de cultivo: MRS, TSB, APT y MRS contra *E.coli*.

Con los resultados mostrados en las Figuras 12 y 13 se demostró que en el medio MRS se producen los mejores resultados en términos de actividad antibacteriana de todas las cepas, mientras que en el medio CGB (Figura 19) sólo tres de ellas (B, C y E) mostraron actividad inhibitoria. Debido a la complicada preparación del medio CGB y que sólo tres cepas logran sintetizar compuestos con actividad, como primera aproximación se podría elegir al MRS como medio modelo para estudiar la síntesis y naturaleza de los compuestos con actividad antibacteriana por las 6 cepas de este trabajo.



Cabe señalar que la producción de proteína parecería ser menor en medio CGB y TSB, ya que en estos medios el máximo de concentración es de 2.5 mg proteína/mL comparado con el máximo de concentración en medio MRS que es por arriba de 6 mg proteína/mL. Para el medio CGB ésta podría ser la razón del porque no se observa actividad inhibitoria por las 6 cepas de enterococos, ya que probablemente no se estén alcanzando las concentraciones necesarias para visualizar el efecto.

Los factores ambientales son los parámetros clave que han marcado influencia sobre la tasa de crecimiento y la formación de sustancias antibacterianas por bacterias. Además, en el caso de bacteriocinas y otros compuestos proteicos, la producción depende en gran medida la composición del medio (Settanni *et. al.*, 2008).

Con los resultados obtenidos se observa que la adaptación a un medio de cultivo y su viabilidad en el mismo no está relacionada con la capacidad de síntesis de proteínas. Esto se observó con el caso particular de las 6 cepas de *Enterococcus sp.* en medio CGB, donde las D.O. (600nm) >3.5, las máximas alcanzadas en todos los medios y que presentaron las menores concentraciones de proteína/mL (Tabla 5). Por lo que podría decirse que este medio de cultivo no favorece la síntesis de proteínas y compuestos antibacterianos.

Analizando la composición de los medios vemos que a simple vista son similares, es decir, se componen en esencia de los mismos nutrientes. Sin embargo las concentraciones de algunos de ellos varían considerablemente entre los diferentes medios a demás se cuenta con otros micronutrientes. Dentro de los nutrientes que más se han investigado por su relación con la producción de compuestos antibacterianos (bacteriocinas y BLIS) son la fuente de carbono (Settanni *et. al.*, 2008; Audisio *et. al.*, 2001; Parente *et. al.*, 1997; Wenhua *et.al.*, 2005; De Vuyst, 1995) la fuente de nitrógeno (De vuyst, 1995, Settanni *et. al.*, 2008; Chan *et.al.*, 2002) y la concentración de NaCl (Neysens *et. al.*, 2003).



Efecto de la fuente de nitrógeno

Se ha demostrado que la concentración o ausencia de la fuente de nitrógeno, peptona y/o extracto de levadura, ayuda al incremento de la producción de compuestos antibacterianos (bacteriocinas) en *Enterococcus faecium* (Pantev A. 2002). Settani *et. al.*, en el 2008, al estudiar el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de BLIS, encontró que el mayor efecto negativo era observado para los casos de BLIS WGJ40.2 y BLIS W GK53 cuando la fuente de nitrógeno sólo era triptona y extracto de carne. En otro estudio donde se prueba el efecto del extracto de carne para la producción de un péptido con actividad antimicrobiana (ST4SA), se cree que los bajos resultados al usar esta fuente de nitrógeno es porque probablemente dicho extracto contenía proteasas que estuvieran degradando el péptido (Todorov y Dicks, 2009). La triptona, también llamada peptona-caseína de tipo I, es un digerido pancreático que contiene todos los aminoácidos que se encuentran en la caseína, así como las grandes fracciones peptídicas. Aclarando lo anterior, podemos relacionar ese efecto negativo en la producción de BLIS con el que se observa en este estudio, de los extractos obtenidos del medio TSB, el cual contiene peptona-caseína y peptona de soya como fuente de nitrógeno. Debe comentarse que todos los medios de cultivo contienen un tipo de digerido pancreático de caseína a excepción del MRS el cual sólo contiene peptona, bactopectona proteasa y extracto de levadura. Varios autores informan que se observa un incremento en la actividad de algunas bacteriocinas al aumentar las concentraciones de nitrógeno (Settanni *et. al.*, 2008) y nuestros resultados muestran este mismo comportamiento ya que el MRS tiene un contenido de 22g/L de proteína (sumando los componentes con naturaleza proteínica) contra un promedio de 20g/L de los demás medios.

Muy por el contrario, otros autores hacen referencia a los buenos rendimientos de producción de compuestos antibacterianos en presencia de triptona. Todorov S. y Dicks L., en el 2005 demostraron que la producción de una bacteriocina (ST28MS) se veía estimulada por la presencia de triptona (20g/L), mientras que otra (ST26MS) no recibía tal estímulo, ambas bacteriocinas sintetizadas por *Lactobacillus plantarum* ST194BZ. Así bien, la expresión y producción óptima de un péptido antimicrobiano



de *Enterococcus mundtii* necesita de la presencia de triptona, extracto de levadura o una combinación de ambas (12.5 g/L + 7.5 g/L) para su crecimiento en un medio MRS modificado (Todorov y Dicks, 2009); este mismo fenómeno se presenta en la síntesis de la bacteriocina ST23LD por otra cepa de *Lactobacillus plantarum* (Todorov y Dicks, 2006). Ahora bien, el análisis de lo anterior nos lleva a suponer que el medio de cultivo TSB es deficiente en triptona, ya que las tres referencias aquí mencionadas tienen como concentración óptima de triptona 20g/L y el medio TSB (OXOID) tiene tan sólo 17g de la misma.

En el estudio del efecto del medio de cultivo para la producción de las bacteriocinas ST28MS y ST26MS se vio el efecto negativo de la presencia de soya como fuente de nitrógeno, ya que los rendimientos en la producción eran sumamente bajos. Con esto se intuye que la inhibición de síntesis de proteínas por las 6 cepas de enterococos en este estudio, no sólo se debe al efecto de la baja concentración de triptona, sino que además el medio TSB contiene 3g/L de peptona de soya (Todorov y Dicks, 2005¹).

Efecto de la fuente de carbono

La fuente de carbono resulta ser un factor ampliamente analizado, donde algunos reportes indican que la máxima producción de compuestos antibacterianos, en específico para bacteriocinas, se ve favorecida en concentraciones iniciales de glucosa de 20g/L. Aunque también se ha observado que un aumento de esa concentración inicial no es proporcional al incremento en la síntesis de estos compuestos (Parente E. 1997). Esto mismo se demostró en el trabajo de Todorov y Dicks en el 2005¹ al tratar de identificar la fuente de carbono para la producción óptima de una bacteriocina, donde se concluyó que la glucosa a una concentración de 20g/L daba los mejores resultados para obtener la mejor actividad, si bien a concentraciones de 30 y 40 g/L dicha actividad se veía reducida a la mitad. Settanni en su trabajo del 2008 reporta que la fuente de carbono es de los parámetros más importantes, ya que en ausencia de carbohidratos no hay producción de BLIS por parte de *E. mundtii* WGJ20.1, WGJ40.2 y WGK53. En esa misma investigación se



compara la producción de BLIS en presencia de diferentes hexosas y pentosas, dando como resultado que la glucosa es la mejor fuente de carbono para favorecer la producción de dichos compuestos.

Los cuatro medios de cultivo de este trabajo contienen glucosa, pero en diferentes concentraciones, siendo el medio TSB el que presenta la mayor deficiencia y el MRS quien contiene los 20 g/L ideales para producción de compuestos antibacterianos según lo antes mencionado.

Efecto de NaCl

Algunos estudios describen el efecto desfavorable de la adición de sal (NaCl) en la producción y actividad de proteínas extracelulares por BAL. En contraste, cuando ésta se aplica a bajas concentraciones (10-20 g/L), el cloruro de sodio ejerce un efecto benéfico en la producción de sakacina P y lactacina 481, dos bacteriocinas producidas por *Lactococcus sakei* y *lactococcus lactis*, respectivamente (Neysens P. *et. al.*, 2003). En el presente trabajo se puede concluir que la presencia de NaCl no favorece la actividad de las proteínas extracelulares, de hecho se podría pensar que sí hay producción de estas, pero la presencia de sal podría estar inhibiendo su actividad; ya que en los medios de cultivo donde no se detectó actividad antibacteriana hay NaCl en su formulación, pero las concentraciones de proteína son mucho mayores que en CGB, donde sí se observa actividad inhibitoria sobre los microorganismo indicadores. Por otro lado se debe tomar en cuenta que las cepas de este estudio fueron aisladas de un queso con una concentración de NaCl aproximadamente del 3.5% m/m lo que nos llevaría a cuestionarnos si dentro de esta matriz alimentaria hay producción de los compuestos antibacterianos detectados en este trabajo.

Efecto de otros nutrientes

Se ha visto que en general el Tween 80, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso y el citrato de amonio, no tienen efecto sobre la producción de sustancias de carácter inhibitorio (Settanni *et. al.*, 2008). Como caso particular se tiene que en la



producción de nisina la concentración de sulfato de magnesio no tiene efecto significativo sobre los rendimientos (De Vuyst & Vandamme, 1994).

Por otro lado Todorov y Dicks en el 2005² indican que la adición de tween 80 al medio donde se estaban produciendo 2 bacteriocinas, sólo una lograba ser estimulada positivamente (ST28MS), mientras que la producción de la otra bajaba considerablemente (ST26MS). En otro estudio sobre la producción de un péptido antimicrobiano se tuvo que con la adición de tween 80 incrementa hasta en un 50% la síntesis del mismo (Todorov y Dicks, 2009).

Varios autores explican que la presencia de fosfato de potasio dibásico no tiene efecto directo sobre la producción bacteriocinas, sin embargo es la mejor fuente de iones potasio, así como agente tampón (De Vuyst y Vandamme, 1994). En el trabajo de Todorov S. y Dicks L. en el 2005² se demuestra que a concentraciones de 10 y 20 g/L de fosfato de potasio dibásico se estimula la síntesis de un péptido con actividad antimicrobiana.

En general la presencia de estos nutrientes se debe a que cubren las necesidades de algunos ácidos grasos, factores de crecimiento y micronutrientes.



Actividad específica de las cepas productoras de compuestos antibacterianos

Después de detectar en que medio de cultivo las cepas lograban sintetizar compuestos antibacterianos contra los microorganismos indicadores, se decidió elegir la fase de crecimiento en la cual la actividad específica, determinada como mm de inhibición/mg de proteína, era mayor. Obteniendo los siguientes resultados

Tabla 6. Actividad específica de las cepas cultivadas en medio MRS contra el microorganismo indicador S. aureus. Se presenta el promedio de 3 réplicas.

cepa	mm de inhibición/mg proteína
a logarítmica	48.52
b logarítmica	23.43
c logarítmica	22.12
d logarítmica	29.48
e logarítmica	41.61
g logarítmica	42.66
a estacionaria	40.97
b estacionaria	19.67
c estacionaria	29.90
d estacionaria	30.20
e estacionaria	38.72
g estacionaria	57.72

Tabla 7. Actividad específica de las cepas cultivadas en medio MRS contra el microorganismo indicador E. coli. Se presenta el promedio de 3 réplicas.

cepa	mm de inhibición/mg proteína
a logarítmica	40.82
b logarítmica	22.25
c logarítmica	6.01
d logarítmica	14.21
e logarítmica	27.23
g logarítmica	24.43
a estacionaria	21.08
b estacionaria	6.37
c estacionaria	16.78
d estacionaria	20.42
e estacionaria	22.17
g estacionaria	35.04



Con los datos de actividad específica (Tabla 6 y 7) se encontró que la máxima actividad de las cepas A, B y E era cuando se encontraban en la fase logarítmica tardía, que corresponde en promedio a las 8 horas de crecimiento, mientras que para las cepas C, D y G la máxima actividad se daba cuando llegaban a la fase estacionaria temprana, es decir entre las 12 y 14 h de crecimiento.

Analizando los valores obtenidos de actividad específica sobre *S. aureus* las cepas A en fase logarítmica y G en fase estacionaria, muestran los valores más altos y las cepas B en fase logarítmica y C en fase estacionaria tienen las actividades más bajas. Por otro lado, contra *E. coli* se repite que las cepas A en fase logarítmica y G en fase estacionaria, sean las de mayor actividad mientras que la cepa D en fase estacionaria es la de menor actividad.

Tabla 8. Actividad específica de las cepas cultivadas en medio CGB contra el microorganismo indicador E. coli. Se presenta el promedio de 3 réplicas.

cepa	mm de inhibición/mg proteína
a logarítmica	0.00
b logarítmica	32.54
c logarítmica	29.51
d logarítmica	0.00
e logarítmica	0.00
g logarítmica	0.00
a estacionaria	0.00
b estacionaria	0.00
c estacionaria	0.00
d estacionaria	0.00
e estacionaria	11.15
g estacionaria	0.00

Como se mencionó anteriormente, cuando las cepas crecieron en medio CGB, no todas lograron sintetizar compuestos antibacterianos. Del análisis de actividad específica se tiene que sólo las cepas B, C y E en fase logarítmica tardía muestran una inhibición del crecimiento de *E. coli* (Tabla 8). Con respecto a los resultados vemos que la cepa B es la que presenta una mayor actividad específica. Tanto la



cepa B como la C presentan valores bastante mayores en este medio que los obtenidos en medio MRS.

Espectro de inhibición

Se tienen antecedentes respecto a compuestos antibacterianos, principalmente de origen proteínico (bacteriocinas y PGH's) producidos por las BAL que presentan la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias Gram + y algunas de ellas incluso poseen actividad contra microorganismos patógenos y causantes de la descomposición en los alimentos, tal es el caso de las siguientes especies: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens*, (De Vuys y Vandamme,1994) *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* entre otras.

Entre las bacterias Gram (+) presentes en este estudio y de importancia por su patogenicidad están *S. aureus* y *L. monocytogenes*. *S. aureus* es un importante patógeno bacteriano que es responsable de una gama amplia y divergente de las infecciones humanas y animales, incluyendo mediadas por toxinas, enfermedades transmitidas por los alimentos. En muchos países, *S. aureus* es considerado el segundo o tercer patógeno bacteriano más frecuente como causa de brotes de intoxicación alimentaria, después de *Clostridium perfringens* y *Salmonella* (Muñoz et al., 2007). Entre los alimentos que frecuentemente se ven involucrados en el envenenamiento alimentario causado por *Staphylococcus* se encuentran la carne y los productos cárnicos; los productos avícolas y los huevos; las ensaladas como la de huevo, atún, pollo, papas y macarrón; los productos de panadería como los pasteles rellenos con crema, las tartas cremosas y los chocolates; y además, la leche y los productos lácteos (Referencia en línea 3). *L. monocytogenes* está ampliamente distribuida en el ambiente, se encuentra en suelo y agua, los vegetales llegan a ser contaminados directamente por el suelo o simplemente por estiércol usado como abono. Está presente en animales saludables (especialmente el ganado vacuno, ovejas y aves), estos pueden portar la bacteria, sin parecer enfermos, y pueden contaminar alimentos de origen animal como carnes y producto lácteos.



Recientemente se sabe que *B. cereus* llega a causar toxoinfecciones y se conoce que son dos tipos de enfermedades causadas por dos tipos de metabolitos diferentes. Los síntomas del envenenamiento alimentario tipo diarreico causado por *B. cereus* son muy parecidos a los ocasionados por *Clostridium perfringens*. Se han aislado algunas cepas de *B. subtilis* y *B. licheniformis* en corderos y pollos involucrados en casos de envenenamiento por alimentos. Estos microorganismos han demostrado producir una toxina altamente termoestable, semejante al tipo de toxina producida por *B. cereus* causante de vómitos (Referencia en línea 3)



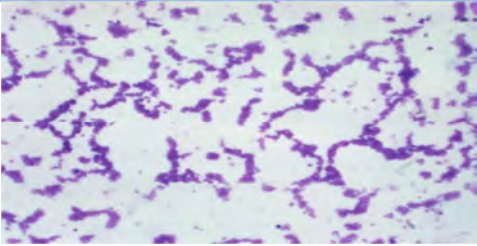
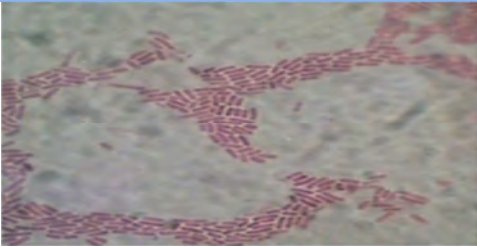
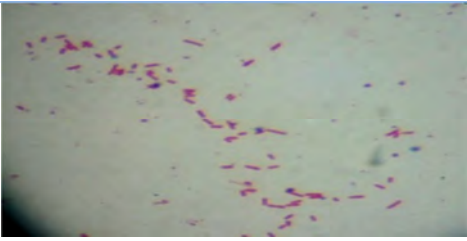
Varias especies de la familia de enterobacterias son responsables de enfermedades infecciosas, que pueden adquirir carácter epidémico; en el caso de los productos lácteos, *Salmonella spp.* y *E. coli* son las más alarmantes. *Yersinia enterocolitica* es un nuevo género de importancia en lácteos, ya que tiene la capacidad de crecer y reproducirse en cámaras frigoríficas y así se puede encontrar en la leche y en los helados (Alais, 1985). Este microorganismo también se desarrolla en otros alimentos tales como carnes de cerdo, de vaca, de cordero, etc., en las ostras y el pescado (Referencia en línea 3). *Pseudomonas aeruginosa* (Gram -), también pertenece a las enterobacterias, presenta problemas en la industria alimentaria ya que puede descomponer los alimentos que se mantienen en refrigeración al mantener un metabolismo basal en estas condiciones y producir enzimas hidrolíticas, además de su actividad como bacteria patógena (Soberón G., en red). La leche contiene frecuentemente bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, transportadas principalmente por el agua impura. Las especies más representativas en la leche son: *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* y *P. pútida* (Alais, 1985).

Con todos estos antecedentes el proyecto continuó con el análisis de los sobrenadantes obtenidos a partir de las cepas de enterococos en la fase de mayor productividad, buscando algún tipo de inhibición sobre los microorganismos antes descritos.

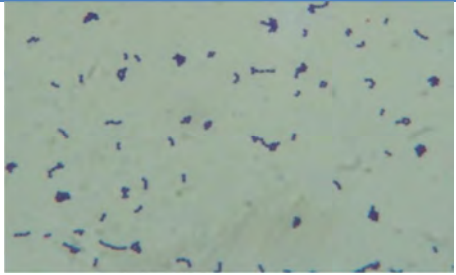

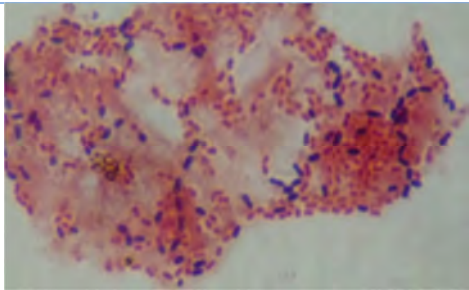
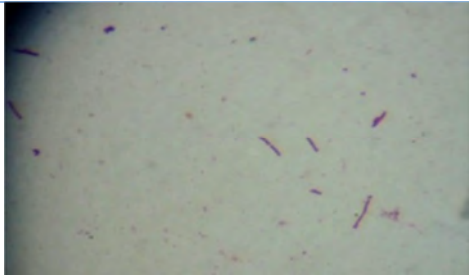
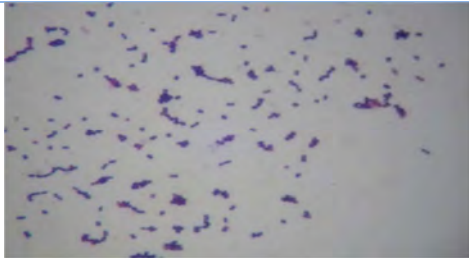
Como primer paso, se realizó la tinción de Gram de cada microorganismo “blanco”, para confirmar su pureza (Tabla 9) y su morfología microscópica.



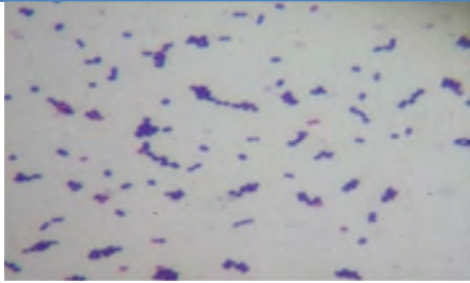
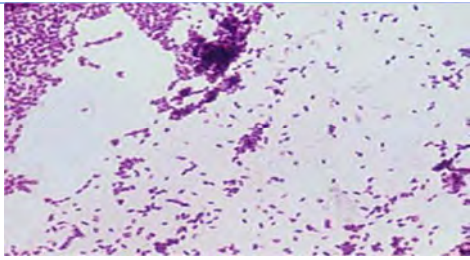

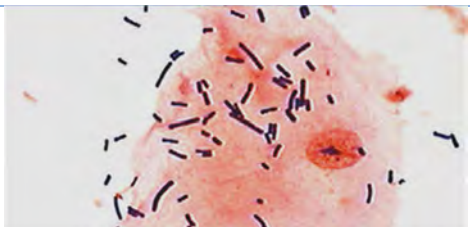

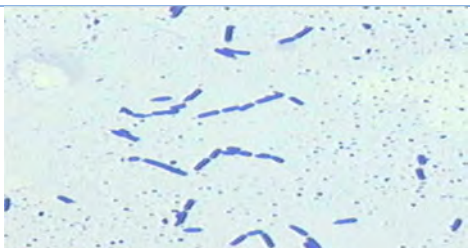
Tabla 9. Tinción de Gram de las cepas para el espectro de inhibición

microorganismo	Descripción/Tinción de Gram	Tinción de Gram
<i>P. aeruginosa</i>	Bacilo Gram negativo	
<i>S. pyogenes</i>	Coco Gram positivo	
<i>S. aureus</i>	Coco Gram positivo	
<i>E. coli</i>	Bacilo Gram negativo	
<i>S. typhimurium</i>	Bacilo Gram negativo	

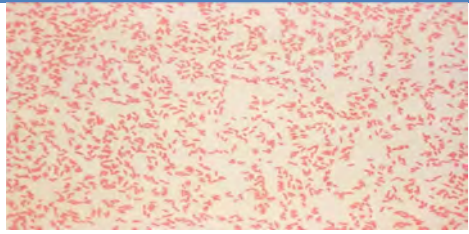


<i>L. brevis</i> *	Bacilo Gram positivo	
<i>L. paracasei</i> *	Bacilo Gram positivo	
<i>B. cereus</i>	Bacilo Gram positivo *La tinción tiene residuos de Safranina.	
<i>B. subtilis</i>	Bacilo Gram positivo	
<i>E. faecium (B)</i> *	Coco Gram positivo	



<i>E. faecalis</i> (A)*	Coco Gram positivo	
<i>L. monocytogenes</i>	Bacilo Gram positivo	
<i>P. cerevisiae</i>	Coco Gram positivo	
<i>L. rhamnosus</i>	Bacilo Gram positivo	
<i>L. casei</i>	Bacilo Gram positivo	
<i>L. plantarum</i>	Bacilo Gram positivo	



<i>Y. enterocolitica</i>	Bacilo Gram negativo	
--------------------------	----------------------	--

Después de comprobar la pureza de las cepas, se realizó la prueba de difusión en agar. Con el fin de mantener estas mismas condiciones en experimentos futuros, se midió la densidad óptica (600nm) lo cual nos permitió tener un mayor control sobre la reproducibilidad.

Tabla 10. Condiciones para realizar la prueba de difusión en agar

Microorganismo	D.O. 600nm
<i>E. coli</i>	2.2
<i>S. aureus</i>	1.8
<i>S. typhimurium</i>	1.4
<i>B. cereus</i>	1.03
<i>B. subtilis</i>	1
<i>L. monocytogenes</i>	1.7
<i>S. pyogenes</i>	1.8
<i>P. aeruginosa</i>	1.2
<i>Y. enterocolitica</i>	2.9
<i>P. cerevisiae</i>	1.1
<i>Lb. casei</i>	1.02
<i>Lb. rhamnosus</i>	1.02
<i>Lb. plantarum</i>	1.13
<i>Lb. pentosus</i>	2
<i>Lb. paracasei</i>	2.8
<i>Lb. brevis</i>	1.76
<i>E. faecium</i>	1.9
<i>E. faecalis</i>	2.3

En la Tabla 10 vemos que todos los microorganismos se adaptaron de forma favorable al medio BHI ya que es un medio rico en nutrientes. Por otro lado se puede



concluir que las bacterias ácido lácticas crecen de buena manera en este medio, alcanzando en su mayoría D.O. >1.5 y entre las bacterias Gram (-) *E. coli* y *Y. enterocolitica* muestran los mejores resultados.

Al llevar a cabo la prueba presuntiva de difusión en agar, se obtuvo como resultado la inhibición de las siguientes cepas (Tabla 11) por los diferentes extractos, en su mayoría pertenecientes al medio de cultivo MRS (Figuras 21 a 24).

Tabla 11. Espectro de inhibición

Microorganismo	MRS						CGB		
	A	B	C	D	E	G	B	C	E
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>B. cereus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	+
<i>S. pyogenes</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. casei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. rhamnosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. plantarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. pentosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. paracasei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. brevis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cotter en su trabajo del 2005 sobre las bacteriocinas indica que estas tienen un especial efecto inhibitorio sobre bacterias que estén relacionadas filogenéticamente con la cepa productora. Dados esos antecedentes se probaron los extractos crudos



contra 5 cepas de lactobacilos y 2 cepas de enterococos (cepa A y B), sin embargo no se encontró actividad inhibitoria en ninguno de los casos, lo cual haría que descartáramos la posibilidad de tener bacteriocinas como compuestos antibacterianos. Así bien, de estos resultados también se puede inferir que los compuestos extracelulares producidos por las 6 cepas de enterococos no tienen efecto negativo sobre sí mismas.

Son pocos los reportes que indican la producción de compuestos antibacterianos producidos por BAL y principalmente enterococos, que tengan actividad sobre bacterias Gram negativas. Anteriormente se mencionó que existen enterocinas (clase II) con capacidad de mostrar actividad contra bacterias Gram negativas como: *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*, *S. enterica* serovar *Choleraesuis*, *S. enterica* serovar *Typhimurium*, *S. enterica* serovar *Gallinarum*, *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* (Line *et. al.*, 2008; Izquierdo *et. al.*, 2008). Así como el caso de Simonetta y colaboradores en 1997 que reportaron la actividad antibacteriana sobre *Vibrio cholerae* de 7 cepas de *Enterococcus faecalis*, 5 de *Enterococcus faecium* y 4 de *Enterococcus durans*, aislados de leche y productos lácteos de Santa Fe (Argentina). Un tercer estudio sobre la caracterización de un bacteriocina de 3944 Da producida por *Enterococcus mundtii* ST15 resulta tener actividad sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas tales como: *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus sakei*, *Propionibacterium sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus caprinus* and *Streptococcus pneumoniae* (De Kwaadsteniet *et al.*, 2005). En estos tres estudios se aclara que no se ha podido dilucidar la forma en que estos compuestos logran atravesar la membrana de las bacterias Gram negativas para causar daño. En algunos casos la permeabilidad de la membrana de lipopolisácaridos se ve afectada por un cambio de polaridad, debido a la presencia de altas concentraciones de sales y pH muy bajo, pero en nuestro caso no se presentan esas condiciones.

Al analizar la actividad específica (mm de inhibición/mg proteína) para cada una de las cepas se observa que el extracto crudo perteneciente a la cepa D en medio MRS



tienen la mayor o de las más altas actividades inhibitorias sobre *S. typhimurium*, *B. cereus* y *Y. enterocolitica*, la cepa C en medio MRS tiene la máxima actividad sobre *B. cereus*, para inhibir a *S. pyogenes* el extracto de la cepa A en medio MRS tuvo los mejores resultados y finalmente la cepa C en medio CGB muestra una notable actividad sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*. Cabe señalar que en cada uno de estos eventos se corroboró la actividad inhibitoria de los extractos sobre *E. coli* y *S. aureus*.

Tabla 12. Actividad específica del espectro de inhibición. Se presenta el promedio de 3 réplicas

microorganismo	mg proteína /mL	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Extracto		mm de inhibición/ mg de proteína				
A-MRS	3.72	13.58	14.25	18.82	13.11	0
B-MRS	3.72	8.46	18.81	11.55	17.22	0
C-MRS	3.68	11.56	0	22.18	15.65	7.62
D- MRS	3.41	14.09	11.01	20.98	21.42	9.68
E- MRS	3.89	5.02	0	13.25	14.15	0.00
G- MRS	4.16	6.38	0	14.44	7.94	0.00
B-CGB	2.13	0	0	0	0	0.00
C- CGB	2.94	0	0	0	0	20.94
E-CGB	2.48	0	0	0	0	10.10

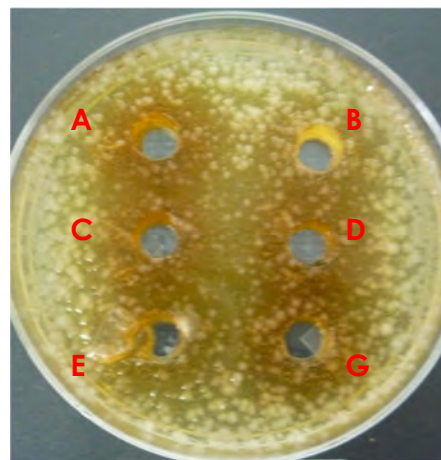
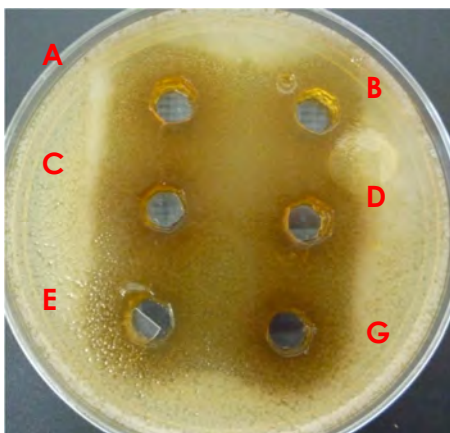


Figura 21. Técnica de difusión en agar, donde se muestra el efecto de los extractos semipurificados (MRS) sobre *S. typhimurium* (izquierda) y *B. cereus* (derecha)

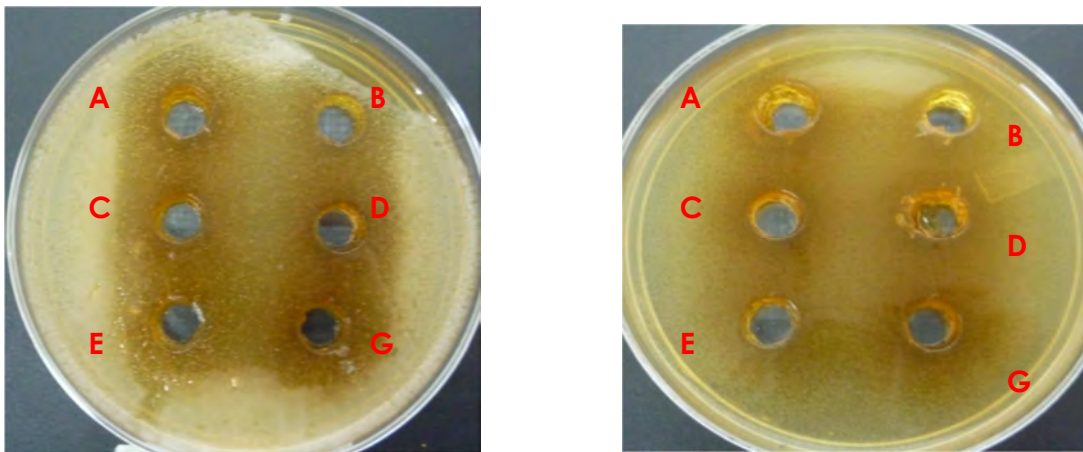


Figura 23. Técnica de difusión en agar, donde se muestra el efecto de los extractos semipurificados (MRS) sobre *S. pyogenes* (izquierda) y *L. monocytogenes* (derecha).

Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-Tris-Tricina y Zimogramas

Dado que en las pruebas presuntivas 3 cepas presentaron actividad inhibitoria sobre *E.coli* al estar cultivadas tanto en medio de cultivo MRS y CGB, se trató de dilucidar si en ambos medios se producían los mismos compuestos antibacterianos.

La electroforesis de proteínas en gels de poliacrilamida es una herramienta analítica indispensable ya que puede usarse para separar y comparar una mezcla compleja de proteínas, evaluar la pureza de una proteína durante un proceso de purificación y provee algunos valores aproximados de las características fisicoquímicas de las proteínas como la composición de subunidades, punto isoeléctrico, tamaño y carga. En la electroforesis la migración de las partículas o moléculas cargadas ocurre cuando se establece un campo eléctrico. La velocidad de migración depende de la fuerza del campo eléctrico aplicado y la carga neta de las moléculas a separar. La migración diferencial de las proteínas dependerá no sólo de su tamaño sino también de su carga, pero cuando se trata de un gel en el que se ha incluido un agente desnaturizante como el dodecil-sulfato de sodio (SDS), se pierde la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas y se uniforman las cargas de las proteínas, llevando a que la migración sólo dependa de su peso molecular (Sánchez, 2008). Bajo este principio se identificaron los pesos moleculares de las proteínas en cada uno de los sobrenadantes.



Dentro de la técnica de purificación previa a la electroforesis se incluye una precipitación con ácido tricloroacético (TCA) para extraer las proteínas en solución, las cuales sufren una coagulación que se produce probablemente por la interacción de los iones tricloroacetato con los grupos cargados positivamente de las proteínas. Es un método popular en la preparación de muestras para ensayos posteriores como electroforesis porque puede concentrar la muestra, es efectivo para remover sales, polisacáridos y muchos detergentes (como el SDS) de las proteínas (Montuenga, 2009).

Perfil electroforético

Este ensayo se realizó para las cepas que mostraron actividad inhibitoria en las pruebas presuntivas de difusión en agar contra *E. coli* y *S. aureus*; en los medios de cultivo MRS y CGB. Dichas cepas fueron: *B Enterococcus faecium*; *C Enterococcus faecium* y *E Enterococcus faecium*. Como se mencionó en la metodología los extractos se precipitaron con TCA dando lo siguientes resultados.

Antes de cargar los geles con las muestras se determinó la cantidad de proteína de cada extracto, con el fin de tener cantidades iguales en cada carril.

Tabla 13. Determinación de proteína después de precipitar con TCA

cepa	mg proteína /mL	μL/carril
B (MRS)	0.215	12.1
C (MRS)	0.215	12.1
E (MRS)	0.121	21.5
B (CGB)	0.176	14.7
C (CGB)	0.058	45
E (CGB)	0.073	35.7



Con los datos de la Tabla 13 se puede comprobar que en medio CGB hay menor producción de proteínas extracelulares. En este caso la cepa C en medio CGB tiene el valor más bajo; por lo tanto el volumen y la cantidad de proteína a depositar en cada carril se ajustó con base en ese valor.

Al analizar el gel de SDS al 10% de Tris- Tricina (Figura 25), se observa que en los 6 extractos hay varias bandas constitutivas que se encuentran presentes a pesar de ser extractos de diferentes cepas de enterococos crecidos en medio de cultivo diferente. La primera de ellas es una banda que tiene un peso de 21-22 kDa, seguida de una de 32-34 kDa.

Este resultado corrobora que en ambos medios se sintetizan las mismas proteínas extracelulares. Para la cepa B en medio MRS y CGB (carril 1 y 4) se presentan bandas con peso de 88 y 87 kDa características de esta cepa. En el caso de la cepa C vemos que en ambos medios, produce una proteína extracelular de casi 80 kDa y para la cepa E dos bandas de entre 67 y 70 kDa se presentan en ambos medios.

A pesar de que se colocó la misma cantidad de proteína en cada carril (2.6 µg proteína total) se ve que las intensidades de las bandas son diferentes, en su mayoría son más gruesas en los carriles que pertenecen al medio CGB.

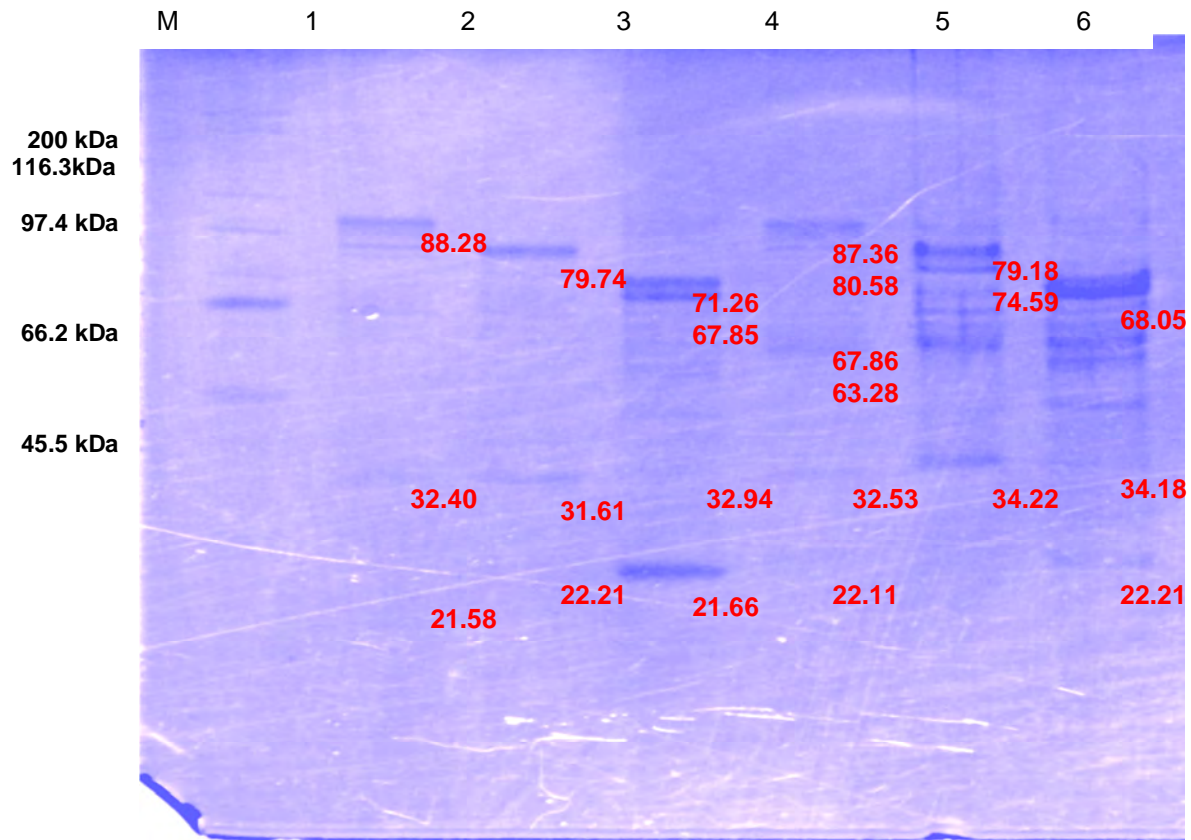


Figura 25. Gel de poliacrilamida SDS- Tris-tricina al 10%. Sobrenadantes precipitados con TCA. M: marcador de peso molecular alto (SDS-PAGE Standards, High range); 1: cepa B *Enterococcus faecium* (MRS); 2: cepa C *Enterococcus faecium* (MRS); 3: cepa E *Enterococcus faecium* (MRS); 4: cepa B *Enterococcus faecium* (CGB); 5: cepa C *Enterococcus faecium* (CGB); 6: cepa E *Enterococcus faecium* (CGB)

El siguiente zimograma contra *M. lysodeikticus* (Figura 26) nos permite observar la actividad inhibitoria de los extractos pertenecientes a la cepa E en los medios MRS y CGB, con bandas de actividad a los 90 kDa y 63 kDa aproximadamente. De tal modo se comprobó que la actividad antibacteriana está dada por la presencia de proteínas extracelulares y que en ambos medios de cultivo se producen las mismas proteínas.

Son pocos los compuestos antibacterianos producidos por enterococos que presentan un peso molecular tan alto. En la mayoría de los casos estos son bacteriocinas, que son péptidos de máximo 5 kDa de peso. Entre los pocos reportes se encuentra una PGH (con 3 dominios) producida por *E. faecalis* que muestra un dominio central llamado AtlA el cual fue activo contra *M. lysodeikticus*. En los zimogramas de los extractos de *E. faecalis* los autores observaron dos bandas de proteínas catalíticamente activas de 62 y 72 kDa. En ese trabajo se dice que el



hecho de que el péptidoglucano de *M. lysodeikticus* sea muy susceptible a AtIA se debe a una cantidad inusualmente grande de residuos no sustituidos de MurNac (-Mureina y N-acetilglucosamina) que conducen a una molécula de bajo entrecruzamiento por lo tanto esta pared es más rápidamente solubilizada por la enzima (Eckert *et, al.*, 2006).

Con esto se podría pensar que las bandas que se observan para los extractos de la cepa E es una PGH (péptidoglucano hidrolasa) ya que los pesos moleculares son muy parecidos. Sin embargo se tendrían que hacer varios análisis que permitieran asegurarlo. Dentro del grupo de trabajo se han logrado secuenciar proteínas extracelulares pertenecientes a lactobacilos aislados del queso Cotija. En ese mismo estudio se vio que una cepa de lactobacilo producía una PGH, la cual estaba glicosilada y por lo tanto presentaba un peso muy grande de aproximadamente 100 kDa (Serrano, 2010).

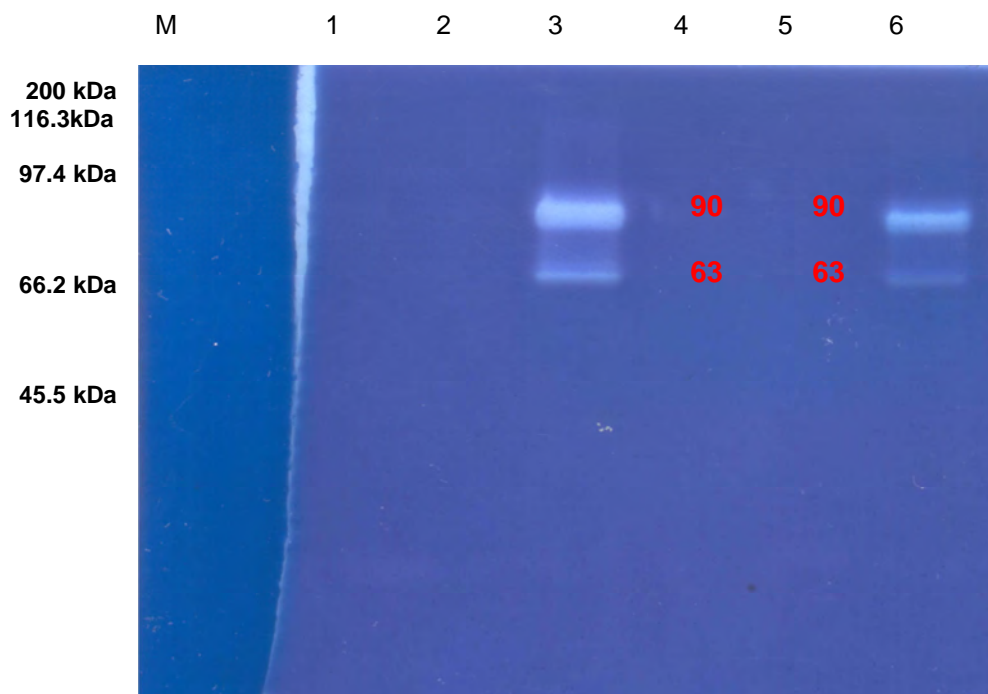


Figura 26. Gel de actividad- Tris-tricina contra el microorganismos indicador *Micrococcus lysodeikticus*. M: marcador de peso molecular alto; 1: cepa B *Enterococcus faecium* (MRS); 2: cepa C *Enterococcus faecium* (MRS); 3: cepa E *Enterococcus faecium* (MRS); 4: cepa B *Enterococcus faecium* (CGB); 5: cepa C *Enterococcus faecium* (CGB); 6: cepa E *Enterococcus faecium* (CGB)



8. Conclusiones

- Las cepas *Enterococcus faecalis* (A), *Enterococcus faecium* (B), *Enterococcus faecium* (C), *Enterococcus faecalis* (D), *Enterococcus faecium* (E) y *Enterococcus faecalis* (G) fueron capaces de crecer en los medios MRS, TSB, APT y CGB.
- Las cepas *Enterococcus faecalis*(A), *Enterococcus faecium* (B), *Enterococcus faecium* (C), *Enterococcus faecalis* (D), *Enterococcus faecium* (E) y *Enterococcus faecalis* (G) pueden sintetizar compuestos antibacterianos en medio MRS y las cepas *Enterococcus faecium* (B), *Enterococcus faecium* (C) y *Enterococcus faecium* (E) también logran hacerlo en medio CGB.
- Se presentó actividad antibacteriana de los extractos crudos contra microorganismos importantes en inocuidad alimentaria como: *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica* y *M. lysodeikticus*.
- Los extractos crudos obtenidos de las cepas B, C y E de los medios MRS y CGB presentan un patrón de bandas muy similar lo que podría indicar que en ambos medios se producen las mismas proteínas extracelulares.
- Los extractos crudos de la cepa E en medio MRS y CGB son los únicos que muestran bandas de actividad sobre *M. lysodeikticus*, con proteínas a los 90 kDa y 63 kDa aproximadamente.



9. Perspectivas

- Tratar de dilucidar la posible patogenicidad de las seis cepas de enterococos.
- Caracterizar bioquímicamente las proteínas producidas por las cepas de enterococos que mostraron tener actividad antibacteriana.
- Dilucidar el mecanismo de acción de dichas proteínas contra los microorganismos indicadores de inocuidad alimentaria utilizados en este trabajo.

10. Bibliografía

- **Alaís C. y Lacasa A., 1985.** Ciencia de la leche: principios de técnica lechera. Editorial Reverte. Cuarta edición ilustrada. p.p. 330-356.
- **Alvárez Cisneros, en prensa.** Biochemical characterization of a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Enterococcus faecium* MXVK29 strain active against *Listeria spp.* Journal of the science of Food and Agriculture.
- **Audisio, M., Oliver, G., Apella, M. 2001.** Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin synthesis of *Enterococcus faecium*. Internatinal Journal of Food Microbiology **63**: 235–241.
- **Bazán-Gómez, AB. 2007.** Detección de la albúmina 2S en aislados de ajonjolí. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- **Bradford, MM. 1976.** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry. 72:248-254
- **Bravo A. 2008.** “Estudio de las Poblaciones Microbianas de interés biotecnológico aisladas de queso Cotija”. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- **Cervantes Escoto, F. Villegas De Gante A., Cesin Vargas A., Espinoza Ortega A. 2008.** “Los quesos mexicanos genuinos -Patrimonio cultural que debe rescatarse-”. Primera edición, Mundi-Prensa. México.



- **Chan L., Bai J., Cai Z. and Ouyang F., 2002.** Optimization of a culture medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *Journal of biotechnology*. **83** 27-34.
- **Cotter Paul, 2005.** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews, Microbiology*. **3** 777-788.
- **Cuamatzi T. Óscar, 2004.** Bioquímica de los procesos metabólicos, editorial Reverte, p.p. 133.
- **Delgado-Arciniega E. 2010.** Producción de compuestos antibacterianos por bacterias ácido lácticas aisladas de queso Cotija. Tesis de Licenciatura (en revisión). Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- **De Kwaadsteniet M. Torodow S. y Dicks L., 2005.** Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram –positive and Gram negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **105**:433-444.
- **De Vuys L., 1995.** Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis subsp. Lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. *Journal of Applied Bacteriology*. **78**, 28-73.
- **De Vuys, L. & Vandamme E. J. 1994.** Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Microbiology, genetics and applications*. London, Editorial Blackie Academic and professional, Primera edición. pp. 107-125
- **Eckert C., Lecerf M., Dubost L., Arthur M. y Mesnage S. , 2006.** Functional Analysis of AtlA, the Major *N*-Acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, p. 8513–8519
- **Franz, CM, Stiles, ME; Schleifer, KH; Holzappel WH, 2003.** Los enterococos en los alimentos - un enigma para la seguridad alimentaria. *International Journal of Food Microbiology*. **88**, 105-122.
- **García-Cano I., 2009.** Péptidoglucano hidrolasa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042: Purificación y caracterización bioquímica. Cartel CI-03. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Acapulco, México.
- **Garrido Amando, 2001.** Bioquímica metabólica, editorial Tebar, p.p. 11-17.



- **Gottschalk, 1986.** Bacterial metabolism. Segunda edición. Editorial Springer.
- **Giraffa G., 2003.** Funcionalidad de enterococos en productos lácteos. *International journal of Food Microbiology* **88**: 215-222.
- **Hernández –Alcántara A., 2010.** Caracterización de la actividad bactericida de péptidos producidos por bacterias ácido lácticas aisladas de un queso tradicional mexicano. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- **Izquierdo E., Bednarczyk A., Schaeffer C., Cai Y., Marchioni E., Van Dorsselaer A. y Ennahar1, 2008.** Production of Enterocins L50A, L50B, and IT, a New Enterocin, by *Enterococcus faecium* IT62, a Strain Isolate from Italian Ryegrass in Japan. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **52,6**: 1917-1923.
- **López-Munguía A., 2002.** Biotecnología alimentaria. Quinta reimpresión, Editorial Limusa, México, p.p. 153.
- **Line J. E. , Svetoch E. A. , Eruslanov B. V. , Perelygin V. V. , Mitsevich E. V. , Mitsevich I. P., 2008.** Isolation and Purification of Enterocin E-760 with Broad Antimicrobial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **52(3)** p. 1094–1100. 52(3)
- **Lortal S. et al., 2004.** Role, mechanism and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal*. **15**: 857-871.
- **Maisnier-Patin, S., Forni, E., Richard, J., 1996.** Purification partial characterization and mode of action of enterocin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. *Food Microbiology*. **30**: 255-270.
- **Masson Salvat, 1995.** Microbiología y parasitología médica. Segunda edición, Editorial España, p.p. 63.
- **Montuenga L., 2009.** Técnicas en histología y biología celular. Elsevier, España, p.p. 42.
- **Moreno M. R, Leisner J.J, Tee L.K., Ley C., Radu S., Rusul G., Vancanneyt M. y L. De Vuyst, 2002.** Microbial analysis of Malaysian



tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. Journal of Applied Microbiology. **92**, 147-157.

- **Muñoz A., Ananou S., Gálvez A., Martínez-Bueno M., Rodríguez A., Mosqueda M., Valdivia E. ,2007.** Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat. International Dairy Journal **17** : 760–769
- **Neysens P., Messens W. and De Vuyst, 2003.** Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. International Journal of Food Microbiology. **88**: 29-39.
- **Palavecino E. 1997.** Interpretación de los estudios de susceptibilidad antimicrobiana. Boletín de la escuela de medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile.vol. **26** No. 3
- **Pantev A., 2002.** Effects of Nitrogen Sources on Bacteriocin Production by *Enterococcus faecium* A 2000. Folia Microbiology. **47 (6)**, 659-562.
- **Parente E., 1997.**Growth and bacteriocin production by *Enterococcus faecium* DPC1146 in batch and continuous culture. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. **18**, 62–67
- **Ramírez Gama R., Luna Millán B., Camacho Cruz A., Tsuzuki Reyes G., Viena García L., Velázquez Madrazo O., Úrzua Hernández M., Mejía Chávez A. 2006.** Manual de prácticas de microbiología general. Quinta edición. Facultad de Química UNAM. Pp. 149-150.
- **R. Pérez-Pulido, H. Abriouel, N. Ben Omar, R. Lucas, M. Martínez-Cañamero y A. Gálvez, 2006.** Safety and potential risks of enterococci isolated from traditional fermented capers. Food and Chemical Toxicology. **44** 2070–2077
- **Salminen, S. von Wright, A. Ouwehand, A., 2004.** Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 3ª edición. Marcel Dekker Inc. Estados Unidos.
- **Stanier R., 1996.** Microbiología, segunda edición, editorial Reverte, p.p. 195-209



- **Sabia C. et al., 2001.** Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 isolated from Italian sausages. International Journal of Food Microbiology. **75**, 163-170.
- **Schägger H. y Von Jagow G., 1987.** Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Poliacrylamide Gel Electrophoresis for the separation of proteins in range from 1 to 100 kDa. Analytical Biochemistry **166**, 369-379.
- **Serrano C., 2010.** Caracterización de la actividad antibacteriana producida por cepas de BAL aisladas de un alimento artesanal mexicano. Tesis de Licenciatura (en revisión). Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- **Settanni L., Valmorri S., Suzzi, G., Corsetti, A. 2008.** The role of environmental factor and medium composition on bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) production by *Enterococcus mundtii* strains. Food Microbiology. **25**: 722- 728.
- **Signorini M. 2007.** Microbiología de carnes envasadas al vacío y la biopreservación como medio para prolongar la vida de anaquel. Difusión periódica, vía red de cómputo:2007-0373.Nacameh, vol. 1, No 1, pp.26-40
- **Simonetta A. C., Morangues de Velasco and Frisón L. N. 1997.** Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*. Letter in Applied Microbiology. **24**: 193-143.
- **The OXOID Manual, 1990.** 6th Ed. Alphaprint, Alton, Hants. United Kingdom.
- **Todorov S. y Dicks L., 2005¹.** Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from Boza. Food Technology Biotechnology. **43 (2)** 165–173.
- **Todorov S. y Dicks L., 2005².** *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. Enzyme and Microbial Technology **36**: 318–326.
- **Todorov S. y Dicks L., 2006.** Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolate from spoiled olive brine. Microbiological Research **161**:102—108



- **Todorov S. y Dicks L., 2009.** Effect of modified MRS medium on production and purification of antimicrobial peptide ST4SA produced by *Enterococcus mundtii*. Food microbiology Anaerobe 15 (2009) 65–73
- **Wenhua L., Cong Wei and Cai Z., 2005.** Effect of sucrose on nisin production in batch and fed-batch culture by *Lactococcus lactis*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. **80**: 511-514.
- **Zúñiga, B. 2009.** “Descripción e Identificación de la Comunidad Bacteriana Presente en el Queso Cotija por Métodos Moleculares”. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas. UNAM.

Fuentes de internet

1. **Conocer para valorar el Patrimonio Cultural Sierra de Jalmich. Marca Colectiva Queso Cotija.** Sociedad de Producción Rural Productores de Queso Cotija. PRO SIERRA DE JALMICH, A. C. www.quesocotija.org.mx
2. **Grupo de investigación multidisciplinar en calidad y seguridad de alimentos fermentados autóctonos.** Grupo de Investigación Calidad y Seguridad de Alimentos Fermentados Autóctonos. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Facultad de Farmacia (Consultado en Febrero 2010) en : http://www.enpresa.ehu.es/p223content/es/contenidos/informacion/vri_encuentos/es_vri_encu/adjuntos/1_Elortondo_L.pdf
3. **Food Info. Seguridad alimentaria, Bacteria patógenas (*Yersinia enterocolitica*).** Iniciativa de la Universidad Wageningen University, The Netherlands. Última actualización 31/03/2010.(Consultado en Mayo 2010). <http://www.food-info.net/es/bact/yeent.htm>
4. Soberón Gloria. ***Pseudomonas aeruginosa*.** Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (Consultado en Mayo 2010). http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_06/Capitulo06.pdf