



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EVALUACIÓN DE LA INOCUIDAD DE *ENTEROCOCCUS* SPP. AISLADOS DEL
QUESO COTIJA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
MYRNA ELENA OLVERA GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH
FACULTAD DE QUÍMICA

COMITÉ TUTOR
DRA. CARMEN WACHER RODARTE
FACULTAD DE QUÍMICA
DR. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MÉXICO, D. F. Agosto, 2013



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.



Índice

1. Introducción	5
1.1 Generalidades de los <i>Enterococcus</i> spp.....	7
1.2 Importancia de <i>Enterococos</i> en alimentos y salud	8
1.3 Factores de virulencia	9
1.3.1 Citolisinas	11
1.3.2 Sustancias de agregación.....	12
1.3.3 Proteínas de superficie de <i>Enterococcus</i> spp.	14
1.3.4 Modelo de sinergismo.....	14
1.4 Producción de sustancias con efecto antibacterial	16
1.4.1 Enterocinas.....	16
1.4.2 Peptidoglucano hidrolasas.....	18
2. Antecedentes	20
2.1 Queso Cotija.....	20
2.2 Microbiota del queso Cotija.....	21
3. Justificación	23
4. Hipótesis	23
5. Objetivos	23
5.1 Objetivo general.....	23
5.2 Objetivos particulares.....	24
6. Metodología	25
6.1 Descripción de las muestras.....	25
6.2 Preparación de la muestra y enriquecimiento para <i>Enterococcus</i> spp.....	26
6.3 Caracterización fenotípica	28
6.4 Extracción de ADN.....	29
6.4 Detección de genes de virulencia por PCR-Multiplex.....	29
6.4.1 Pruebas presuntivas para expresión de los genes de virulencia	30
6.4.1 a) Actividad hemolítica.....	30
6.4.1 b) Ensayo de adherencia.....	31
6.4.1 c) Formación de biopelículas	32
6.5 Identificación del gen <i>atlA</i> de peptidoglucano hidrolasa AtlA	33
6.5.1 Pruebas para identificar la síntesis de la peptidoglucano hidrolasa AtlA.....	35
6.5.1 a) Detección de la peptidoglucano hidrolasa AtlA (SDS-PAGE).....	35
6.5.1 b) Detección de actividad lítica de la Peptidoglucano hidrolasa a través de zimografía	36
6.5.1 c) Ensayo de difusión en agar contra <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	36
6.6. Detección de los genes de enterocinas	37
6.6.1 Pruebas para determinar la actividad de las enterocinas.....	39
6.6.1 a) Identificación de la producción de la(s) enterocina(s) a través de la técnica SDS-	



PAGE.....	39
6.6.1 b) Identificación de actividad antibacteriana de la(s) enterocina(s).....	40
6.6.1 c) Ensayo de difusión en agar contra <i>L. innocua</i>	40
7. Resultados y discusión.....	41
7.1 Caracterización bioquímica parcial de las poblaciones de enterococos y cepas aisladas.....	41
7.2 Detección de los genes que codifican para factores de virulencia.....	43
7.2.1 Pruebas presuntivas para expresión de genes de virulencia	47
7.2.1 a) Actividad hemolítica.....	47
7.2.1 b) Formación de biopelículas	49
7.2.1 c) Ensayo de adherencia a dos líneas celulares	50
7.2.1 c) Ensayo de adherencia en línea celular Caco-2	51
7.2.1 d) Ensayo de adherencia en línea celular HT-29.....	53
7.3 Detección del gen que codifica para peptidoglucano hidrolasa AtlA.....	56
7.3.1 Pruebas para evaluar la actividad de PGH	57
7.3.1 a) Perfil electroforético de proteínas extracelulares y zimigrafía.....	57
7.3.1 b) Prueba de difusión en agar para evaluar actividad antibacteriana.....	62
7.4 Detección del gen que codifica para las enterocinas.....	63
7.4.1 Pruebas para evaluar la expresión de la enterocina A.....	66
7.4.1 a) Difusión en agar	66
7.4.1 b) Perfil electroforético para la detección de la enterocina A y zimografía	67
8. Discusión final	70
9. Conclusiones	72
10. Perspectivas.....	73
10. Bibliografía.....	74
10. Anexo	81
10.1 Técnica de Zimografía.....	81



Resumen

Enterococcus spp. son bacterias ácido lácticas que forman parte de la microbiota del intestino de diferentes especies de animales. Tienen un comportamiento dual, ya que se han relacionado con infecciones hospitalarias y se han empleado como probióticos. Cepas aisladas del queso Cotija Región de Origen han mostrado actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Dicha actividad se ha relacionado con la producción de una peptidoglucano hidrolasa (PGH). El objetivo del presente trabajo consistió en analizar propiedades relacionadas con la actividad antibacteriana de *Enterococcus* spp presentes en el queso Cotija, así como características asociadas con la virulencia.

Se estudiaron varias poblaciones de enterococos aisladas de 12 quesos Cotija “Región de Origen” y siete cepas de *Enterococcus* spp., aisladas y caracterizadas previamente. Por medio de PCR-multiplex se analizó la presencia de genes relacionados con la expresión de: sustancia de agregación (*asa*), proteína de superficie (*esp*) y citolisina A (*cytA*). La posible expresión de los genes se evaluó analizando la actividad hemolítica en agar sangre de carnero, adherencia a las líneas celulares Caco-2, HT-29 y la capacidad de formación de biopelícula en microplacas de poliestireno. Además se analizó la resistencia a vancomicina. La presencia del gen que codifica para una PGH, previamente identificada en el grupo de trabajo y de los genes que codifican para las enterocinas A y AS-48 se detectaron por PCR. La probable expresión de los genes referidos se analizó por medio de SDS-PAGE, zimografía contra *Micrococcus lysodeikticus* y por difusión en agar contra *E. coli*, *S. aureus* y *Listeria innocua*.

Los resultados muestran que tres de las cepas aisladas y siete poblaciones fueron *asa*+, la capacidad de adherencia a las líneas de células Caco-2 y HT-29 fue positiva en las tres cepas y en las siete poblaciones. Dos de las poblaciones y una cepa amplificaron para el gen *esp*. Sin embargo, la formación de biopelículas fue positiva en once poblaciones y todas las cepas aisladas, aunque sólo cuatro poblaciones y dos cepas aisladas forman una biopelícula bien estructurada ($DO_{620} \geq 0.22$). El gen de citolisina no se detectó en ninguna de las muestras analizadas y esta observación correlacionó con la ausencia de hemólisis de los eritrocitos de carnero, así mismo no se observó resistencia a vancomicina. El gen *atlA* que codifica para la PGH (*AtIA*) se identificó en dos poblaciones y en una de las cepas aisladas. Todas las cepas y poblaciones presentaron un perfil electroforético de proteínas extracelulares similar y una banda de actividad bacteriolítica de entre 75-85 kDa. Los sobrenadantes (neutralizados, filtrados y liofilizados) de todas las cepas y poblaciones muestran actividad bacteriostática contra *S. aureus* y *E. coli*. El gen *entA* correspondiente a la enterocina A se identificó en cuatro cepas y seis poblaciones. El gen *AS-48* no se detectó en ninguna de las muestras a analizar. Todas las muestras *entA*+ presentaron una banda de actividad de 5 kDa contra *M. lysodeikticus* y dos bandas de actividad de 5 y 3 kDa contra *L. innocua*.



Bacterias del género enterococos son comunes en productos fermentados, los resultados obtenidos en nuestro estudio mostraron que las poblaciones analizadas producen enzimas con actividad antibacteriana y presentan genes que, aunque, codifican para factores de virulencia, éstos no se relacionan directamente con patogénesis. Por lo que se puede concluir los *Enterococcus* spp analizados tienen características que contribuyen a la seguridad de alimentos y de actividad probiótica (colonización).



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, al ser Bacterias Ácido Lácticas (BAL) participan en la fermentación espontánea de diversos alimentos como el queso, salchichas y aceitunas (Izquierdo *et al.*, 2008; Franz *et al.*, 2003).

Por otra parte la contaminación bacteriana y el aumento de las enfermedades infecciosas de origen alimentario provocaron, desde los años 80s, 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 posible. Particularmente, 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 es 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). Sin embargo, en México aún no existe una norma oficial que regule la seguridad de las cepas de enterococos que pudieran ser empleadas como probióticos.

1.1 Generalidades de los *Enterococcus* spp.

Son cocos Gram-positivos, anaerobios facultativos, quimiorganototrofos, no esporulados, generalmente no móviles, no formadores de pigmentos, catalasa, reductasa y oxidasa negativos; 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-positivos, catalasa negativos 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, en un rango de pH entre 4 y 9.6, capacidad de hidrolizar escualina y crecer en presencia de azida de sodio (Giraffa, 2003; Franz *et al.*, 2003; Díaz-Peréz *et al.*, 2012). Su baja resistencia a aminoglucosidos



es una propiedad inherente de los enterococos y es una característica comúnmente utilizada para su identificación. Para *E. faecalis*, la concentración mínima inhibitoria de estreptomina o kanamicina es de alrededor de 250 µg/mL, mientras que para gentamicina es de 8 a 64 µg/mL (Murray, 1990). La pared celular de los enterococos contiene peptidoglucanos de Lisina-D- Asparagina (excepción de *E. faecalis*) y de la membrana se derivan grandes cadenas de ácidos teicoicos, que son polímeros de glicerol o ribitol fosfato.

Tienen un metabolismo biosintético limitado por lo que requieren medios de cultivo ricos en aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas. En la clasificación de BAL por su capacidad de fermentación de azúcares, los enterococos son clasificados dentro del grupo III junto con pediococos, estreptococos, tetragenococos, algunos lactobacilos y vagicocos. 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 fosfoacetolasas, dando como resultado la producción de ácido acético, CO₂, etc. por una fermentación heteroláctica. Entonces, los enterococos son homofermentativos con respecto a las hexosas y heterofermentativos para las pentosas y algunos otros sustratos y, por tanto son llamados heterofermentativos facultativos (Salminen *et al.*, 2004).

1.2 Importancia de Enterococos en alimentos y salud

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. El género *Enterococcus* incluye más de 20 especies, con *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus durans* como las especies más frecuentemente 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 papel importante 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 (www.enpresa.ehu.es). 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).

Por otro lado, en las últimas décadas, los enterococos se han convertido en agentes principales de las infecciones adquiridas en los hospitales que son particularmente difíciles de tratar debido a la resistencia intrínseca del organismo y debido a la resistencia abierta a la mayoría, y a veces a todos los antibióticos disponibles. Así bien, se está examinando la biología de los enterococos con el objetivo de tener nuevas estrategias terapéuticas (Shankar *et al.*, 2004).

Los enterococos pueden adherirse a las válvulas cardíacas y a las células epiteliales renales, propiedades que sin duda contribuyen a su habilidad para causar endocarditis e infecciones del tracto urinario, infecciones pélvicas, abdominales, entre otras. Por formar parte de la microbiota intestinal, los enterococos son capaces de producir infecciones en pacientes ambulatorios u hospitalizados, y se pensaba que la mayoría de las infecciones causadas por estos agentes eran endógenas; sin embargo, la mayoría de éstas ocurren en pacientes bajo tratamiento con diálisis peritoneal o hemodiálisis, en los cuales el agente es exógeno, ya que las cepas se encuentran en el medio ambiente y en manos de personal. Los enterococos poseen una variedad de mecanismos de resistencia adquiridos, la mayoría de los cuales están mediados por genes codificados en plásmidos o transposones. Es muy importante el alto nivel de resistencia adquirida a los aminoglucósidos que da como resultado resistencia a la combinación sinérgica de aminoglucósidos con agentes betalactámicos, asociación terapéutica muy usada, y por la cual debe estudiarse la sensibilidad frente a una infección grave por enterococos (Brogden *et al.*, 2000).

Las diferencias entre un enterococo patógeno y una cepa aparentemente segura para su uso en alimentos no son claras. Ya está establecido que la taxonomía molecular de los enterococos no lleva a una distinción entre estos dos tipos de cepas. Nuestros conocimientos de virulencia en enterococos están incompletos, sin embargo, se sabe que la incidencia de factores de virulencia y resistencia a antibióticos está muy relacionado con el nicho ecológico al que pertenecen.

1.3 Factores de virulencia

Las propiedades de una bacteria patógena requeridas para colonizar al huésped incluyen el obtener los requerimientos nutricionales; evadir los mecanismos de defensa del



hospedero; multiplicarse y una vez establecido, producir daño al hospedero. Esto podría utilizarse como una definición de modo de vida patogénico. Los factores de virulencia pueden tener un número indefinido de funciones, incluyendo la capacidad para facilitar la adherencia microbioana, la invasión o ambas, así como la promoción del crecimiento de un microorganismo en el hospedero, evadiendo su detección, inhibiendo la fagocitosis y regulando la capacidad para una sobrevivencia intracelular. Los factores de virulencia podrían o no participar de manera directa en el crecimiento bacteriano en el hospedero (Rocha- Gracia *et al.*, 2004)

Sorprendentemente, poco se sabe acerca de los factores que contribuyen a la capacidad de los enterococos para causar enfermedades en los seres humanos. Los principales factores determinantes de virulencia conocidos hasta el momento que juegan algún papel en la patogénesis son algunos productos secretados y factores de adhesión. Casi una docena de factores de virulencia putativos han sido reportados por el análisis de varios modelos animales (Tabla 1). Ellos están involucrados tanto en interacciones entre la células hospederas y proteínas extracelulares (AS, Esp, EfaA), en resistencia a macrófagos (AS, HypR), en daño a tejido y células (Cyl, GelE, SprE) así como en evasión del sistema inmune (cápsula) (Ogier y Serror, 2008).

Además, los estudios con *E. faecium* han demostrado que la resistencia a los antibióticos no desempeña un papel importante en la patogénesis de enfermedad por enterococos por lo tanto no se considera factor de virulencia (Kayser, 2003).

Tabla 1. Genes relacionados a virulencia de *E. faecalis* y funciones putativas (Ogier y Serror,2008)

Gen	Factor codificado	Función putativa
Adhesinas <i>asa</i> <i>efaA</i>	Sustancia de agregación Antígeno A de <i>E. faecalis</i>	Adhesión y colonización Resistencia a las defensas del huésped
<i>esp</i> <i>ace</i>	Proteína de superficie de enterococos Adhesina a colágeno de <i>E. faecalis</i>	Colonización Adhesión y colonización Adhesión a ECM
Proteasa <i>gelE</i> <i>srpE</i>	Gelatinasa Serina proteasa	Daño en tejido Daño en tejido
Factores de secreción <i>cylA-M</i> <i>gls24</i>	Citolisina/hemolisina Proteína inducida por falta de glucosa	Daño en tejido Persistencia en el huésped
Expolisacáridos <i>cpsA-K</i> <i>epa</i>	Polisacárido capsular Polisacárido capsular	Resistencia a defensas del huésped No definido
Regulador transcripcional <i>cyl R1-R2</i>	Sistema de dos componentes peptídicos Sistema regulatorio parecido a <i>agr</i>	Regulación de <i>cylA-M</i>
<i>fsrA-C</i> <i>etaRS</i>	Sistema de dos componentes parecido a OmpR	Regulación de <i>gelE</i> y <i>sprE</i> No definido
<i>hypR</i> <i>perR</i>	Regulador de peróxido de hidrógeno Regulador de peróxido	Resistencia a las defensas del huésped No definido



1.3.1 Citolisinas

El factor de virulencia más importante en *E. faecalis* parecer ser la citolisina (Semedo *et al.* 2003; Kayser, 2003). La capacidad citolítica es observada *in vitro* como una zona hemolítica en agar sangre. Dicha actividad fue primeramente reconocida por conferir actividad hemolítica al grupo D de los aislados de *Streptococcus* spp. Después se observó que todos los aislados de *E. faecalis* que tenían esta actividad también mostraban actividad antibacteriana contra un amplio rango de bacterias Gram-positivas (Shankar *et al.*, 2004). Este fenotipo, en muchas cepas de *E. faecalis* está dado por el operón de citolisinas, principalmente localizado en plásmidos altamente transmisibles, como el plásmido conjugativo pAD1 en respuesta a feromonas, y sólo ocasionalmente dentro del cromosoma. Las citolisinas causan ruptura de una variedad de membranas blanco, incluyendo las de células bacterianas (bacteriocinas), eritrocitos, y otras células eucarióticas. La determinación de la secuencia nucleotídica del operón de las citolisinas ha revelado que codifica para ocho marcadores genéticos, *cyIR1*, *cyIR2*, *cyIL_L*, *cyIL_S*, *cyIM*, *cyIB*, *cyIA* y *cyII* (Kayser, 2003).

Los genes *cyIL_L*, *cyIL_S* codifican para dos precursores proteínicos, péptidos de 60 y 63 aminoácidos, respectivamente, que juntos constituyen el componente lítico (Moreno *et al.*, 2006). La modificación de la proteína a través de *CyIM* es requerida para la transformación de las dos moléculas a su forma secretable. *CyIM* es un polipéptido de 993 aminoácidos que introduce una modificación característica de bacteriocinas de la clase de lantibióticos. Los lantibióticos están caracterizados por la presencia del aminoácido modificado β-metil-lantionina, así como residuos de serina deshidratada (dehidroalanina) y una treonina (dehidrobutirina). La lantionina se forma por la deshidratación de los residuos de serina y treonina, seguido por la generación de un puente tioeter entre el doble enlace resultante y el grupo sulfhidrilo de la cisteína. Después de la modificación, ambas moléculas interaccionan con el producto del siguiente gen en dirección 3', *cyIB*. *CyIB* funciona tanto como casete transportador de unión a ATP y como señal de peptidasa, actuando como transportador de ambas subunidades citolíticas a través de la membrana celular y promoviendo la remoción de la secuencia líder de cada subunidad (Fig. 1). El dominio N-terminal de la cisteín-proteasa remueve la secuencia líder de 24 a 36 aminoácidos desde *cyIL_L*, *cyIL_S*, respectivamente, generando *cyIL'_L*, *cyIL'_S*. Una vez secretadas, las citolisinas L y S aún son inactivas hasta que seis aminoácidos son removidos de cada amino terminal por una enzima codificada por el gen *cyIA*, una serina proteasa parecida a subtilisina. Dicho corte genera *cyIL''_L*, *cyIL''_S*. El último gen en la misma dirección de lectura, *cyII*, como se muestra en la Figura 1, está involucrado en promover la producción de una proteína de autoprotección. La expresión de citolisinas está regulada de una manera inusual en donde requiere a los genes *cyIR1*, *cyIR2* y la subunidad pequeña de la toxina *CyIL''_S*, para promover la autoinducción de



una manera dependiente del quórum. Los bajos niveles de síntesis de citolisina, en particular CyL''_s , promueve la acumulación de señales del quórum que activan la expresión de los mismos.

En varios modelos de infección de enterococos, se ha encontrado que las citolisinas contribuyen a la toxicidad y la letalidad. Por ejemplo, se ha observado que éstas favorecen la aparición de enterococos en el torrente sanguíneo de ratones infectados experimentalmente (Kayser, 2003; Semedo *et al.*, 2003).

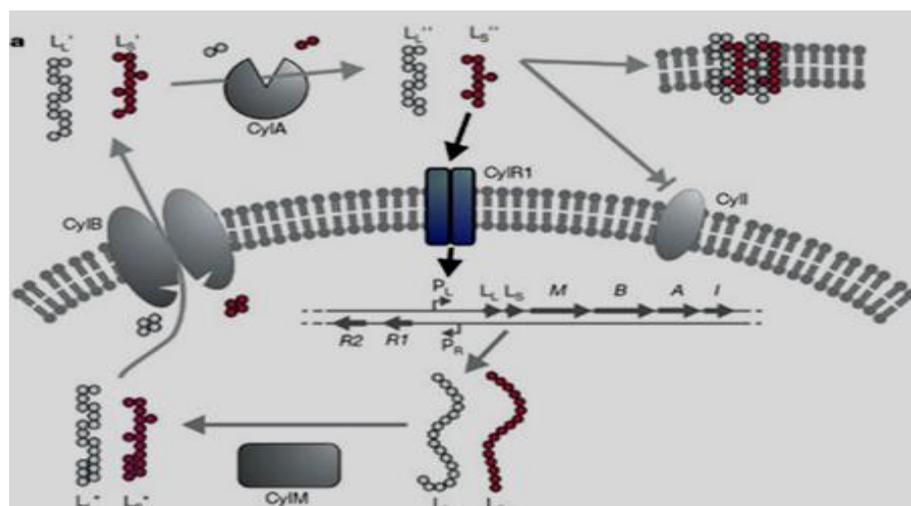


Figura 1. Esquema de síntesis, regulación de expresión y modificaciones postraduccionales de las citolisinas. Modificado del modelo de maduración y regulación en el operón de citolisinas (Wolfgang, 2002)

1.3.2 Sustancias de agregación

La adhesión bacteriana a los tejidos del huésped es un primer paso en el proceso infeccioso. Para comensales gastrointestinales como los enterococos, las adhesinas que promueven su unión a receptores de la mucosa intestinal se espera que desempeñen un papel fundamental para la colonización. Sin medios específicos de unión es probable que los enterococos sean eliminados a través de la motilidad intestinal normal. Las moléculas con las que los enterococos pueden adherirse a receptores específicos de las células del huésped, aún no están bien definidas. Se ha sugerido que la sustancia de agregación, así como proteínas de la superficie extracelular juega un papel en dicha adhesión (Kayser, 2003; Franz *et al.*, 2001; Gally *et al.*, 1990).



Si bien se desconoce buena parte de los mecanismos de virulencia de estos microorganismos, la mayoría de las investigaciones sobre este particular se han enfocado en una sola molécula, conocida como sustancia de agregación (SA), cuyo papel parece ser decisivo en la patogenia.

La SA es una proteína superficial codificada comúnmente en plásmidos auto-transferibles que median la unión de la bacteria donadora con las células libres de plásmidos, permitiendo una conjugación eficiente en un ambiente líquido, como respuesta a feromona. Principalmente es codificada por el plásmido pAD1, específicamente por el gen *asa*, cuya presencia incrementa considerablemente la adherencia e internalización enterocócica en los macrófagos, previa interacción con las integrinas CD11b, CD18 y CR3, presentes también en otras células de defensa del humano (Garza-Velasco, 2011).

En concreto, la sustancia de agregación (SA) desempeña las siguientes funciones:

- Potenciación de la conjugación de plásmidos.
- Adhesión a los tejidos del hospedero.
- Promoción de la internalización y la supervivencia en los fagocitos.

La SA posee dos motivos Arg-Cys-Asp (RGD), similares a los encontrados en fibronectina de eucariontes, que pueden permitir la unión a integrinas en las superficies de las células hospederas (Gilmore *et. al.*, 2002). Por lo tanto, se puede asumir que los receptores de la SA en las células humanas son las integrinas β 2, proteínas que se localizan en la superficie de numerosos leucocitos, e inclusive, de las células epiteliales y endoteliales; no obstante, esta adhesina enterococcica también reconoce a diversas matrices celulares humanas en las que predominan la colágena y/o la laminina.

Si bien la SA representa un factor fundamental en la adherencia enterocócica, es clara la participación de otras moléculas en el proceso: la adhesión de las cepas de *E. faecalis* a las células del tracto urinario también depende del disacárido D-glucosa-D-manosa, en tanto que la llevada a cabo sobre las células cardíacas reside en estructuras que presentan D-galactosa. A este último respecto, se ha logrado comprobar que los aislamientos clínicos provenientes de pacientes con endocarditis cuentan con ambos azúcares y que, en contraste, las cepas asociadas exclusivamente a endocarditis sólo expresan al segundo de ellos.

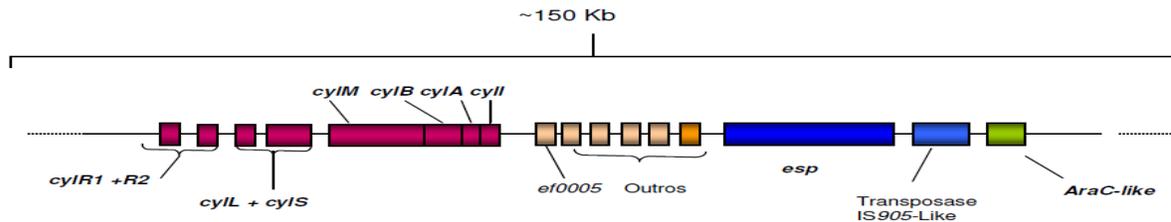


Figura 2. Representación esquemática de la isla de patogenicidad IIha de 150kb encontrada en *E. faecalis* (Shankar *et al.*, 2002)

1.3.3 Proteínas de superficie de *Enterococcus* spp.

Además de sustancias de agregación, los enterococos sintetizan una proteína de alto peso molecular nombrada Esp (proteína de superficie de enterococos) codificada por el gen cromosomal *esp*. Esta proteína de 1,873 aminoácidos posee características similares a las que presentan otras proteínas localizadas en la superficie de bacterias Gram-positivas, incluyendo una secuencia señal y un motivo de anclaje a pared celular, aunque este último es un tanto divergente de la secuencia consenso del motivo de anclaje de muchas proteínas de superficie de células Gram-positivas (Shankar *et al.*, 1999).

Se hipotetiza que el dominio C termina de la Esp contiene un motivo LPXTGX encontrado en muchas proteínas de superficie asociadas a pared celular en Gram-positivas, el dominio N terminal podría participar en la interacción con el hospedero y que la región central, la cual consiste de dos series repetidas en tandem, podría servir para retraer la proteína de la superficie y con ello exista una mayor dificultad de la acción del sistema inmune para reconocer al microorganismo lo cual se agrava especialmente cuando el paciente se encuentra en condiciones adversas, por ejemplo si presenta deficiencia del sistema inmunológico (Shankar *et al.* 1999). Adicionalmente, Toledo-Arana *et al.* en el 2001 vincularon la presencia de Esp en la formación del biopelículas ya que Esp exhibía características de receptores de proteínas de superficie designados componentes de la superficie microbiana reconociendo moléculas adhesivas que interaccionan con componentes del hospedero e inician la colonización.

En otras investigaciones se observó que la proteína de superficie de *E. faecalis* actuaba como un factor de virulencia, ya que aumentaba el número de bacterias adheridas al sistema de excreción biliar. Así bien la proteína Esp permitía la colonización de la vejiga en modelos experimentales de infección del tracto urinario.

Esp está altamente conservada y es muy común en las cepas de *E. faecium*, tanto sensibles y resistentes a la vancomicina (Shankar *et al.*, 1999).

1.3.4 Modelo de sinergismo



Algunos autores proponen un modelo en que se plantea la acción conjunta de las citolisinas/proteasas con sustancias de agregación y/o proteínas de superficie para poder potenciar el daño en una célula (Gilmore, 2002).

El operón de citolisina comúnmente se encuentra cerca del gen que codifica para la sustancia de agregación, tal como ocurre en la conjugación de plásmidos de respuesta a feromonas o muy cerca de otras adhesinas de superficie como el gen *esp*. Se ha reportado que la expresión conjunta de citolisinas y sustancias de agregación resulta en un incremento de hasta ocho veces en la letalidad comparado con la expresión de cada factor. Esto se puede deber a que dichos factores trabajan en conjunto: la sustancia de agregación funciona para mediar la aglutinación o adherencia a células eucarióticas, incrementando la densidad local de bacterias a niveles necesarios para alcanzar un quórum-sensing, mientras que concentraciones locales suficientemente altas del inductor de citolisina CylL_s (regulación de citolisina), podrían inducir altos niveles la expresión de la citolisina (Fig. 3). En endocarditis, la adherencia de *E. faecalis* con actividad citolítica a válvulas cardiacas dañadas, mediado por la sustancia de agregación, podría funcionar para concentrar a *E. faecalis* en la superficie, resultando en la inducción de la síntesis en niveles letales de la citolisina. Extendiendo esta hipótesis, seguido de un daño epitelial debido a la citolisina, la invasión de tejido subepitelial podría ser potenciada por la habilidad de unirse a la matriz extracelular mediante sustancias de agregación, proteínas de fibronectina, vitronectina, trombospondina y colágeno tipo I.

En resumen, el aumento de virulencia de enterococos por la sustancia de agregación parece ocurrir a múltiples niveles. El papel de la SA es la diseminación de plásmidos que codifiquen para factores de virulencia, como son la actividad de citolisina y la resistencia a antibióticos, entre especies. Además, por coincidencia o como resultado de presión selectiva adicional, la sustancia de agregación es una adhesina capaz de promover la adherencia de *E. faecalis* a la superficie epitelial, paso indispensable en la colonización y en la promoción de internalización y sobrevivencia en macrófagos intestinales y células polimorfonucleares (PMN) (Gilmore, 2002).

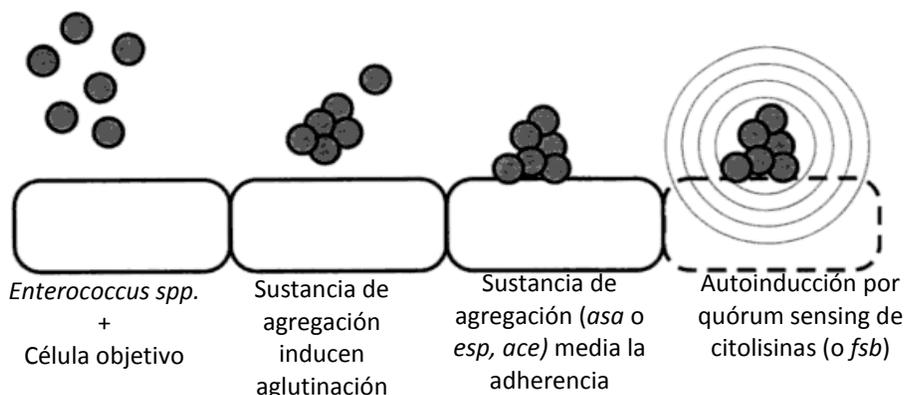


Figura 3. Modelo para el sinergismo de las citolisinas, sustancias de agregación y/o proteínas de superficie (Gilmore, 2002)

1.4 Producción de sustancias con efecto antibacterial

1.4.1 Enterocinas

Las bacteriocinas producidas por las BAL pertenecen al grupo de péptidos sintetizados ribosomalmente, son en su mayoría péptidos antimicrobianos pequeños, catiónicos, anfifílicos, producidos naturalmente por la mayoría de las bacterias, las cuales varían en el espectro y modo de actividad, estructura y masa molecular, termoestabilidad, actividad a diferentes pHs y determinantes genéticos (Moreno *et al.*, 2002; De Vuyst y Vandamme, 1994).

Considerando la estructura y propiedades fisicoquímicas y moleculares las bacteriocinas de BAL pueden ser divididas en tres clases (Tabla 2). Las bacteriocinas de la clase I son péptidos lantibióticos, pequeños, catiónicos, hidrofóbicos y termoestables que contienen un aminoácido inusual (ejemplo: el tioeter del aminoácido lantionina y/o 3- metil-lantionina) que son formados post-traduccionalmente y son capaces de lisar células eucarióticas. Estas son formadoras de poros en la membrana citoplasmática de sus células blanco. La clase II son péptidos pequeños, catiónicos hidrofóbicos, termoestables que no son modificados post-traduccionalmente, excepto el corte del péptido líder en el péptido pre-bacteriocina. En esta clase, y se pueden distinguir tres subclases: subclase IIa o bacteriocinas parecidas a pediocinas con un fuerte efecto antilisterial, que poseen la secuencias consenso YGNGV en su amino terminal; subclase IIb o bacteriocinas que requieren dos cadenas de polipéptidos para su completa actividad y la clase IIc o bacteriocinas que no pertenecen a los otros subgrupos. La clase III son proteínas largas, termoestables e hidrofóbicas (Ingolf *et al.*, 2007; Cotter, 2005).



Desde 1955, cuando la primera sustancia inhibitoria parecida a bacteriocina (BLIS) fue reportada para *Streptococcus* del grupo D, un gran número de enterocinas han sido estudiadas. Se han reportado enterocinas con actividad antilisterial como la E1A producida por *E. faecium* E1. Hoy en día, se sabe bien que la habilidad de enterococos para inhibir el crecimiento de *Listeria* spp. podría explicarse por la relación filogenética tan cercana de estos microorganismos (Moreno *et al.*, 2006).

Las enterocinas se encuentran dentro de las bacteriocinas de clase I, clase IIa y clase IIc que se describieron anteriormente, aunque Giraffa en el 2003 reporta que las enterocinas en su mayoría pertenecen a las bacteriocinas de clase II, que son pequeñas, estables a la temperatura y no lantibióticas, con fuerte efecto antilisterial (Tabla 2).

Tabla 2. Péptidos-bacteriocinas aislados de enterococos (Ingolf F. *et. al.*, 2007)

Organismo	Bacteriocina	Tipo	Masa (Da) (aminoácidos)
<i>E. faecalis</i>	Citolisina Cyl'' _L , Cyl'' _s	Clase I dos peptidos lantibióticos	3,458 (38), 2,032 (21)
<i>E. faecium</i>	Enterocina A	Clase IIa parecida a pediocina	4,829 (47)
<i>E. faecium</i>	Enterocina P	Clase IIa parecida a pediocina	4,493 (44)
<i>E. faecium</i>	Bac 32	Clase IIa parecida a pediocina	7,998 (70)
<i>E. faecium</i>	Bacteriocina GM-1	Clase IIa parecida a pediocina	4,630 (44)
<i>E. faecalis</i>	Bac 31	Clase IIa parecida a pediocina	4,493 (44)
<i>E. mundtii</i>	Mundticina AT06, mundticina KS, enterocina CLR 35 y mundticina QU2	Clase IIa parecida a pediocina	4,287 (43)
<i>E. faecalis</i>	Enterocina SE-K4	Clase IIa parecida a pediocina	5,356 (43)
<i>E. faecium</i>	Bacteriocina T8	Clase IIa parecida a pediocina	5,090 (44)
<i>E. faecium</i>	Enterocina B	Clase II (sin subclase)	5,479 (53)
<i>E. faecalis</i>	Enterocina 1071A, enterocina 1071B	Clase IIc	4,285 (39), 3,897 (35)
<i>E. faecalis</i>	MR10A y MR10B	Clase IIc	5,202 (44), 5,208 (35)
<i>E. faecium</i>	Enterocina L50, L50A, L50B	Clase IIc	5,190 (44), 5,178 (43)
<i>E. faecium</i>	Enterocina Q	Clase IIc	3,980 (34)
<i>E. faecalis</i>	Enterocina EJ97	Clase IIc	5,328 (44)
<i>E. faecium</i>	Enterocina RJ-11	Clase IIc	5,049 (44)
<i>E. faecalis</i>	Enterocina AS-48	Clase IIa	7,166 (70)



Las enterocinas, como la mayoría de las bacteriocinas, tienen como objetivo principal la membrana citoplasmática. Éstas forman poros en la membrana celular, con lo que agotan el potencial transmembranal y/o el gradiente de pH, dando como resultado la fuga de moléculas indispensables intracelularmente (Moreno *et al.*, 2006; Ennahar *et al.*, 2000).

Las enterocinas de la clase IIa presentan un dominio N-terminal hidrofílico altamente conservado que claramente contrasta con el dominio C-terminal hidrofóbico y/o anfifílico que está moderadamente conservado y esta variación afecta la actividad de la bacteriocina en su direccionamiento hacia la membrana. Otra característica importante de las bacteriocinas de la clase IIa es su contenido de cisteínas. De hecho, mientras que las otras bacteriocinas no lantibióticas pueden tener sólo un residuo de cisteína o ninguno, la clase IIa presenta al menos dos residuos de cisteína en el dominio N-terminal en posiciones altamente conservadas. Además la enterocina A es única en el sentido de que posee un enlace disulfuro extra que involucra un segundo par de residuos de cisteína (Ennahar *et al.*, 2000).

1.4.2 Peptidoglucano hidrolasas

El peptidoglucano (o mureína) es el mayor componente de la pared celular de bacterias. Esta molécula forma una barrera que recubre la membrana plasmática y protege a la célula contra la presión osmótica interna en condiciones hipo-osmóticas. El peptidoglucano consiste en cadenas de residuos alternados de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc) unidos mediante enlaces β -1,4, que se entrecruzan por péptidos cortos formados por L- y D-aminoácidos. Durante todo su crecimiento, las células necesitan romper de manera controlada los enlaces del peptidoglucano. Las enzimas responsables de este proceso son conocidas como peptidoglucano hidrolasas o PGHs (Eckert *et al.*, 2006). Las PGHs están involucradas en un gran número de funciones que requieren la modificación de la red rígida del peptidoglucano durante el crecimiento y la división celular. Algunas de estas funciones incluyen la regulación del crecimiento de la pared celular, el intercambio de unidades de peptidoglucano durante el crecimiento, la separación de las células durante la división y la autólisis. Algunas PGHs especializadas amplían los poros en el peptidoglucano para el ensamblaje de grandes complejos que atraviesan las envolturas celulares (pili, flagelos, sistemas de secreción), y otras degradan el peptidoglucano durante la esporulación o la germinación. En bacterias patógenas juegan un papel importante en la adhesión y en la amplificación de la respuesta inflamatoria al liberar péptidos. Además, las PGHs están involucradas en los fenómenos de lisis fratricida de poblaciones microbianas (Lortal y Chapot-Chartier, 2005; Eckert *et al.*, 2006; Vollmer *et al.*, 2008).



Las PGHs se han clasificado de acuerdo con el tipo de enlace que son capaces de romper en el peptidoglucano. Las *N*-acetilmuramoyl-L-alaninamidases rompen el enlace amida entre MurNAc y la L-alanina del péptido. Las peptidasas son capaces de hidrolizar el último aminoácido del extremo carboxilo de los péptidos (carboxipeptidasas), o de romper completamente los puentes formados por los péptidos (endopeptidasas). Las *N*-acetilglucosaminidasas y las *N*-acetilmuramidases hidrolizan los enlaces β -1,4 de la cadena de glicanos. Las primeras lo hacen dejando un extremo GlcNAc reductor, mientras que las segundas hidrolizan el enlace entre MurNAc y GlcNAc, pudiendo dejar libre un extremo MurNAc reductor, llamadas lisozimas, o formando un anillo 1,6-anhidro en MurNAc, conocidas como transglicosilasas líticas (Fig. 4) (Vollmer *et al.*, 2008).

Las PGHs se pueden agrupar en dos clases de enzimas. En el primer grupo se encuentran las autolisinas, las cuales son secretadas del citoplasma bacteriano por un péptido señal en el extremo N-terminal y degradan el peptidoglucano de la pared celular en sitios específicos durante el desarrollo de la célula. Como las autolisinas son peligrosas para la integridad de la célula, su expresión o actividad debe estar bien regulada. Una vez producida la PGH, su regulación se lleva a cabo por algunas proteasas asociadas a la pared celular que disminuyen drásticamente su capacidad autolítica. En el segundo grupo se encuentran las endolisinas, que están codificadas en bacteriófagos y son exportadas por holinas (pequeños polipéptidos que se insertan dentro de la membrana citoplasmática de la bacteria hospedera). La función de las endolisinas es la hidrólisis completa de la pared celular para la liberación de los bacteriófagos. La inducción del profago puede ser causada por un agente mutagénico o por estrés ambiental, por ejemplo choque térmico (Navarre *et al.*, 1999; Lortal y Chapot-Chartier, 2005).

Se han caracterizado peptidoglucano hidrolasas de BAL, entre ellas, algunas del género *Enterococcus*. *E. hirae* tiene dos hidrolasas autolíticas: la muramidasa-1, que es una β -1,4-*N*-acetilmuramidasa con una forma activa de 87 kDa (Dolinger *et al.*, 1988), y la muramidasa-2, que tiene dos formas activas, una de 125 kDa y otra de 75 kDa (Dolinger *et al.*, 1989). La muramidasa-1 se sintetiza como zimógeno y necesita una proteólisis para su activación. La muramidasa-2 tiene dos o posiblemente tres dominios con actividad de glucosidasa cerca del extremo amino terminal y seis secuencias repetidas de 45 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal que están involucradas en la unión al peptidoglucano (Shockman, 1992).

El genoma de *E. faecalis* codifica para 20 peptidoglucano hidrolasas putativas, de las cuales 6 son glucosaminidasas, 7 muramidases, 2 amidases, 2 endopeptidasas y 3 proteínas relacionadas con transglicosilasas líticas. De estas enzimas putativas se han estudiado solamente tres. La primera fue la AtlA, la cual muestra actividad de *N*-



acetilglucosaminidasa. Posteriormente se identificaron dos autolisinas adicionales: la AtIB y la AtIC, éstas muestran una actividad de *N*- acetilmuramidasa (Mesnage *et al.*, 2008).

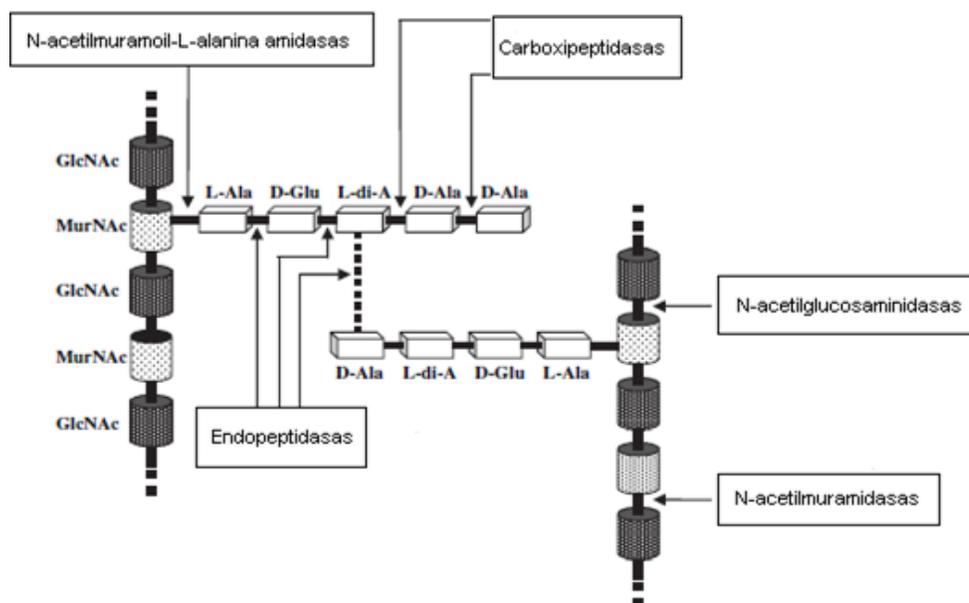


Figura 4. Estructura del peptidoglucano y especificidad por sustrato de las PGHs (adaptado de Layacet *et al.*, 2008)

2. Antecedentes

2.1 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 friable. Cuando es auténtico, se madura en el lugar donde se produce, antes de salir al mercado, durante tres a cuatro meses, por lo que, posee aromas, olores y sabores característicos, en general más intensos que la mayoría de los quesos frescos nacionales (Cervantes *et al.*, 2008, www.quesocotija.org.mx).

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 fecales están en cuentas por debajo del límite máximo que indica la NOM 121 “quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias” que es 50 NMP/g (Fig. 5), además de que las bacterias lácticas pertenecientes al género de enterococos que aunque no son población dominante, están presentes y se mantienen durante el proceso de maduración (Zuñiga, 2009). Se ha confirmado la ausencia de microorganismos patógenos como: *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Micobacterium bovis* y *Brucella abortus*. Por todo lo anterior, 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).

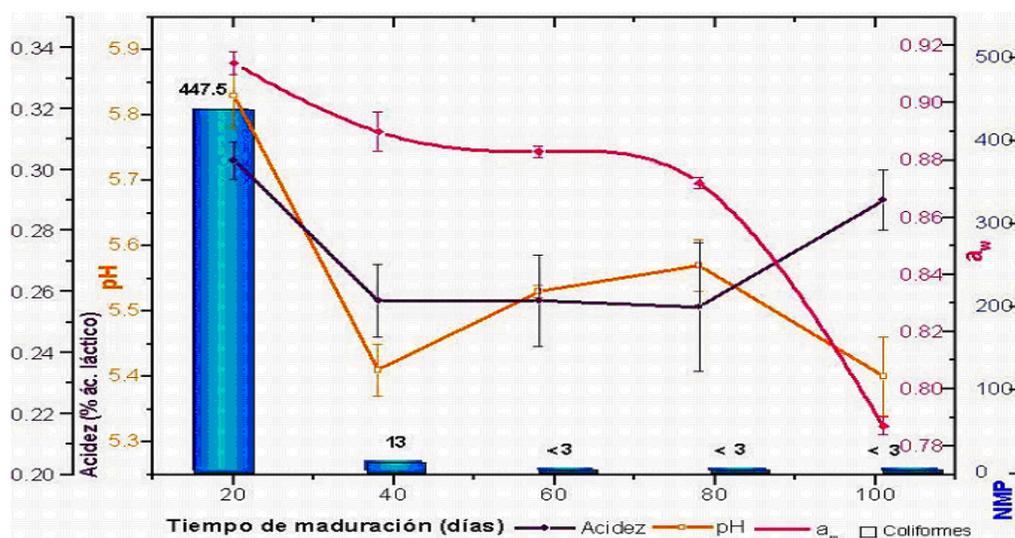


Figura 5. Cuenta de coliformes, a_w , pH y %acidez, respecto al tiempo en una muestra de queso Cotija proveniente de la región de origen (Bravo, 2008)

2.2 Microbiota del queso Cotija

Como se mencionó, dentro de la población microbiana del queso Cotija se encuentran BAL las cuales se identificaron y describieron por métodos moleculares (secuenciación de la región V3 del gen ADNr 16S) dando como resultado: *Enterococcus spp.*, *Marinilactibacillus* y *Vagococcus* (Zuñiga, 2009). Así mismo también se han aislado



bacterias con actividad proteolítica, las cuales provienen del queso con un tiempo de maduración mayor a los 6 meses: *Bacillus megaterium*, *B. flexus*, *B. licheniformis* o *B. pumilus* o *B. mojavensis*, *Staphylococcus sciuri* subsp. *sciuri*, *rodentium* o *carnaticus* y *E. faecalis* (Hernández-Mejía, 2007) y con actividad lipolítica: *Staphylococcus piscifermentans*, *S. saprophyticus*, *B. pumilus* y *S. xylosus* (García-Saturnino, 2006). En otro estudio se lograron identificar bacterias halófilas en las que se resaltan los géneros: *Enterococcus*, *Vagococcus* y *Lactobacillus* (Gómez-Castelo, 2010). Posteriormente se ha logrado identificar a *L. pentosus*, *L. paracasei* y *L. brevis* (Delgado-Arciniega, en revisión).

Recientemente se encontró que las seis cepas de enterococos aislados de este producto presentaban actividad antibacteriana, al cultivarse en medio de cultivo MRS, contra: *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, *E. coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Yersinia enterocolitica* (Fig. 6) (Olvera-García, 2010). Serrano en el 2010 concluyó que la actividad antibacteriana por una cepa de *E. faecalis* estaba dada por una peptidoglucano hidrolasas (PGH) de 76 kDa con actividad de actividad *N*-acetilglucosaminidasa llamada AtIA y previamente descrita y caracterizada por Eckert *et al.* en el 2006 (Fig. 7).

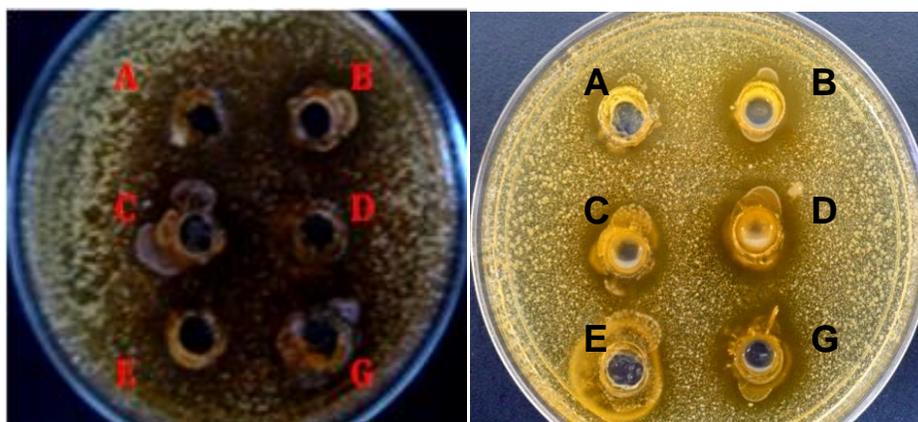


Figura 6. Prueba de difusión en agar. A, Halos de inhibición de las cepas A, D e I: *E. faecalis* y B, C, G: *E. faecium*. contra *E.coli*; B, Halos de inhibición contra *S. aureus* (Olvera-García, 2010)

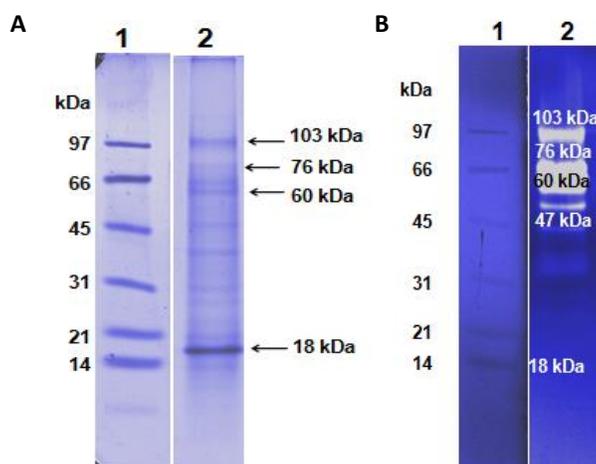


Figura 7. A: Perfil electroforético de los sobrenadantes concentrados de Cepa I (*E. faecalis*) (2). Marcador de peso molecular bajo (1). Proteína total por pozo, 40 µg. Gel SDS-Tris-Tricina, 10% de poliacrilamida. **B:** Zimograma de actividad lítica contra *M. lysodeikticus* de los sobrenadantes concentrados de Cepa I (*E. faecalis*) (2). Marcador de peso molecular bajo (1). Proteína total por pozo, 40 µg. SDS-Tris-Tricina, 10% de poliacrilamida (Serrano, 2010)

3. Justificación

A pesar de que el género *Enterococcus* spp. es responsable de efectos benéficos en los alimentos fermentados, su uso como indicadores de contaminación fecal y la frecuente asociación con enfermedades transmitidas por alimentos, es de importancia en el ámbito de salud pública. Por lo tanto, en este estudio se pretende dilucidar el potencial de patogenicidad en enterococos presentes en el queso Cotija, a través de la identificación de algunos factores de virulencia. Aunado a un análisis de producción de compuestos con actividad antibacteriana que le pudieran conferir un efecto positivo a su presencia en el alimento.

4. Hipótesis

Los *Enterococcus* spp. presentes en el queso Cotija, tendrán una baja o nula incidencia de genes relacionados con factores de virulencia, debido a su nicho ecológico, así como genes involucrados en el desarrollo de actividad antibacteriana por parte de este género.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Establecer la presencia de algunos genes que codifican para bacteriocinas, peptidoglucano hidrolasas y para factores de virulencia en enterococos presentes en muestras de queso Cotija, así como su probable expresión.



5.2 Objetivos particulares

- Aislamiento en medio selectivo e identificación parcial de *Enterococcus* spp. a partir de diferentes muestras de queso Cotija Región de Origen.
- Evaluar la posible virulencia y/o efectos antibacterianos de los *Enterococcus* spp. aislados, a través de:
 1. Detección de genes que codifican para los siguientes factores de virulencia: citolisina, proteína de superficie de enterococos y sustancia de agregación (*cyl A esp* y *asa1*) por PCR- multiplex. Confirmar expresión de los genes a través de prueba de hemólisis, ensayo de formación de biopelículas y adherencia a líneas celulares Caco-2 y HT-29.
 2. Detección del gen que codifica para una peptidoglucano hidrolasa (*atlA*) con actividad *N*-acetilglucosaminidasa AtlaA por PCR punto final, en las muestras de queso Cotija (Serrano, 2010). Identificar expresión y actividad de la proteína con un peso teórico de 72 kDa a través de SDS-PAGE y Zimografía contra *Micrococcus lysodeitikus*, además de pruebas de difusión en agar contra microorganismos indicadores para determinar actividad antibacteriana.
 3. Detección de los genes que codifican para las enterocinas A (*entA*) y AS-48 (*as-38*) por PCR punto final. Confirmar expresión a través SDS-PAGE y Zimografía contra *Listeria monocytogenes* para identificar expresión y actividad de la(s) bacteriocina(s) con un peso teórico de 4.8 y 7.2 kDa respectivamente. Además de pruebas de difusión en agar contra microorganismos indicadores para examinar determinar actividad antibacteriana.



6. Metodología

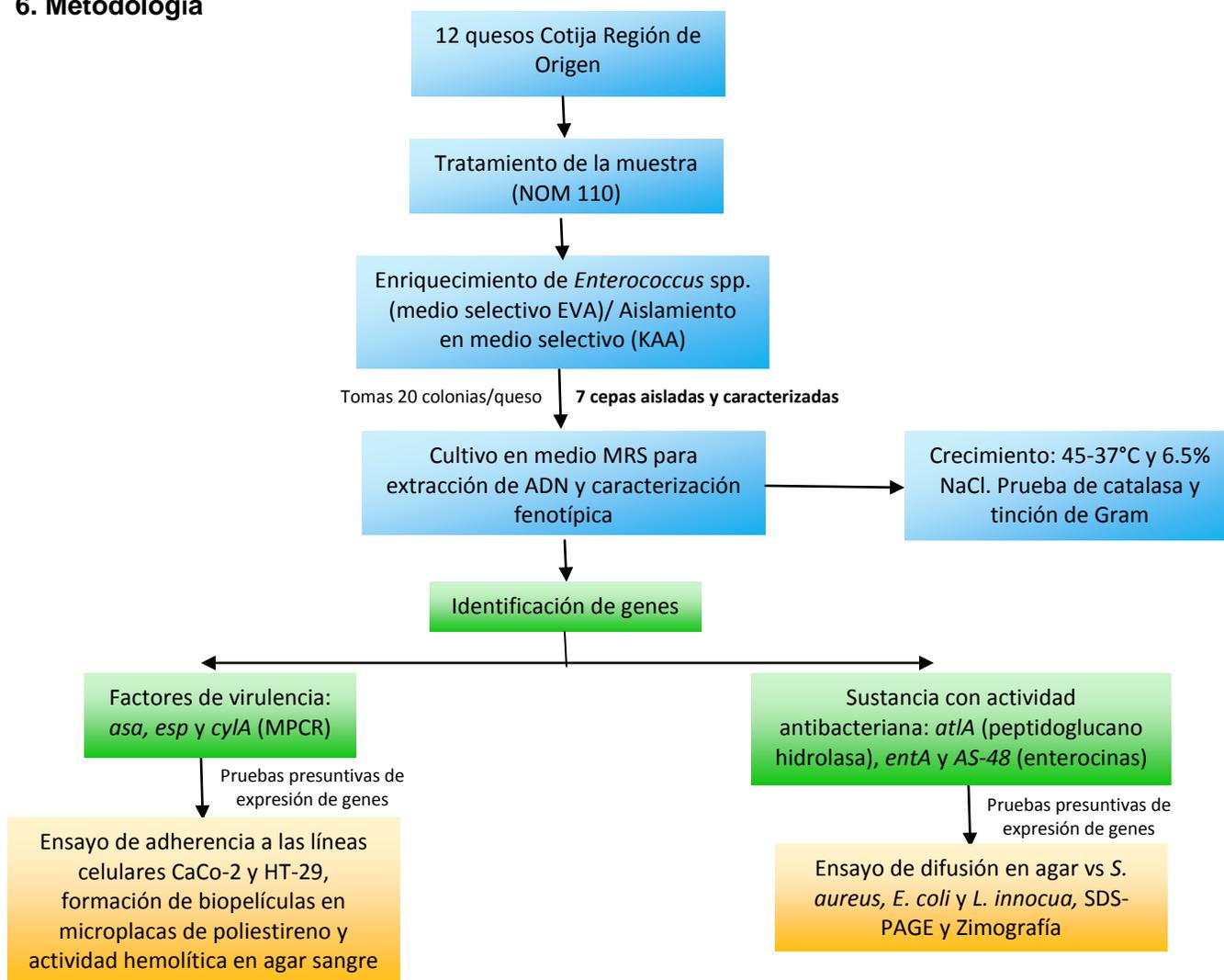


Figura 8. Diagrama general de trabajo

6.1 Descripción de las muestras

Se analizaron 12 quesos Cotija “región de origen” con más de 3 meses de maduración (en el lugar donde se produjo) y almacenados en congelación a -70°C (tritutados y homogeneizados omitiendo la corteza del queso) en el laboratorio desde hace más de 5 años (Tabla 3). De cada uno se tomaron muestras para la detección y enriquecimiento de *Enterococcus* spp. En este trabajo se incluyeron las 7 cepas de *Enterococcus* spp. aisladas y caracterizadas anteriormente por el grupo de trabajo.



Muestras:

Tabla 3. Muestras de queso Cotija y región de la que fueron obtenidas. Cepas de *Enterococcus* spp.

Número	Productor	Lugar
1	David Chávez Barajas	Rancho Plaza de Chávez, Quitupan
2	José Arnulfo Vargas González	Rancho La Jabalina, Sta. María del Oro
3	Porfirio Pulido	Rancho La Tortuga, Sta. María del Oro
4	Ignacio Mendoza Valencia	Rancho La Mesa del Aguacate
5	Gonzalo Vargas Reyes	Rancho la Mesa del Guayabo, Quitupan
6	Salvador Sandoval	Rancho la Piedra Amarilla, Jilotlan
7	Rafael Figueroa	San Nicolás Mpio. Cotija
8	Martin Pulido	La tortuga, Sta. María del Oro
9	Javier Vargas	El Caracol
10	Fam. Sánchez	Rancho el Lorenzo
11	Rafael Torres	Las Cabras Mpio. Quitupan
12	David Chávez Mendoza	Rancho Buena Vista, Quitupan
A <i>Enterococcus faecalis</i> B <i>Enterococcus faecium</i> C <i>Enterococcus faecium</i> D <i>Enterococcus faecalis</i> E <i>Enterococcus faecium</i> G <i>Enterococcus faecium</i> I <i>Enterococcus faecalis</i>		Aisladas y caracterizadas por el grupo de trabajo. Bravo A., 2008 Delgado-Arciniega, en revisión

Tabla 4. Cepas de referencia

Nombre del microorganism	Cepa	
<i>E. coli</i>	DH5 α	L-312 F.Q. UNAM
<i>P. acidilactici</i>	ATCC 8042	L-312 F.Q. UNAM
<i>L. casei</i>	Aislado de Queso Cotija	L-312 F.Q. UNAM
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6558	L-312 F.Q. UNAM
<i>E. faecium</i>	Cernelle 60 (Neoflor, pediátrico)	Cepa comercial
<i>E. faecalis</i>	NCIMB-700585	Dra. Edith Ponce UAM-I
<i>E. faecium</i>	MXVK29	Dra. Edith Ponce UAM-I
<i>S. pyogenes</i>	-	L-312 F.Q. UNAM
<i>E. coli</i> enteropatógena	2348/69	Dr. Carlos Eslava F.M. UNAM
<i>Streptococcus</i> spp.	25245	Dr. Carlos Eslava F.M. UNAM
<i>E. coli</i> enteroagregativa	4976 6042	Dr. Carlos Eslava F.M. UNAM
<i>M. lysodeikticus</i>	ATCC 4698	Sigma-Aldrich

6.2 Preparación de la muestra y enriquecimiento para *Enterococcus* spp.

Debido a que los quesos Cotija (tritutados y homogeneizados) estaban en congelación a -70 °C se hizo un paso de descongelación a 5 °C durante 18 h tal como lo indica la NOM 110 "Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico". Se



tomaron 10 g de la muestra y se adicionaron 90 mL del diluyente (solución salina isotónica 0.85 % p/v, pH 7), dentro de una bolsa estéril, para después ser homogeneizado en un Stomacher (Stomacher 400 circulator, Seward) por 2 min a máxima velocidad.

Se inoculó un 1 mL del homogeneizado en caldo etil-violeta-azida (EVA, USBiological) e incubó a 250 rpm, 37 °C durante 48 h en una incubadora INNOVA 4000, New Brunswick Scientific. Posteriormente se sembró por agotamiento en medio sólido kanamicina-escualina-azida de sodio (KAA-OXOID) y se incubaron a 37 °C por 24 h en una estufa estática Gravity Convection E-71.

Para confirmar la selectividad del medio EVA se inocularon las cepa de *L. casei*, *P. acidilactici* (BAL) y *E. coli* (microbiota coliforme fecal acompañante de enterococos) y se incubaron en las condiciones descritas anteriormente.

Obtención de poblaciones de enterococos: lo siguiente se realizó para cada muestra de queso Cotija. A partir del aislamiento por agotamiento en medio KAA, se observaron colonias con crecimiento característico de *Enterococcus* spp. En una gráfica comparativa de número de colonias a analizar contra el número de especies a identificar, menos de 100 colonias son suficientes para identificar una sola especie (Wacher C. comunicación oral). Por lo tanto se tomaron 20 colonias de cada caja y se inocularon en 100 mL de medio MRS (de Man, Rogosa, Sharpe; Oxoid). Se incubaron a 250 rpm, 37 °C durante 8 h. Del cultivo en medio MRS se tomaron 3 mL y se colocaron en viales criogénicos, los cuales se adicionaron con 15 % de glicerol (80 %) y se almacenaron a -20 °C (Fig. 9). A esta mezcla de 20 colonias se le denominó “población de enterococos”.



Figura 9. Diagrama de obtención de poblaciones de enterococos por cada muestra de queso Cotija



Fundamento de medios selectivos:

Debido a la importancia de los enterococos en diferentes alimentos, muestras clínicas y ambientales, la diversidad de los medios de cultivo que se han descrito para su detección y conteo es amplia. Comúnmente son dos los medios selectivos más usados para identificar enterococos de matrices alimentarias, agua y muestras clínicas: selectivo de *Enterococcus* (SB) y Kanamicina Escualina-Azida de sodio (KAA). Por su parte, el medio etil-violeta azida de sodio (EVA) y agar citrato azida de sodio son medios recomendados y utilizados con frecuencia para el recuento de enterococos en alimentos lácteos (Doming, *et al.*, 2003).

Agar 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 sulfato de kanamicina se adiciona por separado al agar reconstituido. 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 Fe^{2+} . 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 (OXOID, 1990).

Caldo EVA: debido a la presencia de la azida de sodio y el violeta de etilo se consigue el carácter selectivo del medio. La mezcla de peptonas constituye la fuente de nitrógeno y la glucosa la fuente de carbono y energía. Los dos fosfatos tienen la función de regulación del pH y el cloruro de sodio le da la salinidad necesaria para mantener el equilibrio osmótico. El ajuste de la concentración de violeta de etilo es crítico para el buen crecimiento de los enterococos y la inhibición del resto de los microorganismos. Este medio suele utilizarse como medio confirmativo, y se siembra a partir de un caldo Rothe (azida dextrosa). Puede adicionarse glicerol, que según algunos autores facilita la fermentación de la glucosa por los *Enterococos spp.* (Panreac, 2003).

6.3 Caracterización fenotípica

Cada una de las poblaciones almacenadas se reactivó inoculando 50 μ L en 10 mL de medio MRS a 37 °C por 12 h en una estufa estática Gravity Convection E-71. Posteriormente se tomaron 100 μ L de cada cultivo y se inocularon en 10 mL de medio MRS y se incubaron a 37 °C (con 6.5 % NaCl) y 45 °C (sin NaCl). De cada cultivo se hicieron tinciones de Gram y se observaron al microscopio para verificar la presencia de cocos Gram-positivos y se les realizó la prueba de catalasa. La presencia de burbujas indicaba que la prueba era positiva. Como control positivo se utilizó una asada de cultivo



de *Staphylococcus aureus* ATCC 6558 el cual es catalasa positivo. Además se sembraron por agotamiento en MRS-Vancomicina (agar 1 %) e incubaron a 37 °C por 24 h en una estufa estática Gravity Convection E-71.

6.4 Extracción de ADN

Las poblaciones de enterococos (20 colonias) y cepas aisladas se inocularon en 97 mL de medio MRS (previamente se describió que se almacenan 3 mL de cada población) y se incubaron a 250 rpm y 37 °C. El crecimiento se detuvo a las 8 h (D.O. 1-1.5), es decir, durante la fase exponencial de crecimiento (Olvera-García, 2010). Para separar las células del medio, se centrifugó a 10,015 x g durante 15 min a 4 °C (Biofuge Primo R, Haereus). Después se realizaron tres lavados con solución salina isotónica (0.85 % p/v, pH 7) y se recuperaron las células centrifugando en las mismas condiciones.

Para la extracción de ADN se empleó un kit (Fast ID Genomic DNA Extraction Kit), siguiendo las instrucciones del proveedor, y se agregaron 2 mg de lisozima para hacer más eficiente la lisis celular.

6.4 Detección de genes de virulencia por PCR-Multiplex

El PCR multiplex (MPCR) es una técnica en la cual se emplean conjuntos de cebadores específicos combinados en una sola reacción de PCR. Por lo tanto, MPCR es útil para la rápida detección de varios genes blanco, ya que se puede hacer la amplificación simultánea de varios fragmentos de ADN. En comparación con otras técnicas como el DGGE, permite el análisis de varios microorganismos al mismo tiempo y resulta ser un buen método para la detección específica de los mismos en una matriz compleja. MPCR podría ser útil como herramienta para dilucidar la composición de una comunidad dinámica (Vankerckhoven *et al.* 2004).

Para el análisis de genes que codifican para factores de virulencia se realizó la técnica de PCR-multiplex donde se usaron los cebadores específicos descritos por Vankerckhoven *et al.* en el 2004 y siguiendo las condiciones de reacción que describen y que son confirmadas por Martín-Platero *et al.* en el 2009 (Tabla 5). La especificidad de los cebadores se analizó por algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool, National Center of Biotechnology Information, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



Tabla 5. Lista de cebadores para cada factor de patogenicidad (Vankerckhoven *et al.* 2004; Martín-Platero *et al.*, 2009)

Genes	Cebador	Tm	Tamaño del amplicón (pb)
<i>cylA</i> <i>cylAD</i> <i>cylAR</i>	5'-TAGCGAGTTATATCGTTCACTGTA-3' 5'-CTCACCTCTTTGTATTTAAGCATG-3'	52.3 52.3	688
<i>asa1</i> <i>asa1D</i> <i>asa1R</i>	5'-GCACGCTATTACGAACTATGA-3' 5'-TAAGAAAGAACATCACCACGA-3'	50.5 48.5	375
<i>esp</i> <i>esp14D</i> <i>esp12R</i>	5'-AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG-3' 5'-AATTGATTCTTTAGCATCTGG-3'	47.4 46.5	510

Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineamiento o hibridación a 56 °C durante 45 s y polimerización o extensión a 72 °C durante 1 min; y una extensión final a 72 °C durante 10 min. Condiciones modificadas para el uso de *Pfu* polimerasa (2.5U/ µL) (Fermentas)

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL usando buffer *Pfu*+MgSO₄ 1X, dNTP's 10mM, cebadores *asa1D* y *asa1R* 0.1µM, cebadores *espD*, *espR* 0.2 µM, *cylAD*, *cylAR* 0.2µM, 100 ng de ADN de cada muestra y 0.625 U de *Pfu* polimerasa (Fermentas, USA).

Después de la amplificación, los productos de PCR se examinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v). La tinción se realizó con bromuro de etidio 0.1%. Los geles se examinaron en un transiluminador (Hoefler UVTM, USA).

6.4.1 Pruebas presuntivas para expresión de los genes de virulencia

6.4.1 a) Actividad hemolítica

Semedo y colaboradores en el 2003 examinaron cepas estándar de *Enterococcus* spp. de origen clínico y alimentos con respecto a su probable actividad hemolítica conferida por la presencia del operón de citolisinas. Los investigadores concluyen que algunas cepas de *E. faecalis*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans* y *E. faecium* presentaba actividad hemolítica. También concluyen que aquellos que presentaban todos los genes del operón de citolisinas presentaban β-hemólisis tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.

Para detectar la presencia de hemolisina, enzima que permite la clasificación de los *Streptococcus* en alfa (hemólisis parcial, incompleta que torna color verdoso), beta (hemólisis total) y gamma hemolíticos (no existe hemólisis) se realiza la prueba de hemólisis en agar sangre. Muchas otras bacterias, aparte de los *Streptococcus*, pueden tener esta enzima (Fig. 10).

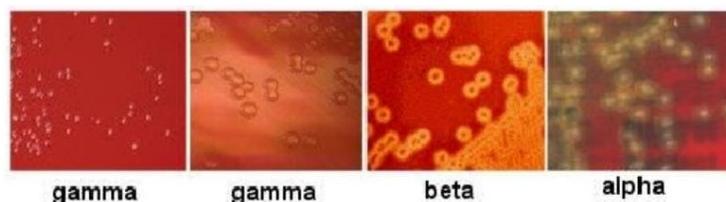


Figura 10. Hemolisis alfa, beta y gamas en placas de agar sangre (Atlas de Bacteriología, <http://www.telmeds.org>)

Para verificar la expresión del operón de citolisina se sembró por agotamiento una asada, proveniente del medio de donde se hizo la extracción de ADN, en agar sangre (4 % de sangre de carnero estéril y desfibrinada (Dibico). Zonas claras alrededor de las colonias indican la producción de dicha enzima. Se sembró como control positivo a *S. pyogenes* y cepas de enterococos de aislados clínicos (laboratorio de Programa de Inmunología Molecular Microbiana. Facultad de Medicina. UNAM)

6.4.1 b) Ensayo de adherencia

Se realizó un ensayo de adherencia *in vitro* a líneas celulares HT29 (adenocarcinoma de colon humano grado II) y Caco-2 (adenocarcinoma colorectal humano). Se utilizaron controles positivos para dos tipos de adherencia descritos para *E. coli* y uno para una bacteria ácido láctica (*Streptococcus spp.*).

Preparación de células: se propagaron las células epiteliales en una botella para crecimiento celular de 250 mL en presencia de MEM (Medio Mínimo Esencial) para HT-29 y D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) para Caco-2 adicionado con suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (Tabla 6). La botella se incubó a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 % y humedad del 85 % durante 24 h o hasta tener una confluencia >85 %. Una vez obtenida dicha confluencia se eliminó el medio y se desprendió la monocapa con lavados de PUKS (NaCl, KCl, NaHCO₃ y EDTA) incubando durante 5 min para favorecer el desprendimiento. Finalmente se adicionaron 25 mL de medio adecuado para la línea celular (sin suero y sin antibiótico), y se resuspendió.

Tabla 6. Composición de los medios

MEM	D-MEM- adicionado con glucosa
Glutamina 1 %	Glutamina 1 %
Bicarbonato 2 %	Bicarbonato 2 %
Antibiotico (estreptomocina/penicilina) 1 %	Antibiotico (estreptomocina/penicilina) 1 %
Suero fetal bovino 5 %	Suero fetal bovino 10 %
HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) 1 %	HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) 1 %



Crecimiento bacteriano: se realizaron preinóculos (3 % de cultivo bacteriano en medio MRS) y se incubaron a 37 °C por 24 h. Para realizar el inóculo se adicionó D-manosa al 10 % a los medios. Para el crecimiento de *E. coli* se usó triptona al 1 % y MRS para el control de BAL y las poblaciones de enterococos. Los inóculos se incubaron por 18 h a 37 °C. El cultivo se centrifugó a 2500 rpm en una centrifuga Sorvall RT6000, 15 min a 4 °C. El pellet se resuspendió en medio MEM/D-MEM (sin suero y sin antibiótico) con D-manosa al 1 %.

Ensayo de adherencia: Se preparó una placa de polipropileno colocando una lenteja de plástico estéril en cada uno de los pozos y se agregó 1 mL de la suspensión de células propagadas. La placa se incubó a 37 °C durante 24 h (HT29) y 48 h (Caco-2) en presencia de 5 % de CO₂ y 85 % de humedad.

Pasado el tiempo se eliminó el medio y lavó con buffer de fosfatos (PBS) pH7. Se agregaron 900 µL de la suspensión bacteriana y se incubó a 37 °C durante 3 h. Posteriormente se eliminó el medio de los pozos (comenzar por el control de células) y se lavaron con PBS. Para fijar se adicionó 1 mL de metanol durante 1 min. La tinción se realizó agregando 1 mL de colorante Giemsa durante 8 min. Finalmente se lavó con agua desionizada estéril.

A continuación se tomó la lenteja de cada pozo, con ayuda de unas pinza, cuidando de no dañar la monocapa, y se sumergió en acetona durante 15 s agitando, luego se pasó a una solución acetona/ xilol (1:1) agitando nuevamente y para finalizar se sumergió en xilol durante unos segundos y se eliminaron los residuos.

En un portaobjetos se colocó una gota de resina (tolueno), seguido de la lenteja, dejando la monocapa en la parte superior, y finalmente se puso un cubreobjetos. Se dejó secar por 24 h y después observó al microscopio.

Se consideró adherencia positiva a más de 10 células bacterianas por célula epitelial.

6.4.1 c) Formación de biopelículas

El gen *esp* se relaciona con la capacidad de formación de biopelículas (Martín-Platero, 2012; Toledo-Arana, 2001).

Este ensayo se realizó a partir de un preinóculo de cada población y cepa pura, crecido en 10 mL de medio MRS a 37°C durante 24h en una estufa estática Gravity Convection E-71. A continuación se realizó un inóculo 1:100 en una microplaca de poliestireno estéril, la cual se incubó a 37 °C, 14 h en una estufa estática Gravity Convection E-71. Posteriormente se retiró el medio de cultivo de cada pozo de la microplaca, cuidando de



no tocar el fondo de la misma. Se tiñó con 50 μ L de solución acuosa de cristal violeta al 1 % durante 10 min, se realizaron 3 lavados con agua destilada y por último un paso de decoloración agregando 200 μ L de etanol al 70 % por 10 min (George *et al.*, 1998). La microplaca, con la biopelícula formada en el fondo de cada pozo se leyó a 620nm en el lector Epoch Biotek.

6.5 Identificación del gen de peptidoglucano hidrolasa AtIA

Para la detección del gen *atIA* que codifica para la PGH se siguió la metodología empleada por Serrano, 2013 (Fig. 11). Usando los cebadores y las condiciones de reacción de la Tabla 7.

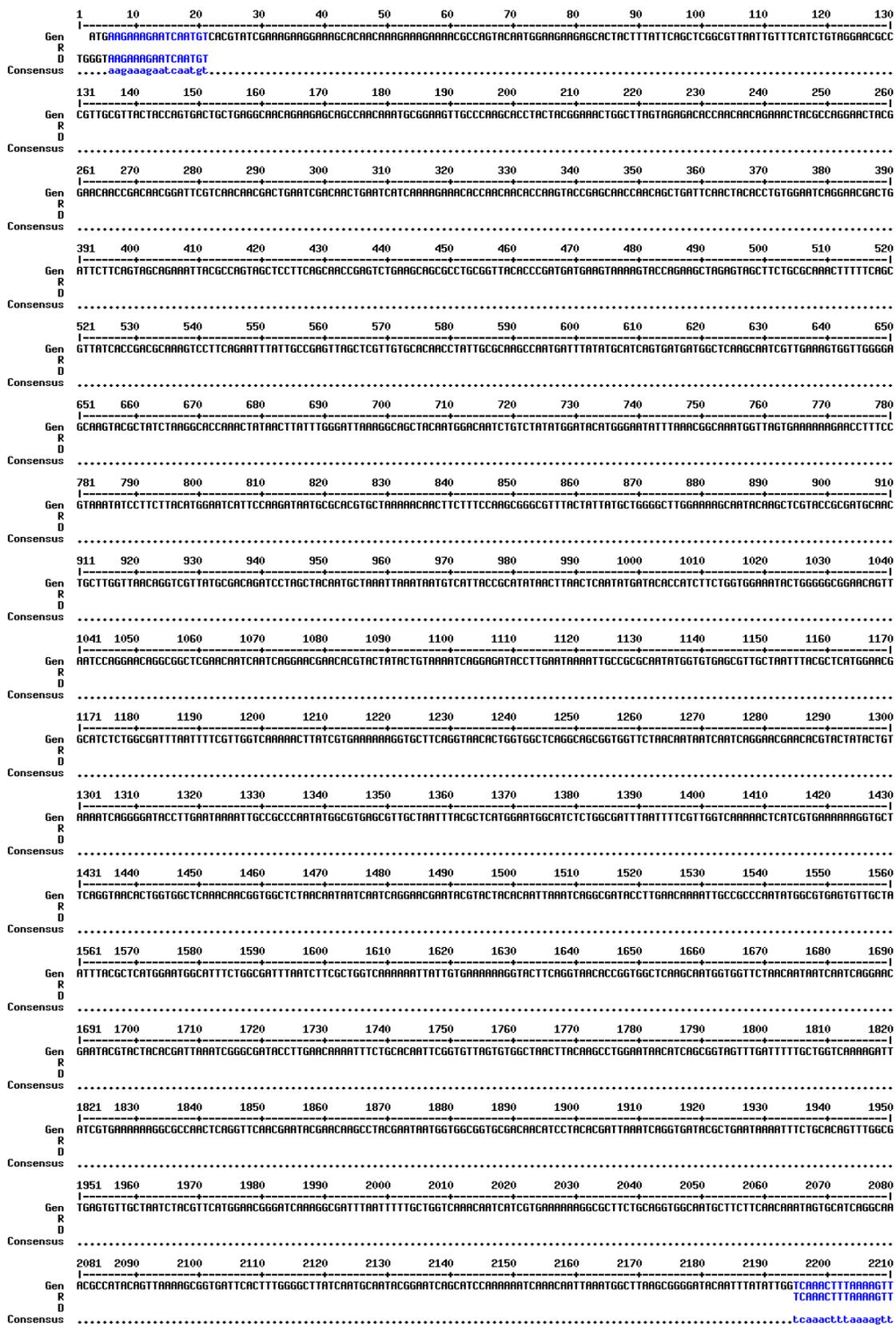


Figura 11. Alineamiento de los cebadores *aux D* y *aux R* con la secuencia del gen *atIA* completo, Serrano, 2013)-(Multialin/Oligocalc)



Tabla 7. Cebadores para identificar PGH de *E. faecalis*

PCR	Cebadores	Productos de PCR (pb)	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
<i>atlA</i> (PGH)	<i>aux D</i>	5'-CGC CCA TGG <u>GTA</u> AGA AAG AAT CAA TGT-3'	2200	Serrano, 2010
	<i>aux R</i>	5'-CGC CTC GAG ACC AAC TTT TAA AGT TTG A-3'		

Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineamiento o hibridación de 55 °C durante 45 s y polimerización o extensión a 72 °C durante 4 min; en todos los casos se realizó una extensión final a 72 °C durante 10 min.

La reacción de PCR se llevo a cabo en un volumen final de 25 µL usando buffer *Pfu*+MgSO₄ (1X), dNTP's (10 mM), cebadores *aux D* y *aux R* (0.2 µM), 100 ng de ADN de cada muestra y 0.625 U de polimerasa *Pfu* (Fermentas).

Después de la amplificación, los productos de PCR fueron examinados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). La tinción se realizó con bromuro de etidio 0.1%. Los geles fueron examinados en un transiluminador (Hoefer UVTM).

6.5.1 Pruebas para identificar la síntesis de la peptidoglucano hidrolasa *AtIA*

6.5.1 a) Detección de la peptidoglucano hidrolasa *AtIA* (SDS-PAGE)

Con el fin de detectar la expresión del gen que codifica para la PGH se llevó a cabo una electroforesis de las proteínas extracelulares en geles de SDS-PAGE al 10 % (Mini Protean 3 System, Electrophoresis Module, Bio-Rad Laboratories). Se realizó un preinóculo al 0.1% en medio MRS de cada una de las poblaciones y cepas aisladas, seguido de un inóculo al 2% en el mismo medio, los cuales se incubaron a 37 °C, 250 rpm por 7 h (D.O. 1). Se centrifugaron a 10,015 x g y los sobrenadantes de cada población y cepa aislada se precipitaron con TCA (ácido tricloroacético saturado). Para precipitar se utilizaron 1.8 mL de cada sobrenadante (centrifugado, neutralizado y filtrado) y 200 µL de TCA (10% v/v) durante 1 h a 4 °C, se centrifugaron a 21,000 x g 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. Posteriormente se resuspendieron en 20-30 µL de buffer de carga del gel (Tris-HCl 3M/SDS 0.3 % buffer, pH 8.45). Se utilizó marcador de proteínas de peso molecular alto (SDS-PAGE Standards, High range. No. de catálogo 161-0303. Bio-Rad Laboratories). Las condiciones de la electroforesis fueron 120 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 de un documentador de imágenes GelDoc (Bio-Rad) y se calcularon los pesos moleculares de las bandas usando el software del equipo.

6.5.1 b) Detección de actividad lítica de la Peptidoglucano hidrolasa a través de zimografía

Para identificar la banda con actividad lítica perteneciente a la PGH AtIA, se utilizaron geles de SDS-PAGE al 10 % con células embebidas de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma- Aldrich) al 0.2 % v/v. De acuerdo al protocolo descrito en el Anexo 8.1.

La obtención de las proteínas extracelulares se hizo de la misma forma que se describe en el punto 6.5.1 a).

Las condiciones de electroforesis son las mismas que las anteriormente descritas. 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 lítica se detectó por la presencia de una banda clara o translúcida sobre un fondo opaco. Para aumentar el contraste, el gel se tiñó con una solución de azul de metileno 0.1% v/v en KOH 0.01 % v/v durante 20 min y a continuación se destiñó con agua destilada hasta observar la aparición de las bandas de actividad. Se utilizaron los mismos marcadores de peso molecular para proteínas para poderlos comparar con los geles teñidos con azul de Coomasie (Leclerc y Asselin, 1989).

6.5.1 c) Ensayo de difusión en agar contra *S. aureus* y *E. coli*

Para determinar el efecto antibacteriano por la actividad lítica de la PGH se realizaron pruebas de difusión en agar con los sobrenadantes del cultivo por duplicado. Cultivos de 50 mL en medio MRS incubados por 16 h (D.O. 2-2.5) de fermentación, donde la curva de crecimiento se encuentra en la fase log tardía (Olvera-García, 2010), se centrifugaron a 10,015 x g por 15 min. A los sobrenadante obtenidos se les ajustó el pH a 6.5 con NaOH (50%) para evitar que el efecto observado se debiera a la presencia de ácidos orgánicos. Finalmente se filtraron con membrana milipore de 0.45 µm para eliminar células y se concentraron a través de liofilización, finalmente el liofilizado se resuspendió en 5 mL de buffer de fosfatos pH 7.



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 BHI agar 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 indicadores seleccionada por formar un césped bacteriano homogéneo (20 µL de la dilución óptima). Con un penicilindro se hacen pozos sobre la doble capa de agar, en cada pozo se agregaron 200 µL de cada uno de los sobrenadantes tratados. 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 se observó un halo de inhibición nítido y superior a 1 mm alrededor del pozo.

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

Bacterias “blanco”: *Escherichia coli* DH5α y *Staphylococcus aureus* ATCC 6558. Estas bacterias se incubaron previamente en caldo cerebro-corazón (BHI-Difco) durante 8 h, partiendo de un preinóculo de 24 h en el mismo medio.

Como controles positivos se emplearon los siguientes compuestos:

Nisaplin ®: Producto comercial cuyo compuesto activo es la nisina, una bacteriocina natural producida por *L. lactis*, con actividad frente a una gran cantidad de bacterias Gram-positivas 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 se emplea en el tratamiento de una amplia gama de infecciones. La kanamicina es producida por la bacteria *Streptomyces kanamyceticus*.

6.6. Detección de los genes de enterocinas

Dentro de la gama de enterocinas reportadas recientemente, las enterocinas A (Aymerich, 1996), B y P son las mejor caracterizadas para la especie de *E. faecium*, mientras que las enterocinas AS-48 y Cyl L y S, para *E. faecalis* (Klocke *et al.*, 2005; Kayser, 2003; Martín-Platero *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2000; Franz *et al.*, 1999). La



mayoría de las enterocinas que han sido caracterizadas tanto bioquímica como molecularmente concluyendo que son bacteriocinas parecidas a pediocinas (Aymerich,

A

Thr Thr His Ser Gly Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val Tyr Cys Thr Lys
 Asn Lys Cys Thr Val Gln Trp Ala Lys Ala Thr Thr Cys Ile Ala Gly
 Met Ser Ile Gly Gly Phe Lys Gly Gly Ala Ile Pro Gly Lys Cys

1996), las cuales comparten regiones conservadas con otras bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas (Fig. 11).

Figura 12. Comparación de secuencias de aminoácidos de bacteriocinas parecidas a pediocinas. A: secuencias de aminoácidos de enterocina A. Los residuos en negritas fueron obtenidos tanto por el análisis de secuencia de ADN como aminoácidos, los demás fueron obtenidos de la secuencia de ADN. B: Alineamiento con otras bacteriocinas parecidas a pediocinas (Drider *et al.*, 2006)

	1	10	20	30	40
Mesentericin Y105	KYYNGVH	CTKSGC	SVNWGEA	AASAGI	HRLANGGNGFW
Leucocin A	KYYNGVH	CTKSGC	SVNWGEA	AFSAGV	HRLANGGNGFW
Leucocin C	KNYNGVH	CTKKG	CSVDWGY	AWTNI	IANN SVMNGLTGGNAGWHN
Mundticin	KYYNGVH	CTKKG	CSVDWGA	IGI	IGNNSAANLATGGAAGWSK
Mundticin KS	KYYNGVH	CTKKG	CSVDWGA	IGI	IGNNSAANLATGGAAGWSK
Sakacin P	KYYNGVH	CGKHS	CTVDWGT	AIGN	IGNNAAANWATGWNAGG
Curvacin A	ARSYNGVY	CNNKK	CWVNRGE	ATQS	IIGMISGWASGLAGM
Piscicolin 126	KYYNGVH	CTKKG	CSVDWGA	IGI	IGNNAAANLATGGAAGWSK
Carnobacteriocin Bm1	ATSYNGVY	CNKEK	CWVNKAEN	KQAIT	IGTIVIGGWASSLAGMGH
Carnobacteriocin B2	VNYNGVH	CSKTK	CSVNWQA	AFQERY	TAGINSFVSGVASGAGSIGRRP
Bavaricin MN	TKYYNGVY	CNSKK	CWVDWGA	AGGIG	QTVVxGWLGAIPGK
Bacteriocin 31	ATYYNGLY	CNKQK	CWVDWKA	SREI	IGKIVNGWVQHGWPAPR
Enterocin P	ATRSYNGVY	CNNSK	CWVNWGEA	KENI	AGIIVISGWASGLAGMGH
Bifidocin B	KYYNGVH	CTGLHD	CRVDRG	KATCG	IINNGGMWGDIG
Sakacin G	KYYNGVH	CTSHG	CSVNWQA	AWTC	CGVNHLANGGHHGVC
Pediocin PA-1	KYYNGVH	CTGKHS	CSVDWGA	KATT	CIINNGAMAWATGGHQGNHKC
Coagulin	KYYNGVH	CTGKHS	CSVDWGA	KATT	CIINNGAMAWATGGHQGNHKC
Enterocin A	TTHSCK	YYNGVY	CTKNK	CTVDWAK	ATTIAGMSIGGFLGGAIPGKC
Divercin V41	KYYNGVH	CTGKHS	CSVNWQA	AFSC	SVSHLANFPGHKC
Plantaricin 423	KYYNGVH	CTGKHS	CSVNWQA	AFSC	GVNVRVATAGHGKX
Plantaricin C19	KYYNGVH	CTGKHS	CSVNWQA	AFSC	GVNVRVATAGHGKX
Listeriocin 743A	KSYYNGVH	CTNKK	CWVDWGA	SAIST	IGNNSAANWATGGAAGWSK
Sakacin 5X	KYYNGVH	CTNKK	CWVDWGA	SAIST	IGNNSAANWATGGAAGWSK
Lactococcin MMFII	TSYNGVH	CTNKK	CWVDWGA	SAIST	IGNNSAANWATGGAAGWSK
Bifidocin B	KYYNGVH	CTGLHD	CRVDRG	KATCG	IINNGGMWGDIG
Consensus	YYNGV	C	C	V	WG A I

Los cebadores utilizados para este ensayo se encuentran reportados en la Tabla 8.

Tabla 8. Cebadores para identificar bacteriocinas de *E. faecalis*

PCR	Cebadores		Tamaño de producto de PCR	Referencia
Enterocina A	<i>entA</i> (D)	5'-AAATATTATGGAAATGGAGTGTAAAT-3'	141 pb	Álvarez-Cisneros, 2011
	<i>entA</i> (R)	5'-GCACTTCCCTGGAATTGCTC-3'		
Enterocina AS-48	<i>as-48-1</i> (D)	5'-AATAAACTACATGGGT-3'	377 pb	Martín-Platero, 2009
	<i>as-48-5</i> (R)	5'-CCAAGCAATAACTGCTCTTT-3'		



Las condiciones de la reacción fueron:

Enterocina A: desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, alineamiento o hibridación 52 °C por 1 min y polimerización o extensión a 72 °C durante 45 s; en todos los casos se realizó una extensión final a 72 °C durante 7 min (Álvarez-Cisneros, 2011).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL usando buffer *Taq+* MgCl₂ (1X), dNTP's (10mM), cebadores *entA D* y *entA R* (0.2mM), 100 ng de ADN de cada muestra y 1U de *Taq* polimerasa (Roche).

AS-48: desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, alineamiento o hibridación 45 °C por 1 min y polimerización o extensión a 72 °C durante 45 s; en todos los casos se realizó una extensión final a 72 °C durante 7 min (Martín-Platero, 2009).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de usando buffer *Taq+* MgCl₂ (1X), dNTP's (10mM), cebadores *as-48-1* y *as-48-5* (0.2mM), 100 ng de ADN de cada muestra y 1U de *Taq* polimerasa (Roche).

Después de la amplificación, los productos de PCR se examinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v), tinción con bromuro de etidio 10%. Los geles fueron examinados en un trasiluminador (Hoefer UVTM).

6.6.1 Pruebas para determinar la actividad de las enterocinas

6.6.1 a) Identificación de la producción de la(s) enterocina(s) a través de la técnica SDS-PAGE

Con el fin de detectar la expresión de los genes que codifican para las enterocinas 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). La obtención de las enterocinas se llevó a cabo mediante la técnica de adsorción-desorción dependiente del pH (Yang *et al.*,



1992), con algunas modificaciones en las condiciones (Álvarez-Cisneros, 2011). Los cultivos (100 mL de fermentación) de 16 h (fase log tardía) de las cepas aisladas y poblaciones que dieron positivo en la detección de los genes de enterocinas fueron sometidos a un calentamiento a 70 °C durante 30 min, para la inactivación de las proteasas (Katla *et al.*, 2003) que pudieran estar presentes. Posteriormente, se ajustó el pH a 5 (NaOH 50 %) y se agitó a 150 rpm durante 4 h a 4 °C para permitir la adsorción del compuesto antimicrobiano a la membrana celular bacteriana. Después, los cultivos se centrifugaron a 10,015 x *g* (Biofuge Primo R, Haereus) durante 20 min a 4 °C y se recuperó el precipitado celular, se lavó dos veces con buffer de fosfatos (5 mM fosfato de sodio, pH 6.5). Finalmente, las células se resuspendieron (5 % del volumen original) en una solución 100 mM de NaCl, pH 2 (ajustada con ácido fosfórico al 5%); este valor de pH favoreció la desorción y liberación de la enterocina desde la membrana celular de las bacterias hacia el medio, además el NaCl en concentración 100 mM durante la extracción previene la aglutinación de las bacteriocinas y que éstas no sean removidas con las células durante la centrifugación (Yang *et al.*, 1992). La preparación de células se agitó a 150 rpm a 4 °C durante 14 h. Posteriormente se sometieron a centrifugación a 10,015 x *g* durante 20 minutos a 4 °C para descartar las células y obtener el sobrenadante con la bacteriocina. Los sobrenadantes se dializaron contra agua destilada empleando membranas de celulosa con un tamaño de poro de 1 kDa (Spectra Por7) y se liofilizó. Los liofilizados se resuspendieron en 30 µL buffer de carga del gel (Tris-HCl 3M/SDS 0.3 % buffer, pH 8.45) y se utilizaron marcadores de peso molecular de polipéptido (SDS-PAGE Standards, Bio-Rad Laboratories). Las condiciones de la electroforesis fueron 80 V durante 5 h a temperatura de refrigeración (4°C).

Las proteínas se tiñeron con nitrato de plata debido a la baja concentración de proteína con la que se contaba. Las imágenes se obtuvieron mediante el uso de un documentador de geles (GelDoc, Bio-Rad) y se calcularon los pesos moleculares aproximados de las proteínas.

6.6.1 b) Identificación de actividad antibacteriana de la(s) enterocina(s)

Para identificar la(s) banda(s) con actividad antibacteriana se utilizaron geles de SDS-Tris-Tricina al 10% con células embebidas con *Listeria innocua* (Colección de cepas del Lab 312, Fac. Química, UNAM) con una D.O. de 8 y *M. lysoidekticus* al 0.2% v/v. De acuerdo al protocolo del Anexo 8.1. Las condiciones de electroforesis y tratamiento del gel son las mismas que las descritas en el punto 6.5.1 b).

6.6.1 c) Ensayo de difusión en agar contra *L. innocua*



Para determinar el efecto antibacteriano de la(s) enterocina(s) se realizaron pruebas de difusión en agar con los sobrenadantes del cultivo, por duplicado. Cultivos de 16 h (fase log tardía) de fermentación se sometieron a un calentamiento a 70 °C por 30 min con el fin de inactivar proteasas y se centrifugaron a 10,015 x g por 15 min. El resto de la metodología se describió en el punto 6.5.1 c) y el microorganismo indicador fue *L. innocua*.

7. Resultados y discusión

7.1 Caracterización bioquímica parcial de las poblaciones de enterococos y cepas aisladas

De cada queso Cotija Región de Origen (Tabla 3) aislaron enterococos con el uso de los medios selectivos EVA y KAA, aunado al uso de la técnica de tinción de Gram y prueba de la catalasa. Lo cual permitió hacer una identificación parcial de dicho género.

El crecimiento en medio EVA fue abundante y positivo dado el cambio de coloración, de amarillo-beige a morado, después de 48 h de incubación (Fig. 13). Se inocularon controles negativos, algunos de ellos cocos Gram-positivos y una bacteria ácido láctica aislada anteriormente del queso Cotija, además de *E. coli*, para asegurar que la microbiota con la que se le relaciona (microorganismo de origen fecal) no pudiera crecer en este medio.

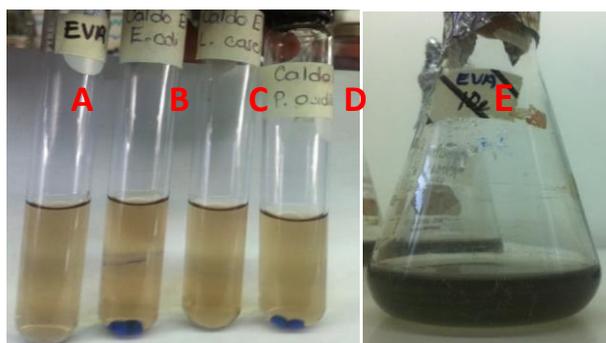


Figura 13. Prueba de selectividad del medio EVA. A: Medio EVA sin inocular; B: Medio EVA con inóculo de *E.coli* DH5 α ; C: Medio EVA con inóculo de *L. casei*; D: Medio Eva con inóculo de *P. acidilactici*; E: Medio EVA con *Enterococcus faecalis*. A, B, C y D no crecen en medio EVA mientras que E muestra un crecimiento característico del género enterococos

Previamente 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, la cual es una resistencia intrínseca y se encuentra codificada en cromosoma. Con estos datos se decidió caracterizar el crecimiento



obtenido en medio EVA con respecto a su resistencia intrínseca a la kanamicina y la ausencia de la enzima catalasa.

Los cultivos en medio EVA, pertenecientes a las 12 muestras de queso Cotija (homogeneizado), se inocularon por agotamiento en medio sólido KAA. Las colonias obtenidas dicho medio lograron hidrolizar la escualina y además se observaron 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 Fe^{2+} , con lo cual se puede de comprobar la presencia de enterococos.

De cada caja de medio KAA, correspondiente a una muestra de queso, se tomaron 20 colonias. Las cuales se inocularon en medio MRS y se realizaron pruebas bioquímicas para confirmar su identidad como enterococos (catalasa negativo, crecimiento a 37 y 45 °C, y 6.5% NaCl (Martín-Platero *et al.*, 2009) (Tabla 9). A partir de este punto se hablará de poblaciones de enterococos para todos los experimentos que se realizaron, tal y como se describió en la metodología (Fig. 9).

Después de un crecimiento de 8 h en medio MRS, donde presentaban una D.O. aproximada de 1.5, se realizó tinción de Gram y prueba de catalasa como parte de la caracterización. Se corroboró una morfología uniforme y la ausencia de la enzima catalasa. Esta enzima tiene la función de convertir el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua (Tabla 10).

Tabla 9. Resultados de capacidad de crecimiento en diferentes condiciones

Población de enterococos	37°C	45°C	6.5 %NaCl
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	+	+
11	+	+	+
12	+	+	+

*Este ensayo se realizó por duplicado



Tabla 10. Caracterización parcial de las poblaciones de enterococos a partir de los cultivo a 37 °C

Población de enterococos	Tinción de Gram	Prueba de catalasa
Queso 1	Cocos en pares y cadenas cortas Gram positivos	Negativo
Queso 2	Cocos en pares y cadenas cortas Gram positivos	Negativo
Queso 3	Cocos en pares y cadenas cortas Gram positivos	Negativo
Queso 4	Cocos en pares y cadenas cortas Gram positivos	Negativo
Queso 5	Cocos en pares y cadenas cortas Gram positivos	Negativo
Queso 6	Cocos en pares y cadenas cortas Gram positivos	Negativo
Queso 7	Cocos en pares y cadenas cortas Gram positivos	Negativo
Queso 8	Cocos en pares y cadenas cortas Gram positivos	Negativo
Queso 9	Cocos en pares y cadenas cortas Gram positivos	Negativo
Queso 10	Cocos en pares y cadenas cortas Gram positivos	Negativo
Queso 11	Cocos en pares y cadenas cortas Gram positivos	Negativo
Queso 12	Cocos en pares y cadenas cortas Gram positivos	Negativo

*Este ensayo se realizó por duplicado

Todas las poblaciones mostraron un crecimiento característico de enterococos al presentar crecimiento en las diferentes condiciones a las que se sometieron y todas se presentan un mismo comportamiento (Tabla 9).

También se evaluó la resistencia al antibiótico vancomicina en diferentes concentraciones ya que es una prueba muy usada en la descripción del género. La resistencia a antibióticos no se considera factor de virulencia, sin embargo nos habla de la capacidad de los microorganismos para sobrevivir o persistir en una infección. Por lo anterior, se aislaron las poblaciones de enterococos, así como las cepas aisladas, por agotamiento en medio MRS adicionado con vancomicina usando la concentración mínima inhibitoria (MIC) recomendada por el Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) que es de 256 µg/mL de medio y una segunda concentración previamente reportada en el grupo de trabajo para caracterizar enterococos (20 µg/mL) (Bravo-Mendoza A., 2008). Los resultados mostraron que ninguna de las poblaciones y cepas aisladas tienen la capacidad de crecer en presencia de las concentraciones evaluadas del antibiótico vancomicina, sin embargo, se tendría que evaluar concentraciones por debajo de los 20 µg/mL para confirmar que no son resistentes.

7.2 Detección de los genes que codifican para factores de virulencia

La extracción de ADN se llevó a cabo con el Kit FAST ID para las 12 poblaciones de enterococos y las 7 cepas de enterococos aisladas y caracterizadas anteriormente en el grupo de trabajo.

Se comenzó el análisis de las 12 poblaciones de enterococos y de las cepas previamente aisladas, con la búsqueda de los genes *cyIA*, *esp* y *asa* a través de PCR-múltiplex. Los tamaños de los amplicones esperados eran de 618 pb, 510 pb y 373 pb respectivamente.



Se decidió identificar el gen *cyIA* que codifica para la proteasa CylA, de todo el operón de citolisinas, debido a que la modificación que otorga a las enzimas CylL_L'' y CylL_S'' es la que determina que tengan actividad de citolisina/bacteriocina. Así como los genes *esp* (proteína de superficie enterococcica) y *asa* (sustancia de agregación), ya que son los implicados en el modelo de sinergismo descrito por Gilmore M. en 2002.

La detección de genes de citolisinas, sustancias de agregación y gelatinasas, entre otros, son muy conocidos por tener un estado de silenciamiento (el gen puede estar presente pero para ser activado se necesita de un sistema de regulación para expresarse), lo que hace más importante su estudio genotípico que una selección fenotípica, debido a que estos genes podrían mantenerse indetectables bajo las condiciones de laboratorio, pero ser expresados *in vivo* y con ello el potencial de patogenicidad de estas cepas puede ser pasado por alto (Martín-Platero *et al.*, 2009).

A pesar de que en este estudio no se diferencia entre las posibles especies de enterococos presentes en las poblaciones, podemos suponer que habrá más de una, teniendo como predominantes a *E. faecalis* y *E. faecium*, ya que son las especies anteriormente identificadas frecuentemente en varios estudios del grupo de trabajo (Bravo, 2008).

Nuestros resultados muestran que sólo 7 de las 12 poblaciones de enterococos analizadas tienen el gen *asa* (1, 2, 3, 5, 7, 11 y 12), mientras que, sólo las poblaciones 2 y 12 presentan el gen *esp*. En el caso de las cepas aisladas, dos cepas de *Enterococcus faecalis* (A e I) y una de *Enterococcus faecium* (B) exhiben el gen para *asa*, además de que la cepa de *Enterococcus faecium* (B) también contiene el gen para la proteína de superficie (Fig. 13). El gen restante, citolisina A (*CylA*), no se detectó (Tabla 11).

Como podemos observar, la intensidad de las bandas muchas veces es muy débil a pesar de que cada reacción contenía 100 ng de ADN/ 25 µL de mezcla de reacción. Con lo anterior podemos inferir que al tratarse de poblaciones de enterococos, donde hay más de una cepa, la señal detectada puede deberse a una cepa que no es predominante y por lo tanto la amplificación no es suficiente para ser detectada en los geles de agarosa.

En este experimento se incluyó una cepa probiótica de *E. faecium* cepa Cernelle 68 (NEOFLOR, pediátrico) la cual dio negativo para todos los genes analizados (no se muestran resultados).

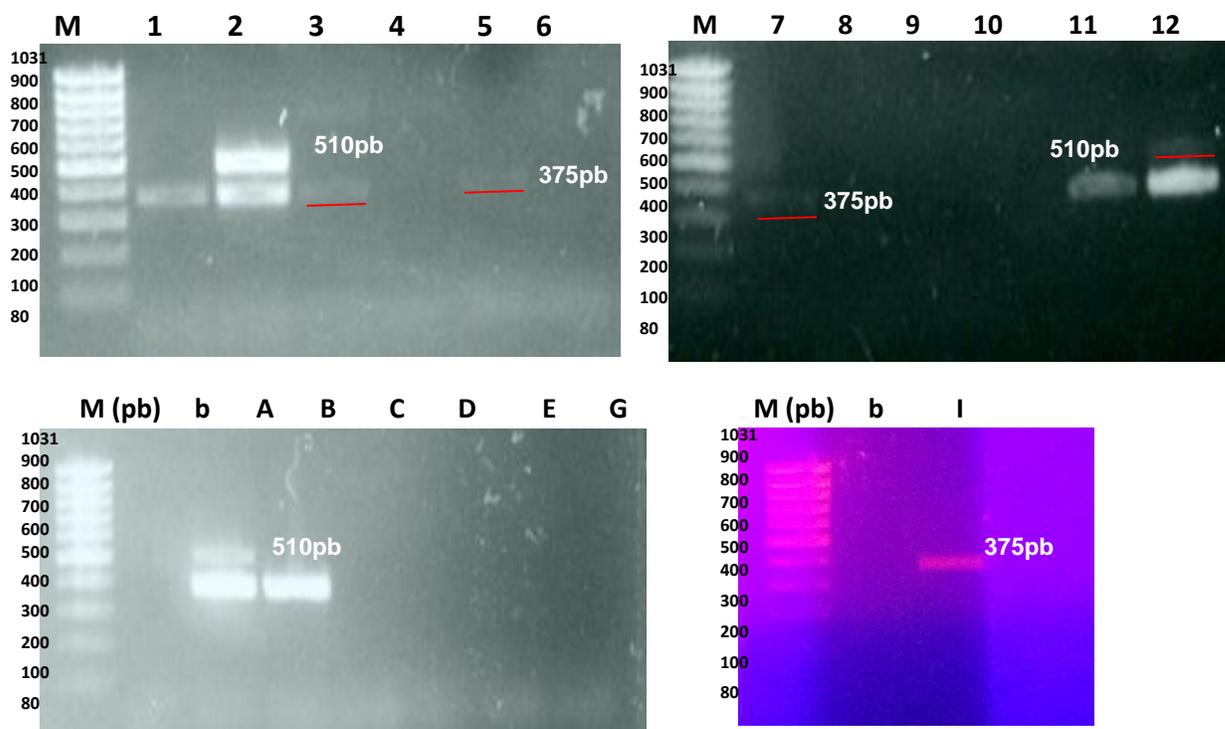


Figura 14. PCR-Multiplex para detectar genes de agregación, proteína de superficie y citolisina. M: Marcador Mass Ruler Low Range; 1-12 poblaciones de enterococos obtenidas de los quesos Cotija. A: *E. faecalis*; B: *E. faecium*; C: *E. faecium*; D: *E. faecalis*; E: *E. faecium*; G: *E. faecium* e I: *E. faecalis* b: blanco de la reacción

La cepa *E. faecalis* NCIMB-700585 se utilizó como control positivo para los genes que codifican para factores de virulencia, ya que se ha reportado presenta los genes *asa*, *cyIMBA*, *gelE*, *cpd*, *ace* y *esp* entre otros (Alvaréz- Cisneros, 2011) (Fig. 15). Sin embargo, no se logró detectar el gen que codifica para el gen *cyIA*, con los cebadores de la técnica de MPCR, por lo que se decidió utilizar los cebadores reportados en dicho trabajo (Tabla 12), con lo que se podría inferir que los cebadores no eran específicos para el gen o bien que alineaban en una región donde las secuencias de las diferentes especies tenía muchas variaciones. Debido a que el amplicón esperado era de 517 pb, un tamaño muy parecido al esperado para el gen *esp* (510 pb), no se realizó MPCR. Una vez detectado el gen *cyIA* en el control positivo (Fig. 15) se evaluó su presencia en cada una de las poblaciones de enterococos y cepas aisladas por PCR uniplex, el resultado fue negativo para todas. En un futuro se podrían secuenciar cada una de las bandas obtenidas con el fin de asegurar con mayor fiabilidad que se trata de los genes que estamos tratando de identificar.

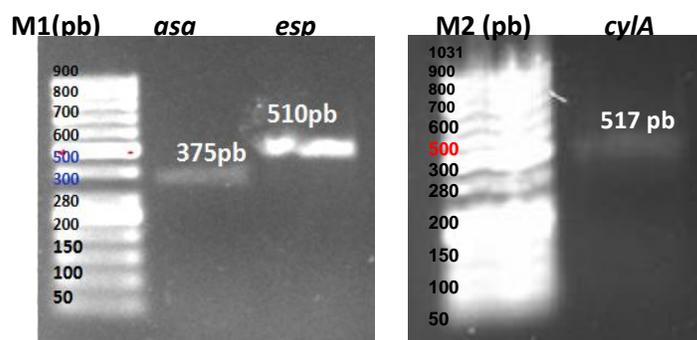


Figura 15. PCR-uniplex. Control positivo *E. faecalis* NCIMB-700585. M: marcador Gene Ruler 50 bp DNA ladder. .asa: gen *asa* con un tamaño de 375 pb. esp: gen *esp* con un tamaño de 510 pb. M2: marcador Gene Ruler 50 bp DNA ladder. *cyIA*: gen *cyIA* con un tamaño de 517 pb

Tabla 11. Resultados de PCR-Multiplex para detección de los factores de virulencia

	Sustancia de agregación (375 pb)	Proteína de superficie (510 pb)	Citolisina A (618 pb)
Población Q1	+	-	-
Población Q2	+	+	-
Población Q3	+	-	-
Población Q4	-	-	-
Población Q5	+	-	-
Población Q6	-	-	-
Población Q7	+	-	-
Población Q8	-	-	-
Población Q9	-	-	-
Población Q10	-	-	-
Población Q11	+	-	-
Población Q12	+	+	-
<i>E. faecalis</i> A	+	+	-
<i>E. faecium</i> B	+	-	-
<i>E. faecium</i> C	-	-	-
<i>E. faecalis</i> D	-	-	-
<i>E. faecium</i> E	-	-	-
<i>E. faecium</i> G	-	-	-
<i>E. faecalis</i> I	+	-	-
<i>E. faecium</i> NEOFLOR	-	-	-

Tabla 12. Cebadores utilizados para la detección del gen *cyIA*

Gen	Cebador	Tm	Tamaño del amplicón
<i>cyIA</i> F (Sigma)	5'-TGG ATG ATA GTG ATA GGA AGT-3'	54°C	517 pb
<i>cyIA</i> R (Sigma)	5'-TCT ACA GTA AAT CTT TCG TCA-3'		

Franz y colaboradores en el 2001 hicieron un análisis de incidencia de factores de virulencia en 95 cepas de enterococos aisladas de diversos productos alimenticios, donde reportan que la actividad hemolítica parece estar ligada con la producción de sustancias de agregación (presencia del gen *asa*) en cepas *E. faecalis* positivas para el gen *hly* (actividad hialorunidasas). Así bien, la producción de hemolisinas y sustancias de agregación es conocida por estar ligada a la presencia del plásmido de respuesta a feromonas (85 % de cepas hemolíticas). Dentro de sus resultados, sólo una de las cepas de *E. faecium* es productora de la proteína de superficie Esp, mientras que 17 cepas de *E. faecalis* (36.2 %) son positivas para dicho gen. En contraste, dentro de nuestros



resultados, ninguna cepa de *E. faecalis* resultó positiva para el gen *esp*, mientras que una cepa de *E. faecium* (cepa B) sí lo es. Aunque dos de las poblaciones resultaron positivas, no se puede atribuir a una especie en particular, ya que no se identificaron. Además de su papel importante en adhesión, la proteína de superficie Esp también está relacionada con la evasión de la respuesta inmune, por lo que algunos autores consideran indeseable el uso de enterococos, que poseen dicha proteína, como cultivos iniciadores (Eaton y Gasson, 2001).

La sustancia de agregación es considerada un factor de virulencia importante ya que uno de cada tres aislados clínicos de *E. faecalis* es portador del plásmido de respuesta a feromonas (sistema de transferencia de ADN por conjugación en Gram-positivos), lo que lo hace altamente conjugable y por tanto transmisible a cepas receptoras. En nuestro estudio, la presencia de sustancia de agregación es común dentro de las poblaciones de enterococos. Dos cepas de *E. faecalis* y una de *E. faecium* poseen dicho gen, esto último no concuerda con lo reportado por Franz y colaboradores en el 2001 ya que ninguna de las cepas de *E. faecium* que analizaron presentan el gen *asa*, lo cual para ellos no es sorprendente, ya que esto se justifica con el hecho de que el plásmido de respuesta a feromonas (relacionado con la expresión de *asa*) generalmente se asocia a *E. faecalis*. Por su parte Eaton y Gasson en el 2001 demostraron que el 67% de las cepas de *E. faecalis* aisladas de alimentos producen la sustancia de agregación relacionada al gen *asa* (Franz *et al.*, 2001).

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

7.2.1 Pruebas presuntivas para expresión de genes de virulencia

7.2.1 a) Actividad hemolítica

Se realizó la prueba de hemólisis en agar sangre al 4 % usando como control positivo a *Streptococcus pyogenes*. En ninguna de las poblaciones y tampoco para las cepas aisladas se presentó actividad hemolítica (Fig. 16). En este ensayo se evaluó la probable actividad hemolítica de la cepa *E. faecalis* NCIMB-700585, dado que es positivo para el gen *cylA*, sin embargo no se detectó actividad con lo que se puede inferir que



probablemente no se encuentre el operón completo de síntesis de las citolisinas y que las proteínas con actividad hemolítica no se estén produciendo (CylL y CylS).

En la búsqueda de un control positivo, se ensayaron varias cepas de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *E. casseliflavus* de aislados clínicos proporcionadas por el laboratorio del Programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina, no obstante ninguna de ellas presentó un fenotipo positivo para actividad hemolítica.

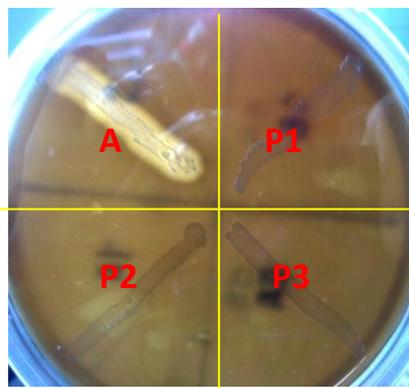


Figura 16. Ejemplo de prueba de hemólisis en agar sangre. A: Control positivo a *Streptococcus pyogenes*. P1, 2 y 3: poblaciones de los quesos 1, 2 y 3

El género enterococos se caracteriza por presentar actividad γ - o α -hemolítica, es decir, ausencia de dicha actividad o en muy pocos casos parcial. Los pocos reportes que se tienen pertenecen a la especie de *E. faecalis* (Gilmore, 2002).

Franz y colaboradores en el 2001 reportaron que dentro de las especies *E. faecium* y *E. faecalis* (aisladas de alimentos), algunas presentan actividad de β -hemólisis, siendo *E. faecalis* la de mayor incidencia en este rasgo, con un 21.3 %, mientras que sólo el 8.3 % de *E. faecium* fue positivo. Otros reportes presentan valores mas elevados para la incidencia de dicha actividad, teniendo un 44 % para *E. faecalis*, también aislado de alimentos (Eaton y Gasson, 2001). En contraste, Eaton y Gasson reportan que las cepas de *E. faecium* no presentan actividad de citolisina (hemólisis). Interesantemente, en nuestros resultados, ninguna de las poblaciones y cepas aisladas muestra dicha actividad.

En otro estudio realizado a partir de cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* aisladas de alimentos artesanales turcos, se observó que aunque algunas de las cepas presentaban los genes *cylA*, *cylM* y *CylB*, ninguna mostró actividad β -hemolítica en placas de agar con sangre de carnero (Özmen *et al.*, 2010).



Como se mencionó anteriormente, la actividad hemolítica tiene un papel importante en la virulencia del género enterococos, ya que podría incrementar la severidad de una infección (Franz *et al.*, 2001).

7.2.1 b) Formación de biopelículas

Los microorganismos tienden a formar comunidades a través de biopelículas como una de las más importantes estrategias de supervivencia a diferentes ambientes. Las biopelículas consisten de células y un amplio rango de sustancias poliméricas extracelulares generadas por los microorganismos (polisacáridos, proteínas extracelulares y ácidos nucleicos libres). La formación de biopelículas es un proceso dinámico, el cual está coordinado por la interacción entre las células microbianas presentes en el consorcio (Yang *et al.*, 2011). La capacidad de formación de biopelículas es una propiedad común de cepas de *E. faecalis* aislados de diferentes fuentes (Cebrián R. *et al.*, 2012).

Basados en nuestros resultados, podemos ver que aunque sólo dos poblaciones de enterococos y una cepa aislada presentan el gen *esp*, casi todas las muestras analizadas tienen la capacidad de formar biopelículas en una superficie abiótica (Fig. 17). Con lo que se podría inferir que varias adhesinas de enterococos pueden estar involucradas con la formación de biopelículas, no sólo proteína de superficie *Esp*. Sin embargo, sólo 4 de las poblaciones (1, 3, 11 y 12), así como las cepas A y E (Tabla 13) tienen la habilidad de formar biopelículas bien estructuradas definidas por una $DO_{620} \geq 0.22$.

Esta capacidad puede ser controversial. La presencia del género enterococos en el tracto gastrointestinal capaz de sintetizar la proteína de superficie enterocócica puede ser considerado positivo, ya que, al cubrir los receptores epiteliales, las biopelículas pueden prevenir la colonización de otros microorganismos patógenos. No obstante, esta característica ha sido fuertemente correlacionada con la promoción de la unión primaria y la formación de biopelículas sobre superficies abióticas.



Tabla 13. Detección de formación de biopelículas por *Enterococcus* spp. en placas de poliestireno medida por absorbancia a 620nm

Muestra	Abs 620 nm	Muestra	Abs 620 nm
Población 1	0.251	Cepa A	0.277
Población 2	0.083	Cepa B	0.045
Población 3	0.245	Cepa C	0.144
Población 4	0.097	Cepa D	0.123
Población 5	0.073	Cepa E	0.458
Población 6	0.122	Cepa G	0.039
Población 7	0.097	Cepa I	0.093
Población 8	0.035		
Población 9	0.010		
Población 10	0.003		
Población 11	0.225		
Población 12	0.673		

Una D.O.>0.22 se considera una biopelícula bien estructurada. Como control positivo se usó una cepa de *E.faecalis* NCIMB-700585 (no se muestran los datos). Este ensayo se realizó por duplicado.

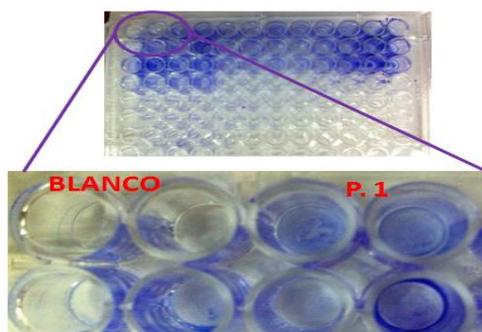


Figura 17. Placa de polipropileno donde se observa la formación de biopelículas en el fondo de cada pozo. Tinción con violeta de etilo

7.2.1 c) Ensayo de adherencia a dos líneas celulares

Se comprobó la capacidad de adherencia de las 7 poblaciones de enterococos que dieron positivas para la presencia de sustancias de agregación, así como para las 3 cepas aisladas, a través de ensayos de adherencia en células epitelial derivadas de adenocarcinoma colorectal (Caco-2) y de adenocarcinoma de colon humano grado II (HT-29) (Tablas 14 y 15).



7.2.1 c) Ensayo de adherencia en línea celular Caco-2

En la figura 18 A se muestra el control de células Caco-2, las cuales se encuentran enteras, y formando una monocapa uniforme (confluencia del 100%). *E. coli* 2348/69 con un patrón de adherencia localizada, se utilizó como control positivo. En la figura 18 B podemos observar bacilos delgados dispersos sobre la monocapa, en algunas ocasiones se puede observar daño a las células epiteliales por la formación de “vacuolas” dentro de las mismas.

Debido a que no se han descrito patrones de adherencia para el género enterococos, los resultados serán reportados en comparación con los presentados por *E. coli* (adherencia difusa, agregativa y localizada) (Tabla 14). En el caso de las poblaciones de enterococos se pueden observar diversos patrones de adherencia, esto podría deberse a la presencia de más de una cepa, sin embargo, en cepas aisladas se tiene este mismo fenómeno.

Para definir si una cepa es adherente o no, se utilizó el siguiente criterio: se contaban 10 células y si en más del 50% de ellas había un número mayor a 10 de células bacterianas se consideraba adherencia positiva (Eslava-Campos, comunicación oral).

Tabla 14. Descripción de los ensayos de adherencia en línea celular Caco-2

Muestra	Descripción	Tipo de adherencia
Control de células CaCo-2	Células enteras. La monocapa está intacta (confluente), es decir, se ven huecos entre las células y la mayoría se encuentran formando agregados. La forma de la células es elíptica, grandes y algunas de forma circular	
BAL 25245	Bacterias, cocos en pares y cadenas cortas, distribuidas de forma más aleatoria y alrededor de toda la célula y no en un solo punto. Las células no presentan daño aparente, están completas y ligeramente más pequeñas.	Adherencia similar a la difusa de <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i> 2348/69	Bacilos delgados y cortos que forman grupos de bacterias en puntos específicos.	Adherencia localizada
Población de enterococos 1	Bacterias, cocos en pares y cadenas cortas, dispersas a lo largo de la monocapa, aunque en algunas ocasiones se muestran agregados en puntos específicos y otras formando estructuras parecidas a “paredes de tabiques” rodeando las células, muchas adheridas a la lenteja de plástico (glucocalix, proteínas de membrana, exopolisacáridos, cápsula). Las células están intactas. Se notan restos celulares, aunque las células no se visualizan dañadas.	Adherencia similar a la difusa, agregativa y localizada de <i>E. coli</i>



Población de enterococos 2	Pocas bacterias, cocos en pares y aisladas, presentando una adherencia muy pobre sobre las células.	Adherencia similar a la difusa, agregativa y localizada de <i>E. coli</i>
Población de enterococos 3	Bacterias, cocos en pares y cadenas cortas y algunas largas, dispersos por toda la monocapa. En algunas ocasiones se encuentra en sitios específicos formando agregados.	Adherencia similar a la difusa y localizada de <i>E. coli</i>
Población de enterococos 5	Bacterias, cocos en pares y cadenas cortas, rodeando las células y en la mayoría de los casos de forma dispersa sobre toda la monocapa. La presencia de bacterias es muy variable según el campo que se observe.	Adherencia similar a la difusa y agregativa de <i>E. coli</i>
Población de enterococos 7	Pocas bacterias, en su mayoría cocos en cadenas, dispersas por toda la monocapa. No se observa daño en la célula, sólo ligera reducción en el tamaño.	Adherencia similar a la difusa de <i>E. coli</i>
Población de enterococos 12	Bacterias, cocos en pares y cadenas cortas, presentando dos patrones de adherencia parecidos a los de <i>E. coli</i> , Se ven bacterias dispersas por toda la monocapa y en algunas ocasiones en sitios específicos formando agregados.	Adherencia similar a la difusa y localizada de <i>E. coli</i>
Cepa A	Bacterias, cocos en pares y cadenas cortas, presentando dos patrones de adherencia parecidos a los de <i>E. coli</i> , Se ven bacterias dispersas por toda la monocapa y en algunas ocasiones en sitios específicos formando agregados. Las células se ven más pequeñas en comparación con las demás preparaciones.	Adherencia similar a la difusa y localizada de <i>E. coli</i>
Cepa B	Bacterias, cocos en pares y cadenas en su mayoría largas, formando agregados en puntos específicos, en algunas ocasiones se notas a lo largo de toda la monocapa.	Adherencia similar a la difusa y localizada de <i>E. coli</i>
Cepa I	Bacterias, cocos en pares y cadenas cortas, presentando dos patrones de adherencia parecidos a los de <i>E. coli</i> , Se ven bacterias dispersas por toda la monocapa, principalmente en citoplasma, y en algunas ocasiones en sitios específicos formando agregados. Las células se ven más pequeñas en comparación con las demás preparaciones. En algunas ocasiones se encuentran entre los espacios extracelulares lo que podría indicar interacciones de tipo hidrofóbicas con la lenteja donde se encuentran adheridas las células CaCo-2.	En su mayoría adherencia similar a la difusa y algunas con adherencia similar a localizada de <i>E. coli</i>

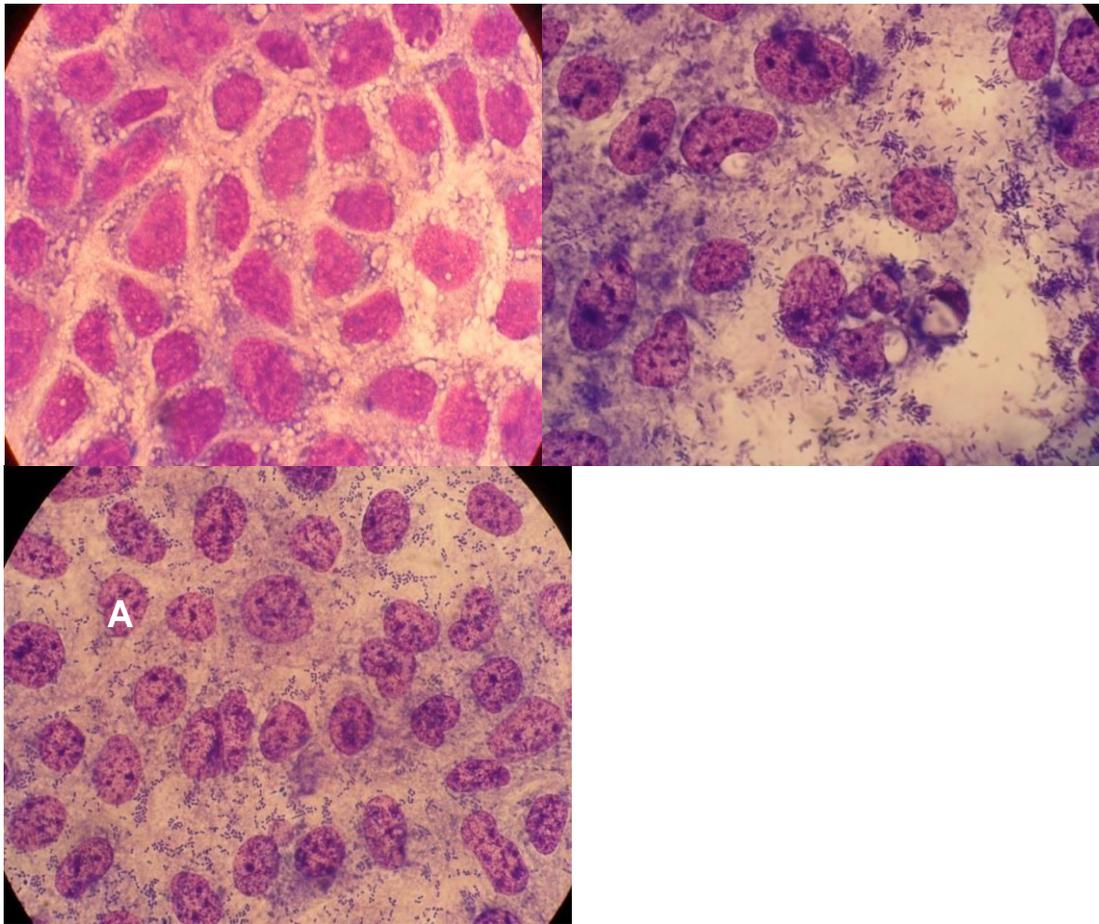


Figura 18. Ensayo de adherencia de línea celular Caco-2. A: control de células; B: Control positivo *E. coli* 234869 (adherencia localizada); C: Población de enterococos 5 con diversos patrones de adherencia: agregativa y difusa. Este ensayo se realizó por duplicado

7.2.1 d) Ensayo de adherencia en línea celular HT-29

En esta línea celular también se observó la capacidad de adherencia para las 7 poblaciones y las 3 cepas aisladas que tienen el gen *asa*.

En la figura 19 A se muestra el control de células HT-29, las cuales se encuentran enteras, y formando una monocapa casi uniforme (confluencia del 85%). *E. coli* 49766-042 con un patrón de adherencia agregativa, se utilizó como control positivo. En la figura 19B podemos observar bacilos delgados alrededor de las células, en forma de tabiques. En la Tabla 15 se describen los resultados de los ensayos de adherencia, al observar al microscopio.



Tabla 15. Descripción de los ensayos de adherencia en línea celular HT-29

Muestra	Descripción	Tipo de adherencia
Control de células HT-29	Células enteras. La monocapa no confluyente. La forma de las células es elípticas y algunas de forma circular.	
BAL 25245	Bacterias, cocos en pares y cadenas, entre los espacios. extracelular y algunas adheridas a las células	Adherencia similar a la difusa de <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i> 4976 6042	Bacterias, bacilos delgados, alrededor de las células formando capas en forma de ladrillos/tabiques.	Adherencia agregativa
Población de enterococos 1	Bacterias, cocos en pares y cadenas largas y cortas, adheridas a la célula en un patrón similar al observado en el control de <i>E. coli</i> (tabiques), al mismo tiempo también se observan algunas bacterias dispersas por toda la monocapa.	Adherencia similar a difusa/ agregativa de <i>E. coli</i>
Población de enterococos 2	Pocas bacterias, cocos en pares y cadenas cortas, adheridas alrededor y en el centro de las células.	Adherencia similar a la difusa de <i>E. coli</i>
Población de enterococos 3	Muchas bacterias, cocos en pares y cadenas, dispersas a lo largo de toda la monocapa, alrededor de la célula y en algunos caso situadas en forma de agregados en lugares específicos.	Adherencia similar a la difusa, agregativa y localizada de <i>E. coli</i>
Población de enterococos 5	Bacterias, cocos en pares y cadenas cortas, formando agregados situados en el centro de las células y en otras ocasiones en el contorno de la misma. Las células, en algunos campos, se encuentran apelmazadas.	Adherencia similar a la agregativa y localizada de <i>E. coli</i>
Población de enterococos 7	Bacterias, cocos en pares y cadenas cortas, rodeando las células y en algunos casos en el centro de las mismas. Así bien, se puede observar cúmulos de bacterias en sitios específicos.	Adherencia similar a la difusa, agregativa y localizada de <i>E. coli</i>
Población de enterococos 11	Muchas bacterias, cocos en pares y cadenas, rodeando	
Población de enterococos 12	Células menos abundantes, adherencia en forma de cadenas. Agregados de células, la monocapa de células HT-29 no era confluyente ya que presentaba un posible desprendimiento, característico de esta línea celular. Bacterias, cocos y pares, con un patrón similar a difusa. Células menos teñidas que en Caco-2. Algunas bacterias alrededor de las células y otras en el cristal formando cúmulos.	Adherencia similar a la difusa de <i>E. coli</i>
Cepa A	Bacterias, cocos en pares y cadenas cortas, rodeando las células y en algunos casos en el centro de las mismas. Así bien, se puede observar cúmulos de	Adherencia similar a la difusa, agregativa y localizada de <i>E. coli</i>



	bacterias en sitios específicos variables	
Cepa B	Bacterias, cocos en pares y cadenas largas y cortas, adheridas a la célula en un patrón similar al observado en el control de <i>E. coli</i> (tabiques), al mismo tiempo también se observan algunas bacterias dispersas por toda la monocapa.	Adherencia similar a difusa/ agregativa de <i>E. coli</i>
Cepa I	Bacterias, cocos en pares y cadenas cortas, distribuidas a los largo de toda la preparación, principalmente en la periferia, algunas se encuentran en el centro de las mismas. Al hacer el cambio del tornillo micrométrico se visualizan muchas más bacterias.	Adherencia similiar a la difusa de <i>E. coli</i>

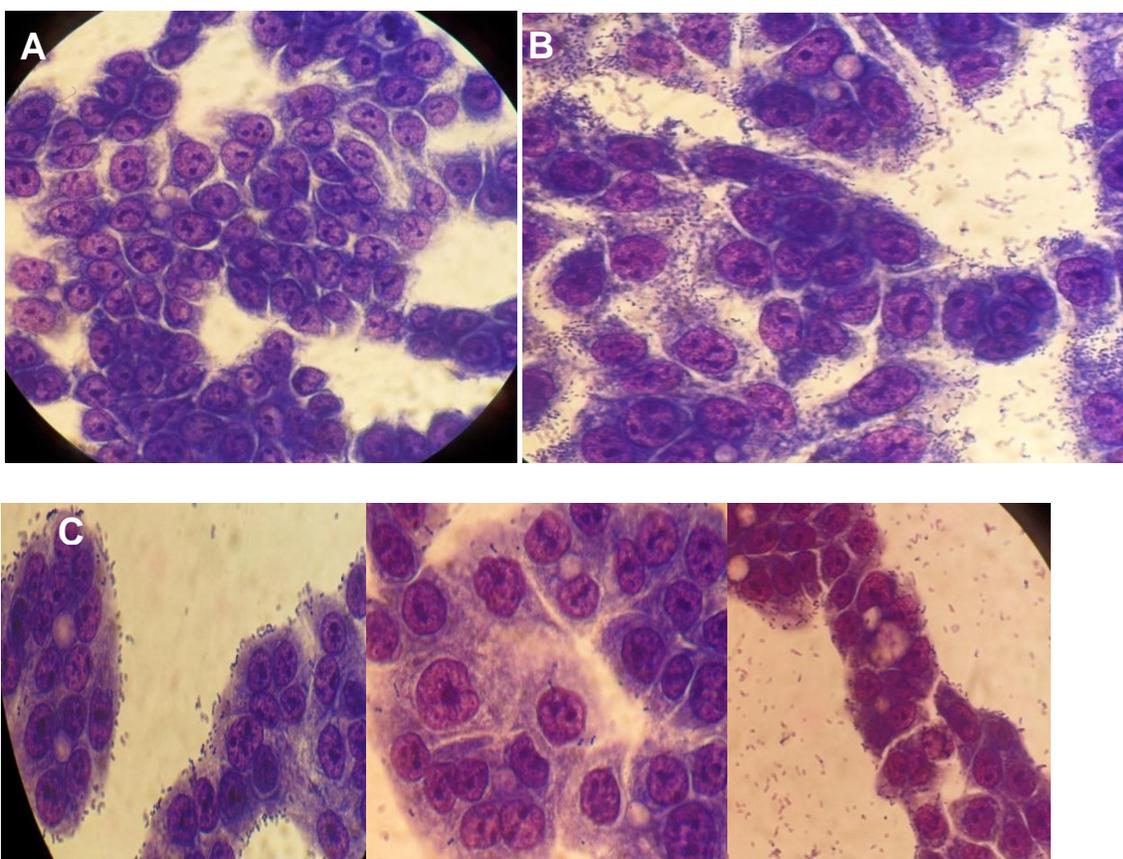


Figura 19. Ensayo de adherencia de línea celular HT-29. A: control de células; B: Control positivo *E. coli* 49766-042 (adherencia agregativa); C: Población 1 de enterococos, Cepa I, Cepa A con diferentes patrones de adherencia



A pesar de que las sustancias de agregación, factor relacionado con la adherencia al hospedero, confieren hasta un orden de magnitud de incremento en la internalización en epitelio, aproximadamente tres órdenes de magnitud de diferencia se observaron entre diferentes *E. faecalis* hospederos independientemente de la sustancia de agregación. Esto indica que factores adicionales contribuyen a una mayor habilidad de *E. faecalis* para resistir o activar la internalización a células epiteliales (Gilmore, 2002).

7.3 Detección del gen que codifica para peptidoglucano hidrolasa AtIA

Dentro del grupo de trabajo se ha encontrado una cepa de *E. faecalis* con actividad antibacteriana contra una amplia gama de microorganismos, la cual está conferida por la peptidoglucano hidrolasa AtIA (PGH) (Olvera-García, 2010; Serrano, 2010). Por lo tanto, en este estudio se pretendía dilucidar la presencia de esta enzima, con el fin de saber si es común su producción por cepas de enterococos presentes en el queso Cotija. Sin embargo, nuestros resultados muestran que sólo dos de las poblaciones analizadas presenta el gen *atlA* (población 1 y 2) y sólo una de las cepas aisladas (*E. faecium* B) (Fig. 20). Nuevamente observamos que las bandas son muy débiles, probablemente la cepa que contiene dicho gen se encuentra en muy baja proporción. Sin embargo, la cepa B también presenta una banda muy débil, lo que estaría indicando que el gen es muy grande y la polimerasa no podría completar de forma correcta todo el gen.

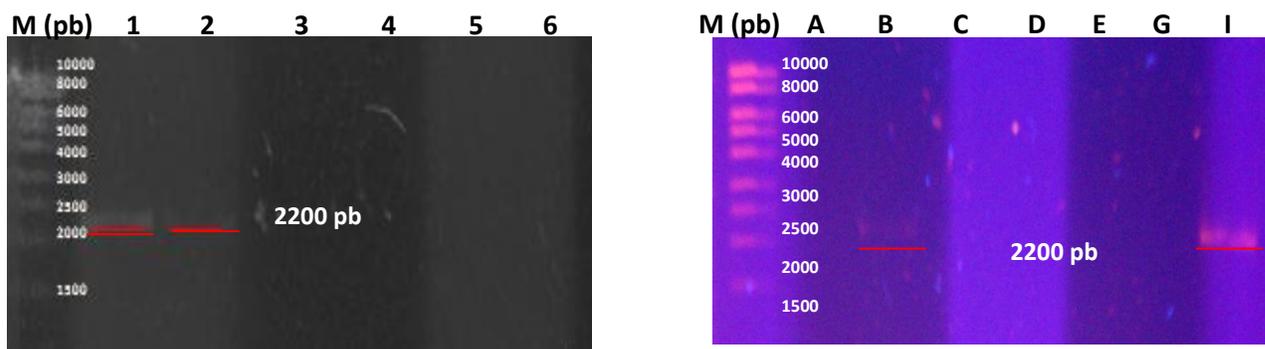


Figura 20. PCR para la detección de *atlA* (2200 pb). M: Marcador Mass Ruler High Range; 1-6 poblaciones de enterococos obtenidas de los quesos Cotija. No se muestran las poblaciones 7-12 dado que son negativas para el gen. A: *E. faecalis*; B: *E. faecium*; C: *E. faecium*; D: *E. faecalis*; E: *E. faecium*; G: *E. faecium* e I: *E. faecalis* (**Control positivo** del experimento) b: blanco de la reacción. Este ensayo se realizó por duplicado



7.3.1 Pruebas para evaluar la actividad de PGH

7.3.1 a) Perfil electroforético de proteínas extracelulares y zimigrafía

A pesar de que ninguna de las poblaciones presentó el gen perteneciente a la peptidoglucano hidrolasa AtIA, se realizaron geles SDS-PAGE y zimografía para conocer si producían alguna otra enzima con actividad lítica.

Como se puede observar el patrón de bandeo de las proteínas extracelulares es muy parecido entre las diferentes muestras a excepción de las poblaciones 1 y 6. La población 1 presenta bandas muy intensas a los 60-65 kDa, mientras que la población 6 muestra una banda a los 114 kDa aproximadamente (Fig. 21).

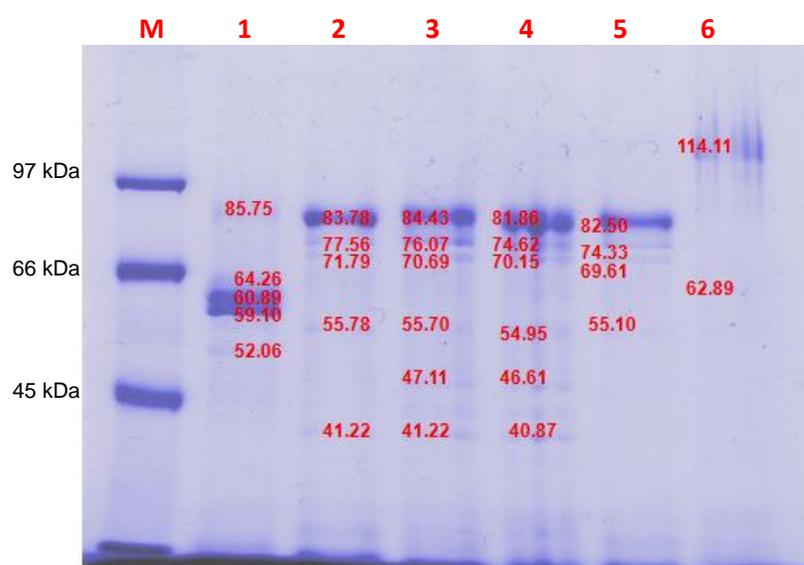


Figura 21. Gel de poliacrilamida SDS- Tris-Glicina al 10 %. Sobrenadantes precipitados con TCA. M: marcador de peso molecular alto (SDS-PAGE Standards. High Range). 1-6 poblaciones de enterococos de las muestras de queso Cotija. Este ensayo se realizó por duplicado

El siguiente zimograma contra *M. lysodeikticus* (Fig. 22) nos permite observar la actividad bacteriolítica de los extractos precipitados con TCA pertenecientes a las poblaciones de enterococos 1 a la 5, con bandas de actividad a los 85.75 KDa (1) y 70 KDa (2-5) aproximadamente. De tal modo se comprobó que sí hay actividad antibacteriana y que está dada por la presencia de proteínas extracelulares.

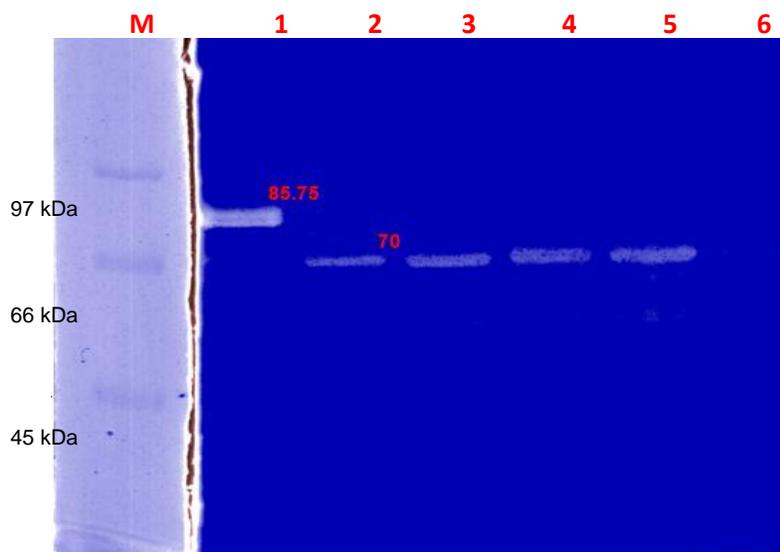


Figura 22. Gel de poliacrilamida SDS- Tris-Glicina al 10 % contra el microorganismo indicador *Micrococcus lysodeikticus*. Sobrenadantes precipitados con TCA. M: marcador de peso molecular alto para proteínas (SDS-PAGE Standards, High Range). 1-6 poblaciones de enterococos de las muestras de queso Cotija

Al observar el perfil electroforético de las proteínas extracelulares de las poblaciones 7, 8, 9, 10, 11 y 12 se puede ver que también son muy similares, con bandas representativas a los 80 kDa aproximadamente (Fig. 23). Dichas bandas también están presentes en el extracto de la cepa I (cepa control positivo)

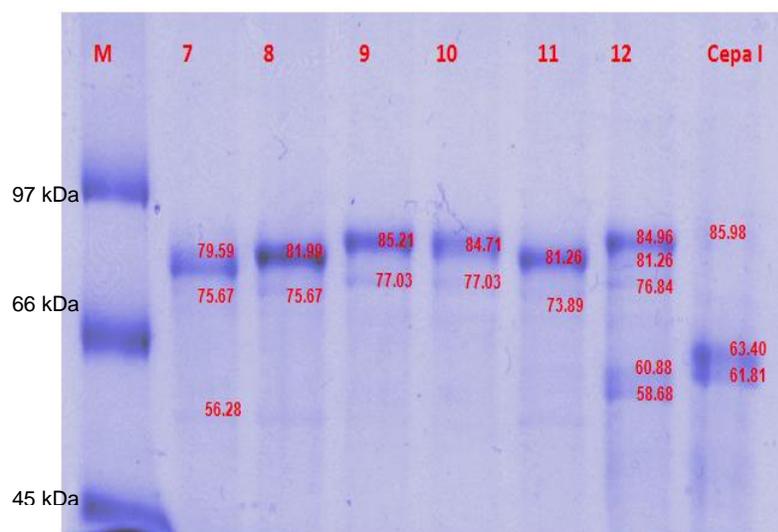


Figura 23. Gel de poliacrilamida SDS- Tris-Glicina al 10 %. Sobrenadantes precipitados con TCA. M: marcador de peso molecular alto (SDS-PAGE Standards, High Range). 7-12 poblaciones de enterococos de las muestras de queso Cotija; I: *E. faecalis* (cepa control positivo)



En el gel de actividad lítica contra *M. lysodeikticus* se puede ver que las poblaciones 7 a la 10 presentan una banda de actividad lítica a los 75 kDa aproximadamente, mientras que la población 11 a los 80 kDa. Por su parte, la población 12 comparte una banda de actividad lítica a los 85 kDa con la cepa I y presenta otras dos a los 80 y 76 kDa (Fig. 24). Esto último es de gran interés ya que a pesar de que la población 12 presenta bandas con un peso molecular similar a la cepa control (cepa I), probablemente se trata de proteínas diferentes ya que mediante la PCR, dicha población no fue positiva para la presencia del gen de *atlA* que codifica para la PGH con actividad N-acetilglucosaminidasa, sin embargo, no se puede asegurar por completo que la PCR sea negativa.

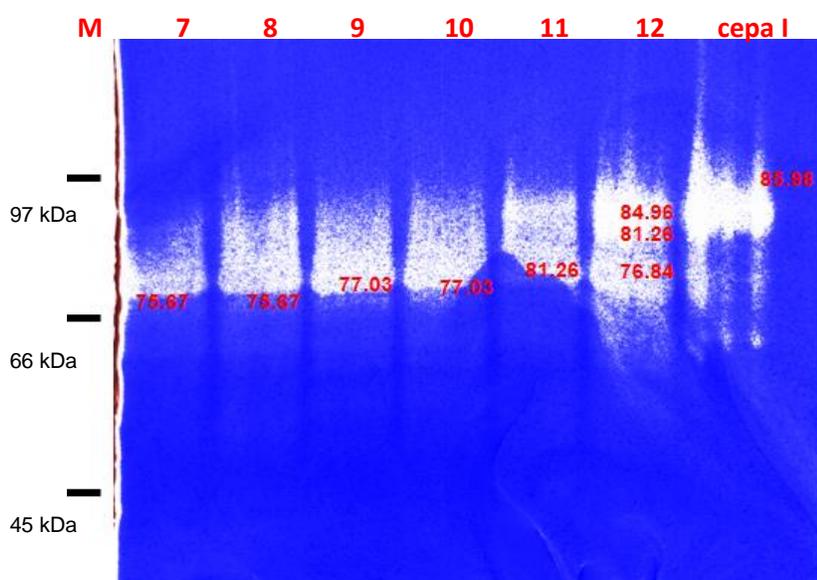


Figura 24. Gel de poliacrilamida SDS- Tris-Glicina al 10% contra el microorganismo indicador *Micrococcus lysodeikticus*. Sobrenadantes precipitados con TCA. M: marcador de peso molecular alto (SDS-PAGE Standards, Low Range). 7-12 poblaciones de enterococos de las muestras de queso Cotija; I: *E. faecalis* (cepa control positivo)

El perfil electroforético de los extractos extracelulares de las cepas aisladas muestra un patrón bastante parecido, con bandas similares a los 84 kDa, para las cepas A, B, C, D e I; así como bandas a los 48, 55 y 60 kDa en todas las cepas (Fig. 25)

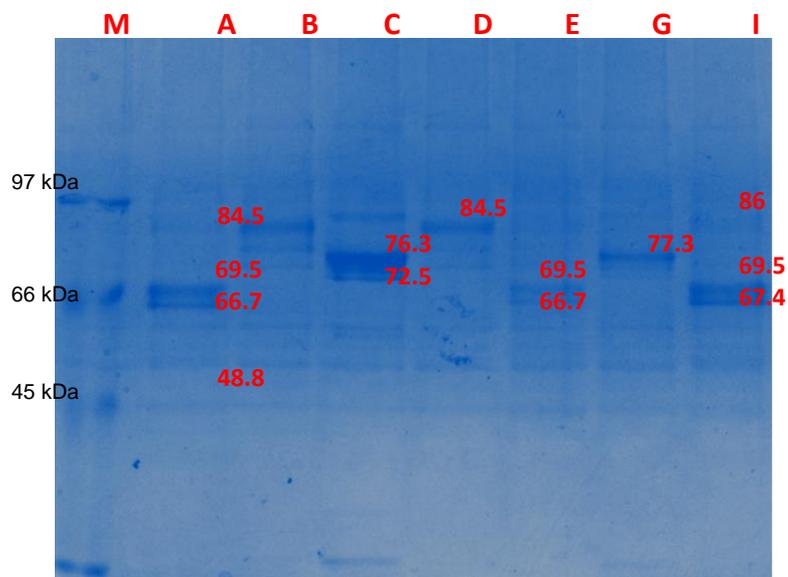


Figura 25. Gel de poliacrilamida SDS- Tris-Glicina al 10%. Sobrenadantes precipitados con TCA. M: marcador de peso molecular alto (SDS-PAGE Standards, High Range). A: *E. faecalis*; B: *E. faecium*; C: *E. faecium*; D: *E. faecalis*; E: *E. faecium*; G: *E. faecium* e I: *E. faecalis* (cepa control positivo)

En el gel de actividad se pueden ver bandas de actividad lítica a los 86 kDa para las cepas E e I, sin embargo el análisis de PCR, para la cepa E no muestra el gen que codifica para la PGH AtIA. El resto de las cepas muestra una banda de actividad a los 75 kDa. Dentro de los resultados de PCR, la cepa B fue positiva para la presencia del gen *atIA*, y al igual que la reportada por Eckert *et al.* en 2006, se observa una banda a los 75 kDa aproximadamente (Fig. 26).

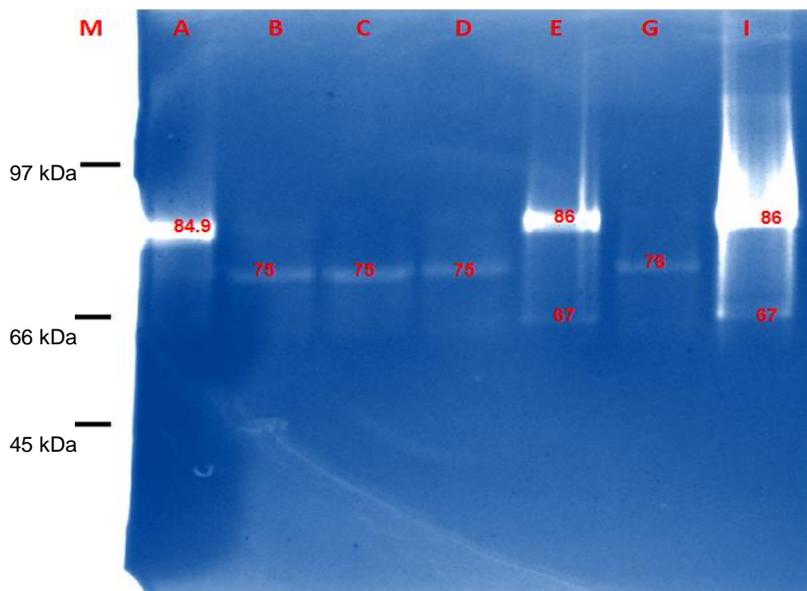


Figura 26. Gel de poliacrilamida SDS- Tris-Glicina al 10% contra el microorganismo indicador *Micrococcus lysodeikticus*. Sobrenadantes precipitados con TCA. M: marcador de peso molecular alto (SDS-PAGE Standards, Low Range). A: *E. faecalis*; B: *E. faecium*; C: *E. faecium*; D: *E. faecalis*; E: *E. faecium*; G: *E. faecium* e I: *E. faecalis* b: blanco de la reacción



En la siguiente figura (27) se presentan los gels de actividad lítica de las poblaciones y cepa aislada que fueron positivas para la presencia del gen de la PGH. Como podemos observar la población 1 tiene una banda de 85.7 kDa con actividad lítica, con un peso muy parecido a la producida por la cepa control. Así bien, para el caso de la cepa B y la población 2 la banda de actividad lítica tiene un peso de 70-75 kDa, que igualmente podría concordar con la segunda banda presente en el carril de la cepa control (Fig. 26). Lo anterior estaría indicando que la proteína producida tiene algún tipo de modificación post-traducciona, como son las glicosilaciones, que si bien no son comunes en bacterias, sí se han reportado. Por ejemplo, se ha reportado que *E. faecium* presenta dos hidrolasa autolíticas (PGH): una 1-muramidasa, la cual es una 1,4-N-acetilmuramidasa con una forma activa de 87 kDa y una 2-muramidasa, la cual tiene dos formas activas a 125 y 75 kDa. Estas dos autolisinas difieren en especificidad por sustrato, masa molecular y mecanismos de hidrólisis (Béliveau *et al.*, 1991)

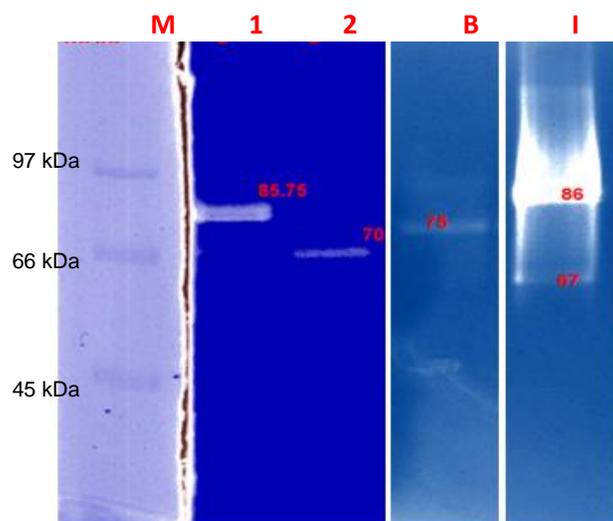


Figura 27. Imagen comparativa. Gel de poliacrilamida SDS- Tris-Glicina al 10% contra el microorganismo indicador *Micrococcus lysodeikticus*. Sobrenadantes precipitados con TCA. M: marcador de peso molecular alto (SDS-PAGE Standards, Low Range). 1: Población 1; 2: Población 2; B: *E. faecium*; I: *E. faecalis* (cepa control). Figura comparativa de las poblaciones y cepa aislada positivas para el gen de PGH con la cepa control

Tabla 16. Resumen de los datos obtenidos para expresión de enzimas con actividad lítica

Muestra	Bandas (kDa)	Muestra	Bandas (kDa)
Población 1	85.7	Cepa A	84.9
Población 2	70	Cepa B	75
Población 3	70	Cepa C	75
Población 4	70	Cepa D	75
Población 5	70	Cepa E	67 y 86
Población 6	-	Cepa G	76
Población 7	75.8	Cepa control I	67 y 86
Población 8	75.8		
Población 9	77		
Población 10	77		
Población 11	81		
Población 12	78, 81 y 84.9		



Son pocos los compuestos antibacterianos producidos por enterococos que presentan un peso molecular tan alto. En la mayoría de los casos estos son bacteriocinas, los cuales son péptidos de máximo 5 kDa. Entre los pocos reportes se encuentra una PGH (con 3 dominios: catalítico, de unión a sustrato y secuencias repetidas) producida por *E. faecalis* que muestra un dominio central llamado AtlA el cual fue activo contra *M. lysodeikticus*. Eckert *et al.* (2006) muestran zimogramas de los extractos de *E. faecalis* donde observaron dos bandas de proteínas catalíticamente activas de 62 y 72 kDa. En ese trabajo se hace referencia al hecho de que el peptidoglucano de *M. lysodeikticus* es muy susceptible a AtlA debido 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. Cabe mencionar que la peptidoglucano hidrolasa que se trataba de identificar en esta investigación, es la misma que la reportada en el trabajo mencionado anteriormente (72 kDa), con la diferencia de que probablemente el dominio de secuencias repetidas es más grande (Serrano, 2010).

7.3.1 b) Prueba de difusión en agar para evaluar actividad antibacteriana

A través de esta técnica se observó la actividad bacteriostática contra microorganismos indicadores como son *E. coli* y *S. aureus* utilizando los extractos crudos extracelulares (neutralizados, filtrados y concentrados por liofilización). Dado que los halos no son de inhibición de crecimiento sino que sólo se observa una disminución en el crecimiento de las bacterias blanco no se calculó actividad específica. Los datos mostrados son de forma cualitativa, tomando como referencia los controles positivos (Kanamicina y Nisaplin). Por medio de esta técnica se pudo detectar actividad contra *E. coli* y *S. aureus*, tanto en poblaciones de enterococos como en las cepas aisladas (Tabla 16).

Tabla 17. Datos cualitativos de actividad bacteriostática por los extractos crudos

Muestra	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	Muestra	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Población 1	++	+	Cepa A	+	++
Población 2	++	+	Cepa B	+	++
Población 3	++	+	Cepa C	+	++
Población 4	+	+	Cepa D	+	++
Población 5	++	+	Cepa E	+	++
Población 6	+	+	Cepa G	+	++
Población 7	+	+	Cepa I	++	++
Población 8	+	+	Kanamicina	--	+++
Población 9	+	+	Nisaplin	+++	--
Población 10	+	+	Datos cualitativos de actividad inhibitoria contra los microorganismos indicadores, tomando como referencia los controles positivos Kanamicina (<i>E. coli</i>) y Nisaplin (<i>S. aureus</i>).		
Población 11	+	+			
Población 12	++	+			



7.4 Detección del gen que codifica para las enterocinas

La enterocina A es una bacteriocina ampliamente descrita en cepas de *E. faecium* aisladas de embutidos fermentados (Aymerich *et al.*, 2000; Du Toit *et al.*, 2000; Herranz *et al.*, 2001). Esta bacteriocina se traduce como un prepéptido que presenta un sitio de procesamiento Gly-Gly-X. Además, la secuencia del extremo N-terminal presenta una secuencia consenso que la clasifica dentro de la clase IIa. Una vez determinado el gen estructural de las bacteriocinas, se deben identificar los genes accesorios que ayudan en la biosíntesis y transporte de la bacteriocina madura (gen de inmunidad, genes de procesado y secreción, y genes que intervienen en la autorregulación de su síntesis), además de identificar cuáles de estos genes comparten el operón con el gen estructural, ya que se ha demostrado que los genes de las bacteriocinas de la clase II suelen encontrarse agrupados en 1, 2 o hasta 3 operones (Ennahar Deschamps, 2000) (Fig. 28).

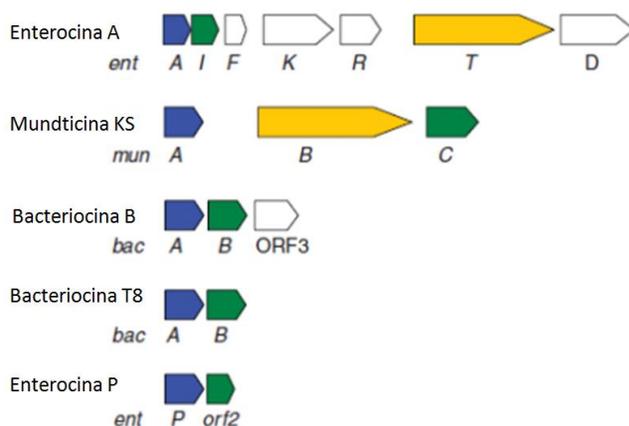


Figura 28. Representación de determinantes genéticos del operón necesarios para secretar una bacteriocina. Bacteriocina inmadura-prepéptido (Azul), inmunidad (verde), sistema de transporte ABC (amarillo), proteínas accesorios-inducción (blanco) (Franz *et al.*, 2007)

El sistema regulatorio de las bacteriocinas de la clase IIa incluye una histidina quinasa (HPC), un regulador de la respuesta (RR) y un factor de inducción (FI), los cuales se requieren como una señal para inducir la transcripción de los genes blanco (Fig. 29). Los FIs son péptidos pequeños, termoestables, catiónicos e hidrofóbicos que se sintetizan como prepéptidos con una secuencia líder del tipo de doble glicina. Los sistemas de tres componentes (FI, RR y HPC) ya han sido propuestos como responsables de la producción de bacteriocinas de clase IIa muy reguladas. Esto sugiere que dicho sistema podría primero ser activado como una consecuencia de un exceso de concentración del FI, ocurriendo a través de una lenta acumulación, como una consecuencia del crecimiento celular. En tal mecanismo el FI podría funcionar como una señal de densidad celular. Algunos autores, sin embargo, sostienen la idea de que el sistema de señal de transducción de las bacteriocinas de la clase IIa, podría deberse también a una respuesta a señales del ambiente. También se sugiere que factores ambientales podrían afectar la unión del FI a la HPC o el balance de fosforilación requerido para la activación de la RR.



Sin embargo, aún no hay mucha información sobre las implicaciones del ambiente en estos factores.

En el procesamiento y la secreción hay una translocación transmembranal de las bacteriocinas IIa mediante un transportador tipo ABC, además de una proteína accesoria, las cuales son dos proteínas unidas a membrana que forman su propio sistema de transporte. Su mutación resulta en una pérdida completa de la producción de bacteriocina.

El dominio C-terminal del transportador ABC contiene un sitio de unión de ATP altamente conservado, mientras que el dominio N-terminal es una región hidrofóbica integrada al sitio membranal. Este último dominio ha sido propuesto para ser el responsable del corte de la secuencia del péptido líder, específicamente en el C-terminal del motivo de doble glicina. De acuerdo con algunos autores el péptido líder sirve como señal de reconocimiento tanto para el corte de la bacteriocina como para la translocación transmembranal de la molécula madura, los cuales están integrados a un procesamiento muy cercano. El dominio proteolítico del transportador ABC podría unir la secuencia líder del pre-péptido, el cual activa la hidrólisis de ATP y subsecuentemente provoca un cambio conformacional en el transportador, resultando en la remoción de dicha secuencia y la traslocación de la bacteriocina madura a través de la membrana (Ennahar *et al.*, 2000) (Fig. 29).

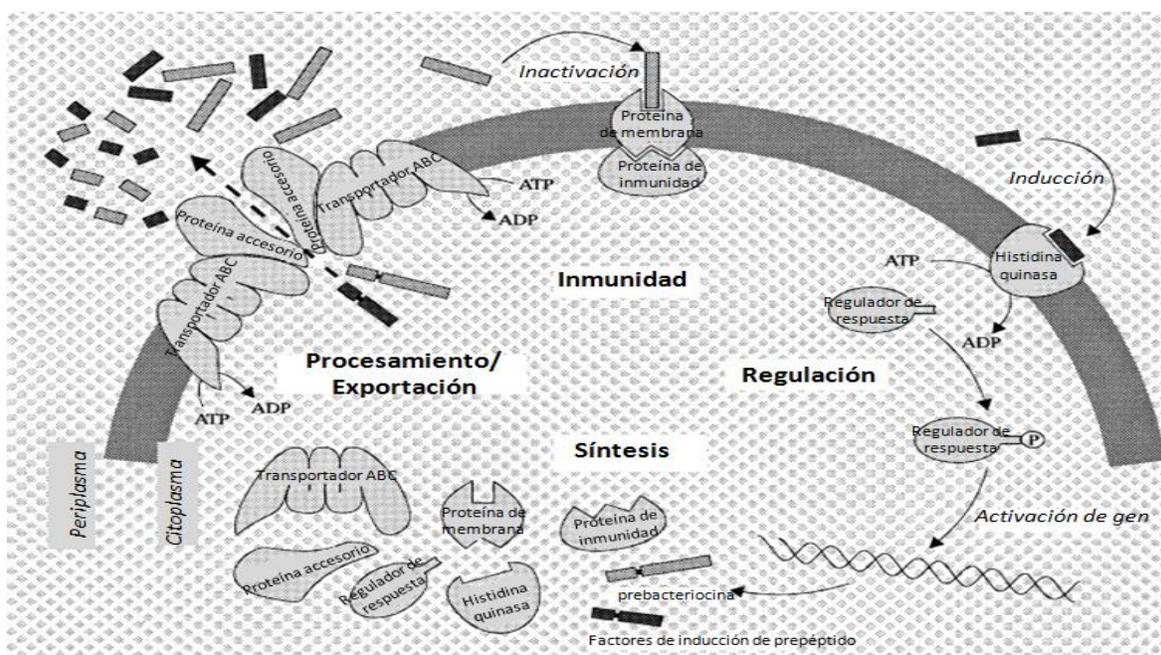


Figura 29. Esquema de la posible maquinaria para la producción de bacteriocinas de la clase IIa: tres componentes del sistema regulatorio, síntesis, procesamiento, excreción e inmunidad (Ennahar *et al.*, 2000)



La cepa de *E. faecium* MXVK29 se aisló de un producto cárnico fermentado y es productora de las enterocinas A y B (Álvarez-Cisneros, 2011). Dicha cepa se utilizó como control positivo para la detección del gen que codifica para la enterocina A con un amplicón de 141 pb (Fig. 30).

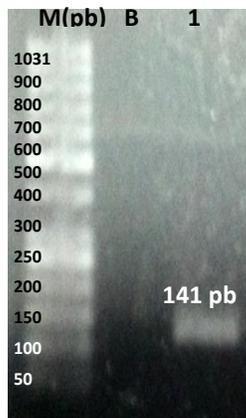


Figura 30. M: Marcador Gen Ruler 50 bp DNA ladder; B: blanco de reacción; 1: *Enterococcus faecium* MXVK29 100 ng/25 μ L de reacción

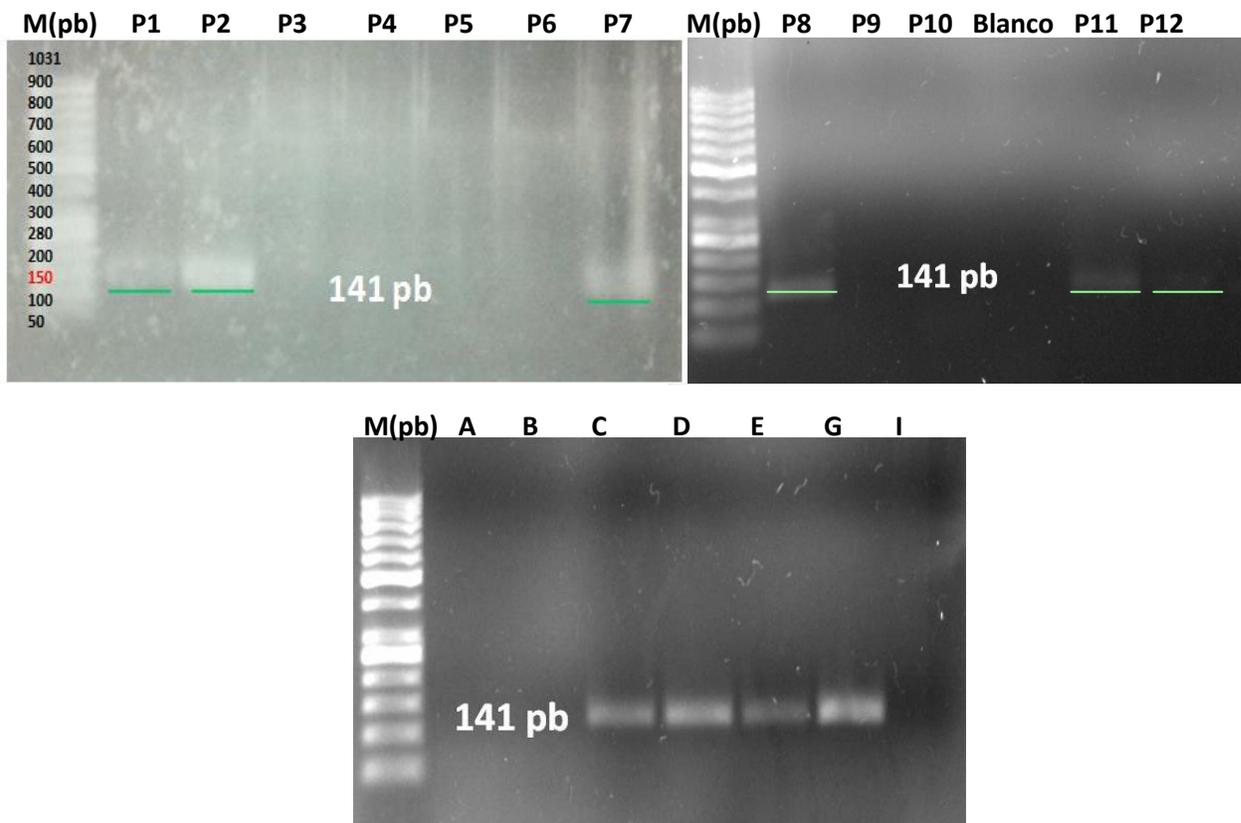


Figura 31. PCR para la detección de enterocina A (141 pb) en las poblaciones de enterococos 1-12, A: *E. faecalis*; B: *E. faecium*; C: *E. faecium*; D: *E. faecalis*; E: *E. faecium*; G: *E. faecium* e I: *E. faecalis*. Se realizó por duplicado



La detección de la enterocina A fue positiva para las poblaciones 1, 2, 7, 8, 11 y 12, así como en las cepas aislada C, D, E, y G (Fig. 30). Cabe señalar que la enterocina A se ha encontrado principalmente en cepas de *E. faecium*, sin embargo, en nuestros resultados se detectó dicho gen para una cepa de *E. faecalis* (cepa D).

7.4.1 Pruebas para evaluar la expresión de la enterocina A

7.4.1 a) Difusión en agar

Un microorganismo frecuente en alimentos es *Listeria* spp., que tiene la capacidad de sobrevivir y crecer a temperaturas de refrigeración, lo que le permite acumularse en los alimentos durante el almacenamiento y le convierte en un riesgo potencial para los consumidores. Además *Listeria* spp. es relativamente tolerante a NaCl y valores de pH reducidos. En los alimentos con pH bajo o a los que se les han agregado ácidos orgánicos, *Listeria* spp. llega a sobrevivir y puede recuperarse y crecer a bajas temperaturas, si es que no existen otras barreras antimicrobianas presentes. Con base en lo anterior, es de mucho interés una cepa de enterococos que sea capaz de inhibir el crecimiento de *Listeria*, teniendo como ventajas la capacidad de crecer en las mismas condiciones desfavorables y la producción de bacteriocinas con fuerte efecto antilisterial como lo es la enterocina A.

Por otra parte, se ha reportado que las enterocinas del tipo IIa son susceptibles de proteasas (Yang *et al.*, 1992), por lo tanto se decidió realizar un paso de inactivación de éstas. A la técnica de obtención de extractos de enterocina se agregó una etapa de calentamiento a 70°C durante 30 min, partiendo de un cultivo de 16h en medio MRS tal y como se describe en la metodología.

Los extractos de cultivos se probaron contra *Listeria innocua*, ya que como se sabe la enterocina A al pertenecer a la clase IIa se caracteriza por su efecto antilisterial. Los resultados mostraron únicamente un halo de inhibición de crecimiento muy nítido alrededor del extracto de la población 2, con una actividad específica de 23.08 mm inhibición/mg proteína; y un halo mucho menor en la población 1 (Fig. 32). A pesar de que se detectaron más muestras *entA*⁺ éstas no mostraron actividad antibacteriana en este ensayo. Esto podría deberse a diferentes variables; que tengamos una insuficiente concentración de proteína colocada en cada pozo, o bien, que esta población en particular esté produciendo otro compuesto que ayude o sea el causante de la actividad inhibitoria observada. Dicho compuesto podría tratarse de la PGH, ya que esta población presentó el gen de la misma y también mostró actividad antibacteriana contra *M. lysodeikticus*. Así bien, no se descarta un efecto sinérgico por ambos compuestos.



Figura 32. Técnica de difusión en agar contra *L. innocua*. El sobrenadante de la población 2 (inactivado, neutralizado, filtrado y liofilizado) *ent A*⁺ presenta un halo nítido de inhibición sobre el crecimiento de la bacteria blanco

7.4.1 b) Perfil electroforético para la detección de la enterocina A y zimografía

Con el fin de determinar la actividad antibacteriana de las poblaciones y cepas aisladas que fueron positivas para el gen *entA*, se realizaron geles SDS-PAGE y zimografía para detectar una proteína de 4.8 kDa tal como lo reportan Aymeric y colaboradores en 1996. En la figura 33 se muestra el patrón de bandeo de los extractos de cada población y cepa aislada los cuales presentan una banda de aproximadamente 5 kDa que posiblemente sea la correspondiente a la enterocina A. En algunos casos, como el de la población 8 y 11 podemos observar que hay dos bandas con un peso molecular muy cercano provocando que se observé una banda muy gruesa, probablemente se trate una segunda bacteriocina. Muchas de las especies productoras de la enterocina A producen una segunda bacteriocina, denominada enterocina B. La enterocina B se sintetiza como un pre péptido con un sitio de procesamiento de doble glicina. El péptido maduro contiene 53 aminoácidos al igual que otras bacteriocinas producidas por enterococos (Franz *et al.*, 1999). A pesar de su gran parecido con la enterocina A, ya que contiene dos residuos de cisteína que forman un enlace disulfuro en el péptido maduro, éstas no presentan en el extremo amino terminal la secuencia consenso característica de las bacteriocinas de clase IIa, por lo que se les clasifica dentro de la clase II c (Foulquié Moreno *et al.*, 2003).

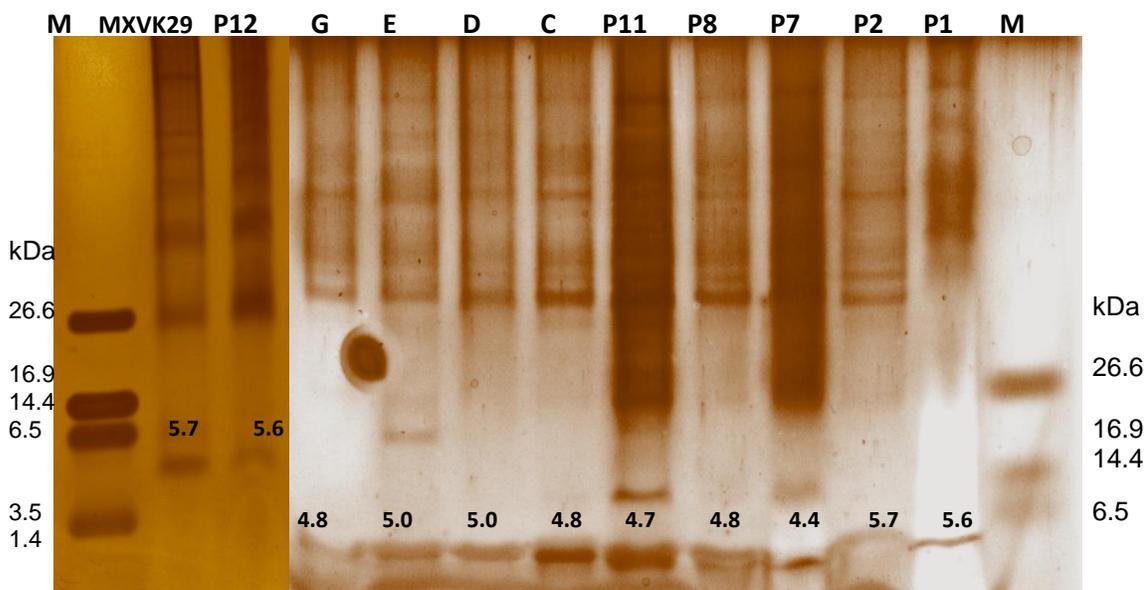


Figura 33. Gel de poliácridamida SDS- Tris-tricina al 10%. Tinción de plata. Sobrenadantes obtenidos por la técnica de adsorción y desorción dependiente de pH. M: marcador de peso molecular polipéptido (SDS-PAGE Standards) P1: población 1, P2: población 2, P7: población 7 y P8: población 8, P11: población 11, P12: población 12; C: *E. faecium*; D: *E. faecalis*; E: *E. faecium*; G: *E. faecium* y MXVK29:*E. faecium* (cepa control positivo)

En la figura 34 se presentan los zimogramas con una banda de 5 kDa activada lítica contra *Micrococcus lysodeikticus*. Los geles se tiñeron con azul de metileno. Este ensayo se realizó por duplicado.

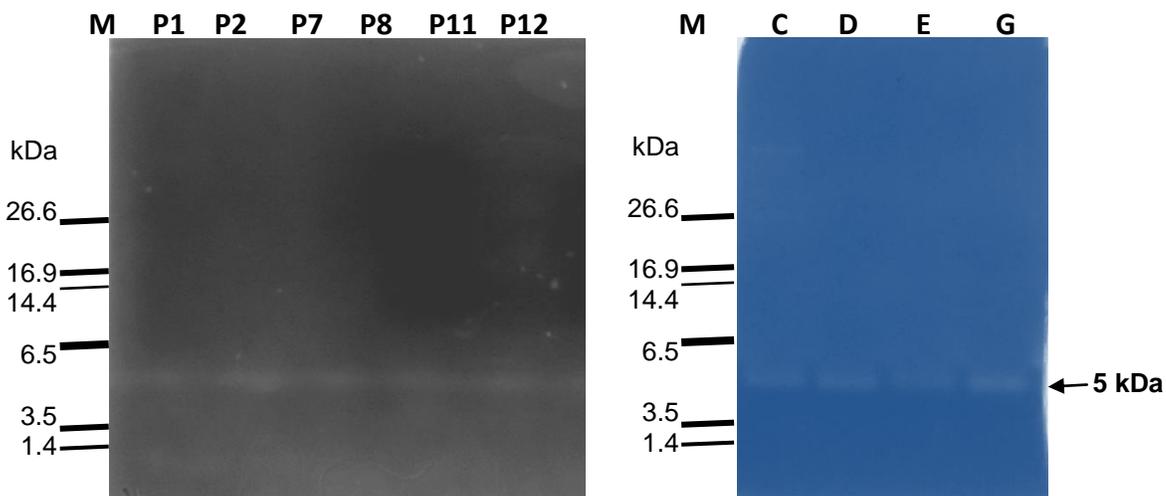


Figura 34. Gel de poliácridamida SDS- Tris-tricina al 10% con células embebidas de *Micrococcus lysodeikticus* Sobrenadantes obtenidos por la técnica de adsorción y desorción dependiente de pH. M: marcador de peso molecular polipéptido (SDS-PAGE Standards) P1: población 1, P2: población 2, P7: población 7 y P8: población 8, P11: población 11, P12: población 12; C: *E. faecium*; D: *E. faecalis*; E: *E. faecium*; G: *E. faecium*



En la Figura 35 se observan dos bandas con actividad lítica contra *L. innocua* de aproximadamente 5 y 3 kDa. Anteriormente se mencionó que probablemente se deba a la presencia de una segunda bacteriocina. Casaus y colaboradores en el 1997 demostraron que en algunos casos la enterocina A actúa de forma sinérgica con la enterocina B, pero no necesariamente se deben producir ambas bacteriocinas aunque la cepa contenga los dos genes. Dados los resultados podemos suponer que en nuestras muestras *entA*⁺ se están produciendo ambas bacteriocinas, la enterocina A con un peso molecular de 5 kDa y la enterocina B con un peso de 3 kDa, aunque este último peso molecular no correspondería con el peso teórico (Aymeric *et al.*, 1996; Casaus *et al.*, 1997, Ennahar, 2001). Otra hipótesis que podemos plantear, únicamente para las poblaciones de enterococos, se relaciona con lo analizado en la base de datos NCBI, donde existe un reporte de una enterocina A producida por *E. faecalis* la cual es un péptido de 63 aminoácidos, indicando un peso molecular mayor a la reportada para la especie *E. faecium* (NCBI). Dado que en las poblaciones probablemente tenemos más de una especie, se podrían estar produciendo ambas enterocinas A. Cabe mencionar que este ensayo se realizó por triplicado, observando siempre la presencia de ambas bandas. Para confirmar la identidad que cada banda se propone cortar las bandas y mandarlas a analizar por secuenciación de péptidos internos.

A pesar de que en los geles de actividad contra *M. lysodeikticus* sólo se observa una banda de aproximadamente 5 kDa puede decirnos que sólo una de las dos enterocinas es la que tiene actividad contra este microorganismos o bien al ser de un peso molecular tan cercano se confundan en una sola banda (Fig. 33).

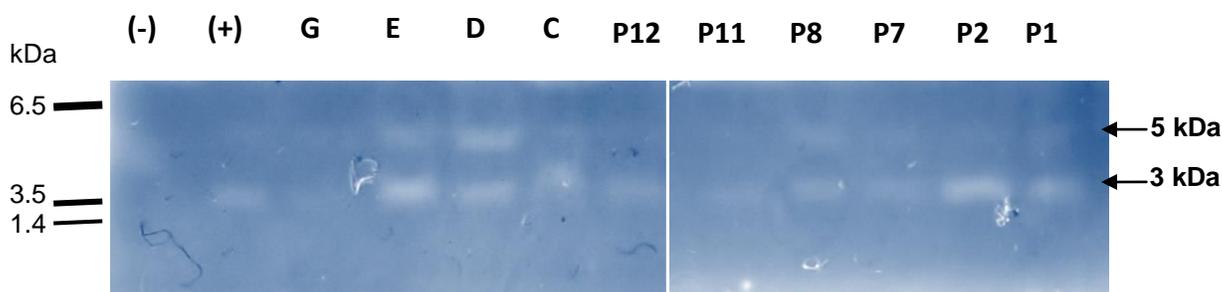


Figura 35. Gel de poliacrilamida SDS- Tris-tricina al 10% con células embebidas de *Listeria innocua* Sobrenadantes obtenidos por la técnica de adsorción y desorción dependiente de pH. M: marcador de peso molecular polipéptido (SDS-PAGE Standards) P1: población 1, P2: población 2, P7: población 7 y P8: población 8, P11: población 11, P12: población 12; C: *E. faecium*; D: *E. faecalis*; E: *E. faecium*; G: *E. faecium* y (+): *E. faecium* MXVK29 (cepa control positivo) e (-): *E. faecalis* I (control negativo)



En la tabla 18 se resumen los resultados obtenidos en la detección y expresión de la enterocina A.

Tabla 18. Resultados de detección y expresión de enterocina A

Muestra	<i>entA</i>	Actividad contra <i>M. lysoidectikus</i> (5kDa)	Actividad contra <i>L. innocua</i> (3 y 5 kDa)
Población 1	+	+	+
Población 2	+	+	+
Población 3	-	-	-
Población 4	-	-	-
Población 5	-	-	-
Población 6	-	-	-
Población 7	+	+	+
Población 8	+	+	+
Población 9	-	-	-
Población 10	-	-	-
Población 11	+	+	+
Población 12	+	+	+
Cepa A	-	-	-
Cepa B	-	-	-
Cepa C	+	+	+
Cepa D	+	+	+
Cepa E	+	+	+
Cepa G	+	+	+
Cepa I	-	-	-

8. Discusión final

Se ha propuesto que la fina línea que separa el estilo de vida dual de los enterococos (como comensales o patógenos) es el resultado de una interacción orquestada entre procesos que implican la acción secuencial de la colonización y posibles factores de virulencia que gobiernan la adaptación de la célula bacteriana durante la infección, así como la respuesta del huésped a la bacteria y sus productos (Pillar *et al.*, 2004). El género enterococos es conocido por causar serias enfermedades en humanos y se están convirtiendo en un importante y creciente problema en infecciones nosocomiales debido a la adquisición de resistencia a antibióticos. La adquisición de resistencia a antibióticos, combinada con la resistencia natural a varias clases de antibióticos y su gran resistencia a ambientes desfavorables, contribuye a su sobrevivencia. Los enterococos son encontrados en alimentos como contaminantes, y en ocasiones son adicionados intencionalmente como cultivos iniciadores. Además, son patógenos oportunistas, y el estatus inmune del hospedero es un factor en su habilidad para causar una enfermedad. A pesar de su significado, poco se conoce acerca de los mecanismos de virulencia que contribuyen a su patogénesis, sin embargo, varios factores han sido implicados como determinantes de potencial de virulencia (Eaton y Gasson, 2004).



No obstante, con nuestros resultados podemos ver la baja incidencia de los marcadores genéticos analizados tanto en las cepas aisladas como en las poblaciones de enterococos. No se puede concluir con qué frecuencia son encontradas en las diferentes especies del género ya que estas no fueron identificadas. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por varios autores, los cuales señalan la baja incidencia de genes de virulencia en cepas de enterococos aislados de diversas matrices alimentarias comparado con cepas de aislados clínicos (Eaton y Gasson, 2004; Abriouel *et al.*, 2008). Interesantemente, se ha demostrado, mediante técnicas de tipificación por heterogeneidad de longitud por PCR (LH-PCR) que los aislados clínicos se agrupan en un grupo separado, con excepción de unos cuantos, mientras que los aislados de matrices alimentarias en su mayoría forman un grupo separado junto con los aislados de suelo y agua. Dichos reportes podrían sugerir que el desarrollo de métodos de tipificación direccionados a la región PAI de enterococos podrían resaltar la importancia de la ecología de estas bacterias y la presencia de grupos genómicos asociados con ambientes específicos (Abriouel *et al.*, 2008).

Las diferencias entre un enterococo patógeno y una cepa aparentemente segura para su uso en alimentos no son claras. Ya está establecido que la taxonomía molecular de los enterococos no lleva a una distinción entre estos dos tipos de cepas. Nuestros conocimientos de virulencia en enterococos están incompletos, en parte debido al hecho de que son comensales normales de los humanos y, como tales, tienen sutiles rasgos de virulencia que no son fácilmente detectables. Los rasgos de virulencia incluyen la adherencia al tejido del hospedero, invasión y formación de abscesos, modulación de la respuesta inflamatoria del hospedero y secreción de productos tóxicos.

En conclusión, se identificó la presencia y expresión de algunos genes que codifican para factores de virulencia. Sin embargo, los enterococos de origen alimentario no se han relacionado, hasta ahora, como causa directa de infecciones clínicas (Adams, 1999), aunque es cierto que se han encontrado genes que codifican para factores de virulencia en cepas aisladas de alimentos, como en nuestro estudio, la frecuencia es menor que en el caso de los detectados en aislados clínicos (Eaton y Gasson, 2001; Franz *et al.*, 2001). Así bien, es importante recordar que los mismos factores que actúan para conferir virulencia son los mismos que podrían tener una acción sinérgica (probiótica) con el hospedero. Lo que determina cual sea su función es el entorno en el que se encuentra.



9. Conclusiones

- En ninguna de las poblaciones de enterococos obtenidas de los quesos Cotija se obtuvo un resultado positivo de presencia del gen para citolisina (*cyIA*). Siete de las 12 poblaciones analizadas y las cepas aisladas A, B e I tienen el gen para la sustancia de agregación (1, 2, 3, 5, 7, 11 y 12) y todas son capaces de adherirse a las líneas celulares Caco-2 y Ht-29. Sólo las poblaciones 2 y 12 y la cepa *E. faecium* (B) presentan el gen que codifica para la proteína de superficie (*esp*). Sin embargo, la mayoría de las muestras tiene la capacidad de formar biopelículas, aunque muy pocas lo hacen de forma bien estructurada ($D.O_{600nm} > 0.22$).
- El gen que codifica para la AtIA, se detectó sólo en dos de las poblaciones de queso Cotija (1 y 2). También se detectó en la cepa B. A pesar de que no fue posible detectar el gen que codifica para la AtIA, para la mayoría de las poblaciones y cepas aisladas, a través de la técnica de zimografía se detectaron varias bandas con actividad antibacteriana contra *M. lysodeikticus*, particularmente en las poblaciones 1-5 y 7-11 con bandas a los 70 kDa aproximadamente. La población 12 presentó tres bandas de actividad a los 76, 80 y 85 kDa. Las cepas A, E e I, presentan bandas de actividad aproximadamente a los 85 kDa y B, C, D y G a los 76 kDa. Al ser proteínas de tan alto peso molecular y con actividad antibacteriana podrían ser PGHs con diferente secuencia a la que se estaba buscando. Además, por medio de la técnica de difusión en agar se pudo detectar actividad bacteriostática contra *E. coli* y *S. aureus*, tanto en poblaciones de enterococos como en las cepas aisladas.
- Seis de las poblaciones de enterococos y las cepas C, D, E y G presentan el gen que codifica para la enterocina A, la cual se logró y visualizar en geles de Tris-tricina al 10% con un peso aproximado de 5 kDa, la cual también era activa contra *M. lysodeikticus* y *L. innocua*. En la zimografía contra *L. innocua* se observó una segunda banda de actividad con un peso molecular menor a los 5 kDa y se presume podría tratarse de la enterocina B.
- Sólo la población dos mostró actividad antibacterina de forma contundente contra *L. innocua* observada por la técnica de difusión en agar.
- El gen de la enterocina AS-48 no se detectó en ninguna de las poblaciones y cepas aisladas.
- Nuestros resultados indican que no existe un riesgo de infección por enterococos debido al consumo de queso Cotija ya que los factores de virulencia detectados



únicamente se relacionan con su capacidad de colonizar. Por el contrario, los enterococos podrían estar jugando un papel muy importante en el desarrollo de la inocuidad de producto, ya que tienen la capacidad de sintetizar sustancias con actividad antibacteriana.

10. Perspectivas

Realizar la secuenciación completa de algunas cepas de *E. faecalis* y/o *E. faecium* con el fin de dilucidar completamente su potencial de patogenicidad y/o de probioticidad. También se pretende hacer un análisis actividades proteolíticas y lípolicas para saber cómo está contribuyendo este género al desarrollo de aromas y sabores en el queso Cotija. Por otro lado, se propone la realización de experimentos que refuercen el presente estudio, como son dilucidar su capacidad de producción de aminas biógenas y la resistencia a una amplia gama de antibióticos, principalmente aminoglucósidos. Además se planea realizar experimentos para conocer la identidad de cada una de las bandas con actividad lítica y actividad de bacteriocina que se encontraron en este trabajo.



10. Bibliografía

- **Adams, M.R., 1999.** Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*. **68**, 171-178.
- **Álvarez-Cisneros Yenizey, 2011.** Aspectos de seguridad de *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Enterococcus faecalis* MXVK22 aislados de productos cárnicos y caracterización molecular de sus bacteriocinas. Tesis de doctorado en biotecnología. UAM-I.
- **Abriouel, H., Ben, O.N., Cobo, A.M., Lucas, R.L., Grande, M.J., Martínez-Viedma, P., Ortega, E., Martínez-Cañamero, M. y Gálvez, A. 2008.** Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology*. **123**, 38-49.
- **Aymerich T., Holo H., Havarstein L., Hugas M. y Garriga M., Nes I., 1996.** Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*. **65 (5)**, 1676–1682.
- **Aymerich, T., Artigas, M.G., Garriga, M., Monfort, J.M. y Hugas, M., 2000.** Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of in vitro production and anti-listerial effect in dry fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*. **88**, 686–694.
- **Bazán-Gómez, AB. 2007.** Detección de la albúmina 2S en aislados de ajonjolí. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- **Béliveau C. Potvin C., Trudel J., Asselin A., Bellemare G., 1991.** Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of a *Streptococcus faecalis* autolysin. *Journal of Bacteriology*. **173**, 5619-23.
- **Ben Belgacem, Z., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R. Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A. y Manai, M. 2010.** Antimicrobial activity, safety aspects and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control*. **21**, 462-470.
- **Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N.M.K., Franz, C.M.A.P., Holzappel, W.H. y Pérez-Pulido, R. 2004.** Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods. *System Applied and Microbiology*. **27**, 118–130
- **Bravo-Mendoza A. 2008.** Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas del queso Cotija. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM, México D.F. pp. 5-14, 46-72.



- **Brogden Kim A., 2000.** Virulence mechanisms of bacterial pathogens. 3rd ed. Editado por Amer Society for Microbiology Press, Washington.
- **Callewaert, R., Hugas, M. y De Vuyst, L. 2000.** Competitiveness and bacteriocin production of enterococi in the production of Spanish-style dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*. **57**, 33-42
- **Casaus, F., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nest, I.F., Hernández, P.E. y Holo, H. 1997.** Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* TI36 wich act synergistically with enterocin A. *Microbiology*. **143**, 2287-2294.
- **Cebrián R., Baños A., Valdivia E., Pérez-Pulido R., Martínez-Bueno M. y Maqueda M., 2012.** Characterization of funtional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48 producer strain. *Food Microbiology*. **30**, 59- 67
- **Cervantes-Escoto F, Villegas-de Gante A, Cesin-Vargas A, Espinoza- Ortega A. 2008.** Los Quesos Mexicanos Genuinos –Patrimonio cultural que debe rescatarse-. 1ª edición. Mundi-Prensa México. pp. 149-162.
- **Cotter Paul, 2005.** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews, Microbiology*. **3**, 777-788.
- **Delgado-Arciniega E. 2013.** 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 Vuyst, L. y Vandamme, E.J., 1994.** Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: De Vuyst, L., Vandamme, E.J. (Eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: microbiology, genetics and applications*. Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom, pp. 91–142.
- **Dolinger D. Schramm V. y Shockman G., 1988.** Covalent modification of the f8-1,4-N-acetylmuramoylhydrolase of *Streptococcus faecium* with 5-mercaptouridine monophosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **85**,6667-6671.
- **Doming K., Mayer H. y Kneifel W., 2003.** Methodos used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. 1. Media for isolation and enumeration. *International Journal of Food Microbiology*. **88**, 147-164.
- **Drider D., Fimland G., He´chard Y., McMullen L.M. y Prévost H., 2006.** The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.**70**, 564–582.
- **Dunny G., Craig R., Carron R. y Clewell D., 1978.** Plasmid transfer in *Streptococcus faecalis*: production of multiple sex pheromones by recipientes. *Plasmid*. **2**, 454-465.
- **Du Toit, M., Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.T. y Holzapfel, W.H. 2000.** Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 482-494.



- **Eaton, T.J. y Gasson, M. J.; 2001.** Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**, 1628-1635.
- **Ecker C., Lecerf M., Dubost L., Arthur M. y Mesnage S., 2006.** Funcional Analysis of AtlaA, the Major N-Acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*. **188**, 8513-8519.
- **Ennahar, S. y Deschamps, N. 2000.** Anti-listeria effect of enterocin A, produced by chesse-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. **88**, 449-457.
- **Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. y Ishizaki, A. 2000.** Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*. **24**, 85-106.
- **Ennahar, S., Asou, Y., Zendo, T., Sonomoto, K. y Ishizaki, A. 2001.** Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *International Journal of Food Microbiology*. **70**, 291-301
- **Foulquié, M.R.M., Callewaert, R., Devreese, B., Beeumen J.V. y De Vuyst, L. 2003.** Isolation and biochemical characterization of enterocins produced by enterococci from different sources. *Journal of Applied Microbiology*. **94**, 214-229.
- **Franz C.M.AP., Worobo R., Quadri L., Schillinger U.,Holzapfel W., Vederas J. y Stiles M. 1999.** Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Applied and Environmental Microbiology*. **65 (5)**, 2170-2178
- **Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings, J. y Holzapfel, W.H. 2001.** Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among *Enterococci* isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**, 4385-4389.
- **Franz, C.M.A.P., Stiles, ME; Schleifer, K.H y Holzapfel W.H, 2003.** *Enterococci* in foods - aconundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*.**88**, 105-122.
- **Franz, C.M.A.P., van Belkum M., Holzapfel W.H., Abriouel H. y Gálvez A. 2007** Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *Federation of European Microbiological Societies*. **31**, 293-310.
- **Gally D., Lottspeich F. y Wirth R., 1990.** Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sexpheromone plasmid pADI. *Molecular Microbiology*. **4 (7)**: 895-904
- **García-Saturnino V., 2006.** Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolítica del queso Cotija. Tesis de Licenciatura. Facultad de química. UNAM, México D.F.
- **George A., O'Toole y Roberto Kolter, 1998.** Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*. **28(3)**, 440-461.



- **Gilmore Michael S., 2002.** The *Enterococci*. Pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance. ASS PRESS. Washington, D.C, U.S.A. 308-338.
- **Giraffa G., 2003.** Functionality of enterococci in dairy products. International journal of Food Microbiology **88**, 215-222.
- **Gómez-Castelo B., 2010.** Identificación de bacterias halófilas presentes en queso Cotija por métodos independientes de cultivo. Tesis de Licenciatura. Facultad de química. UNAM, México D.F.
- **Herranz, C., Casaus, P., Mukhopadyay, S., Martínez, J.M., Rodríguez, J.M., Nes, I.F., Hernández, P.E. y Cintas, L.M. 2001.** *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. Food Microbiology. **18**, 115-131.
- **Hernández-Alcántara A. M. 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.
- **Hernández-Mejía N. 2007.** Identificación de bacterias proteolíticas aisladas del queso Cotija, un estudio microbiológico y fisicoquímico. Tesis de Licenciatura. Facultad de química. UNAM, México D.F.
- **Izquierdo E., Bednarczyk A., Schaeffer C., Cai Y., Marchioni E., Van Dorsselaer A. y Ennahar, 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.
- **Ingolf F. Nes, Dzung B. Diep, y Helge Holo, 2007.** Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. Journal of Bacteriology. **189 (4)**, 1189–1198.
- **Kayser F. H., 2003.** Safety aspects of enterococci from the medical point of view. International Journal of Food Microbiology. **88**, 255–262.
- **Katla T., Netersatd K., Vancanneyt M., Swings J. y Axelsson L. 2003.** Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to sakacin P, sakacin A, pediocin PA-1, and nisin. Applied and Environmental Microbiology. **69**, 4431–4473.
- **Klocke M., Mundt K., Idler F., Jung S. y Backhausen J. E., 2005.** Heterologous expression of enterocin A, a bacteriocin from *Enterococcus faecium*, fused to a cellulose-binding domain in *Escherichia coli* results in a functional protein with inhibitory activity against *Listeria*. Applied Microbiology and Biotechnology. **67**, 532-538.
- **Layec S, Decaris B y Leblond-Bourget N., 2008.** Diversity of firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation. Research in Microbiology. **159**, 507-515
- **Leclerc, D. y Asselin, A. 1989.** Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing gel electrophoresis. Canadian Journal of Microbiology **35**, 749–753.



- **López-Munguía A., 2002.** Biotecnología alimentaria. Quinta reimpresión, Editorial Limusa, México, p.p. 153.
- **Lortal S. y Chapot-Chartier MP. 2005.** Role, mechanism and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal.* **15**, 857-871.
- **Martínez José M., Kok Jan, Sanders Jan W. y. Hernández Pablo E, 2000.** Heterologous coproduction of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: Detection by specific peptide-directed antibodies. *Applied and Environmental –Microbiology.* **66**: 3543–3549
- **Martín-Platero A., Valdivia E., Maqueda M. y Martínez-Bueno M., 2009.** Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **132**, 24–32
- **Mesnage S, Chau F. Dubost L. y Arthur M. 2008.** Role of *N*-Acetylglucosaminidase and *N*-Acetylmuramidase activities in *Enterococcus faecalis* peptidoglycan metabolism. *The Journal of Biological Chemistry.* **283**, 19845-19853.
- **Moreno M. R, Leisner J.J, Tee L.K., Ley C., Radu S., Rusul G., Vancanneyt M. y De Vuyst L., 2002.** Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Applied Microbiology.* **92**, 147-157.
- **Moreno M., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E. y De Vuyst L., 2006.** The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology.* **106**, 1-24
- **Murray Barbara, 1990.** The life and times of the Enterococcus. *Clinical Microbiology Reviews.* **3**, 46-65.
- **Navarre WW, Ton-That H, Faull K.F. y Schneewind O. 1999.** Multiple enzymatic activities of the murein hydrolase from Staphylococcal phage ϕ 11. Identification of a D-alanyl-glycine endopeptidase activity. *The Journal of Biological Chemistry.* **274**, 15847-15856.
- **Ogier Jean-Claude y Serror Pascale, 2008.** Safety assessment of dairy microorganisms: *The Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology.* **126**:291-301.
- **Olvera García M. 2010.** Efecto del medio de cultivo en la producción de compuestos antibacterianos en *Enterococcus* spp. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México, D.F.
- **Özmen Togay S., Celebi Keskin A. Acik L. y Temiz A., 2010.** Virulence genes, antibiotic resistance and plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecalis* from naturally fermented Turkish foods. *Journal of Applied Microbiology.* **109**, 1084–1092.
- **OXOID Manual, 1990.** 6th Ed. Alphaprint, Alton, Hants. United Kingdom.
- **Panreac.** 2003. Manual Básico de Microbiología. Medios de cultivo deshidratados.



- **Pillar, C.M. y Gilmore, M.S. 2004.** Enterococcal virulence-pathogenicity islands of *Enterococcus faecalis*. *Frontiers in Bioscience*. **9**, 2335 e 2346.
- **Rocha Gracia R., Lozano Zarain P., Martínez Laguna Y., 2004.** Mecanismos de Patogenicidad e Interacción parásito-hospedero. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Primera edición. Puebla, México, pp. 5 y 6.
- **Salminen, S. von Wright, A. y Ouwehand, A., 2004.** Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 3ª edición. Marcel Dekker Inc. Estados Unidos.
- **Semedo, T., Almeida, M.S., Martins, P., Silva, L.M.F., Figueiredo, M.J.J., Tereiro, R. y Barreto, C.M.T. 2003.** Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 2569-2576.
- **Serrano Maldonado C., 2010.** Caracterización de la actividad antibacteriana producida por cepas de BAL aisladas de un alimento artesanal mexicano. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- **Serrano Maldonado C., 2013.** Caracterización de peptidoglucano hidrolasas de bacterias ácido lácticas aisladas de queso Cotija. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- **Schägger H. y Von Jagow G. 1987.** Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the separation of proteins in range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**, 369-379.
- **Shankar, V., Baghdayan A. S., Huycke M. M., Lindahl G., y Gilmore M. S.. 1999.** Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and Immunity*. **67**, 193–200
- **Shankar V., Baghdayan A. S. y Gilmore, M., 2002.** Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature*. **417**, 746-750.
- **Shankar N., Coburn P. y Pillar C., 2004.** Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *International Journal of Medical Microbiology*. **293**, 609-618.
- **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
- **Toledo-Arana, A., Valle, J. y Solano, C., 2001.** The enterococcal surface protein, ESP, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied Environmental Microbiology*. **67**: 4538-4545.
- **Vankerckhoven V., Autgaerden T.V., Vael C., Lammens C., Chapelle S., Rossi R., Jabes D. y Goossens H. 2004.** Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*,



gelE, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in *Enterococci* and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*. **42**, 4473–4479

- **Vollmer W, Joris B, Charlier P y Foster S. 2008.** Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*. **32**, 259–286.
- **Wolfgang Haas, Brett D. Shepard y Michael S. Gilmore 2002.** Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction *Nature* **415**, 84-87.
- **Yang L., Liu Y., Wu H., Song Z., Høiby N., Molin S. y Givskov M., 2011.** Combating biofilm. *FEMS Immunol Med Microbiology* **65**. 146–157
- **Yang, R., Johnson, M. y Ray, B. 1992.** Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 3355-3359.
- **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

- **Atlas de bacteriología.** *Club de Informática Médica y Telemedicina (Universidad de Panamá)*. **Prueba de Hemólisis en Agar Sangre**. *Telmeds.org [publicada en línea]*. 2009(10). [citado 26 de Jul de 2013]. Disponible en: <http://www.telmeds.org/atlas/bacteriologia/cocos-gram-positivos-piogenos-de-importancia-medica/prueba-de-hemolisis-en-agar-sangre/>
- **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
- **Díaz Pérez M., Rodríguez Martínez C. y Zhurbenko R., 2012.** Enterococcus, medios de cultivo convencionales y cromogénicos. Artículo de revisión. Centro Nacional de Biopreparados. La Habana, Cuba. http://bvs.sld.cu/revistas/hie/vol51_1_13/hie10113.htm
- **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
- **Garza-Velasco.** Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*. 1Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM. <http://depa.pquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-Enterococcus.pdf> (Consultado en Febrero 2011).



- NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5160755&fecha=27/09/2010. (Consultado en 2010).
- **Multalin**. <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>
- **Oligocalc**. <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>

10. Anexo

10.1 Técnica de Zimografía

Se describirá la técnica teniendo como microorganismos indicador a *L. innocua*.

Obtención de las células: Se parte de un preinóculo de *L. innocua* en medio TSB. Después se inocula al 1% un matraz con 100 mL de TSB y se incuba por 24h sin agitación. El cultivo se centrifuga a 10,015g y el pellet se lava dos veces con amortiguador de fosfatos a pH7, centrifugando a 10,015g. El pellet limpio se resuspende en 8 mL de solución salina al 0.85%, pH7 (volumen final del gel) y se mide D.O. a A_{600nm} . Una D.O. de 7-8 se considera óptima para este microorganismo, según nuestra experiencia. La mezcla se centrifuga a 10,015g para obtener nuevamente el pellet limpio.

Tabla 19. Reactivos y cantidades para un gel Tris-tricina al 10%

Orden de incorporación	Reactivo	Separador	Concentrador
4	Acrilamida Tris-tricina	2.833 mL	324 μ L
3	Buffer de gel	2.833 mL	620 μ L
2	Glicerol 80%	0.895 mL	-
5	Temed	5.66 μ L	1.5 μ L
6	APS 10%	42.5 μ L	13.33 μ L
1	Agua	1.927 mL	1.557 mL
	Vol. final	8.5 mL	2.5 mL

El gel que se describe es de Tris-Tricina al 10%, aunque pueden ser de glicina y el porcentaje que se desee.



Preparación del gel:

Se agregan mL de agua y se resuspenden perfectamente las células, cuidando de no dejar nada sin solubilizar, ya que esto es un punto crítico en la elaboración del gel. A continuación se agregan el resto de los reactivos en el orden indicado en la Tabla 18. El vertido en los vidrios debe ser rápido para evitar que polimerice en el tubo de preparación.

Las condiciones de electroforesis son 80V durante 6h o cuando el frente de corrida haya salido del marco.

Posteriormente el gel se lava con agua desionizada durante 20 min. Después se incubaba 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 detecta 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 a continuación se destiñó con agua destilada hasta observar la aparición de las bandas (Leclerc D. y Asselin A., 1989).

Tabla 19. Resumen de todos los resultados obtenidos en este trabajo

Muestra	asa+	esp+	cylA+	Adherencia a líneas celulares	Formación de biopelículas	Actividad hemolítica	AtlA+	Actividad lítica contra <i>M. lysodeikticus</i>	entA+	AS-48+	Actividad lítica contra <i>M. lysodeikticus</i>	Actividad contra <i>L. innocua</i>	Actividad antibacteriana contra <i>L. innocua</i> (Difusión en agar)
Población 1	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+/-
Población 2	+	+	-	+	+/-	-	+	+	+	-	+	+	+
Población 3	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Población 4	-	-	-	-	+/-	-	-	+	-	-	-	-	-
Población 5	+	-	-	+	+/-	-	-	+	-	-	-	-	-
Población 6	-	-	-	-	+/-	-	-	+	-	-	-	-	-
Población 7	+	-	-	+	+/-	-	-	+	+	-	+	+	-
Población 8	-	-	-	-	+/-	-	-	+	+	-	+	+	-
Población 9	-	-	-	-	+/-	-	-	+	-	-	-	-	-
Población 10	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Población 11	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
Población 12	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
Cepa A	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Cepa B	+	-	-	+	+/-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cepa C	-	-	-	-	+/-	-	-	+	+	-	+	+	-
Cepa D	-	-	-	-	+/-	-	-	+	+	-	+	+	-
Cepa E	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
Cepa G	-	-	-	-	+/-	-	-	+	+	-	+	+	-
Cepa I	+	-	-	+	+/-	-	+	+	-	-	-	-	-