



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Evaluación *in vitro* del efecto inhibitorio del sobrenadante de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 15313

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:
YOSELIN ARIADNA DEL CASTILLO NÚÑEZ

TUTOR PRINCIPAL
ADRIANA LLORENTE BOUSQUETS (FES-CUAUTITLÁN)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
VÍCTOR RUBÉN TENORIO GUTIÉRREZ (FES-CUAUTITLÁN)
ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA (F.M.V.Z.)

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO; JUNIO 2017



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.

AGRADECIMIENTOS

El presente Trabajo de Tesis de Investigación fue desarrollado en el Laboratorio 7 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria UIM de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán FESC-UNAM.

Agradezco el apoyo recibido de los Proyectos:

DGAPA PAPIIT IT201917

FESC-UNAM PIAPI 1635

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la UNAM por los apoyos recibidos durante los estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 666592 recibida durante el periodo 2015-2 a 2017-1.

A mi tutora: Dra. Adriana Llorente Bousquets, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su disposición, apoyo, orientación, paciencia y dedicación incondicional para el desarrollo de este proyecto y mi desarrollo profesional. Gracias.

A mi Comité Tutorial: Dr. Víctor Rubén Tenorio Gutiérrez y Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma, por el apoyo y orientación brindados para la realización de este proyecto.

A mi compañera de Maestría: Ivonne Sandoval, por su valiosa amistad e incondicional apoyo.

Al Maestro: Jonathan Coria por su valioso apoyo para el análisis estadístico del proyecto.

DEDICATORIAS

A Antonieta y Carlos A.

A Juan y León

RESUMEN

Los alimentos de origen pecuario y agrícola, son susceptibles a contaminarse durante su producción primaria, manejo y comercialización. Sin embargo, dada la tendencia entre los consumidores a preferir alimentos frescos, se ha incrementado la producción de alimentos mínimamente procesados, por lo que se han identificado nuevos riesgos sanitarios, destacando la presencia de patógenos emergentes como *Listeria monocytogenes*, bacteria mesófila que puede tolerar temperaturas de refrigeración y congelación inclusive por varios años. Por tal motivo, surge la necesidad de buscar nuevas medidas de control, como la bioconservación, mediante el uso de bacterias lácticas o sus metabolitos, debido a su capacidad de inhibir bacterias deteriorantes y patógenas en los alimentos, mejorando así la calidad sanitaria.

Algunos autores han reportado que la cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 es capaz de excretar diferentes sustancias a los sobrenadantes de cultivo, con actividad antibacteriana contra microorganismos asociados a enfermedades transmitidas por alimentos. En el presente trabajo se demostró el efecto inhibitorio de los sobrenadantes de cultivo de la cepa 8042 sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 mediante pruebas cualitativas y cuantitativas, así como el efecto lítico. Los sobrenadantes de fase media y tardía logarítmica se obtuvieron por centrifugación y se esterilizaron por filtración, la proteína se precipitó y cuantificó, se obtuvo el perfil electroforético, observando que las proteínas diferían en cada fase. En las pruebas de dilución en caldo se demostró el efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de proteínas del sobrenadante concentrado 10 veces por liofilización, provocando una disminución de 1 a 5 log UFC/mL de *L. monocytogenes* ATCC 15313 a las 24 horas de incubación, con respecto al control, determinándose la Concentración Inhibitoria Mínima de 0.043 mg/mL y de 0.045 mg/mL para la fase media y tardía, respectivamente. La actividad de Peptidoglicano hidrolasas se evidenció mediante zimografía *in situ* con *M. lysodeikticus* ATCC 4698 o *L. monocytogenes* ATCC 15313, visualizándose una banda de actividad lítica de alrededor de 75 kDa en los sobrenadantes de fase media y otras bandas de aproximadamente 20 y 25 kDa en los sobrenadantes de ambas fases y estos resultados probaron que el efecto antagonico de los sobrenadantes de *P. acidilactici* ATCC 8042 contra *L. monocytogenes* ATCC 15313 está dada por la producción de estas sustancias.

Palabras clave: Bacterias lácticas, *P. acidilactici*, *L. monocytogenes*, Antagonismo bacteriano, Actividad lítica, Sobrenadantes de cultivo.

ABSTRACT

Foods of animal and agricultural origin are susceptible to contamination during their primary production, handling and marketing. However, given the tendency among consumers to prefer fresh food, the production of minimally processed products has been increased, and so new health risks have been identified, highlighting the presence of emerging pathogens such as *Listeria monocytogenes*, mesophilic bacteria that can tolerate refrigeration and freezing temperatures even for several years. For this reason, the need arises to seek novel hurdles of control, such as biopreservation, through the use of lactic acid bacteria or their metabolites, due to their ability to inhibit deteriorating and pathogenic bacteria in food, thus improving the sanitary quality.

Some authors have reported that the strain of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 is capable of excreting different substances into cell free supernatants, with antibacterial activity against microorganisms associated with foodborne diseases. In the present work was demonstrated the inhibitory effect of cell free supernatants of strain 8042 over *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, through qualitative and quantitative tests, as well as the lytic effect. Middle and late log phase growth supernatants were obtained by centrifugation and sterilized by filtration, the protein precipitated and quantified, the electrophoretic profile was obtained, observing that the proteins differed in each growth phase. In the broth dilution tests, the inhibitory effect of different protein concentration ten times by freeze-dry of the cell free supernatant was demonstrating, causing a decrease of 1 to 5 log CFU/mL of *L. monocytogenes* ATCC 15313 at 24 hours of incubation, with respect to the control, determining the Minimum Inhibitory Concentration of 0.043 mg / mL and 0.045 mg / mL for the middle and late phases, respectively. Peptidoglycan hydrolases activity of supernatants was evidenced by *in situ* zymography with *M. lysodeikticus* ATCC 4698 or *L. monocytogenes* ATCC 15313, with a band of lytic activity of about 75 kDa in the middle phase supernatants and other bands of approximately 20 and 25 kDa in the supernatants of both phases and these results proved that the antagonistic effect of *P. acidilactici* ATCC 8042 supernatants against *L. monocytogenes* ATCC 15313 is given by this substances.

Key words: Lactic acid bacteria, *P. acidilactici*, *L. monocytogenes*, Bacterial antagonism, Cell free supernatants, Lytic activity.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS-----	II
RESUMEN -----	V
ABSTRACT -----	VI
ÍNDICE DE CUADROS-----	X
ÍNDICE DE FIGURAS -----	X
ABREVIATURAS -----	XII
INTRODUCCIÓN-----	1 -
1. REVISIÓN DE LA LITERATURA -----	3 -
1.1 Inocuidad de los alimentos -----	3 -
1.1.1 Tendencias en el consumo de alimentos -----	3 -
1.1.2 Alimentos mínimamente procesados y listos para su consumo-----	4 -
1.1.3 Bioconservación como estrategia tecnológica-----	5 -
1.2 Microecología de los alimentos -----	6 -
1.2.1 Factores intrínsecos y extrínsecos-----	6 -
1.2.2 Tecnología de barreras-----	7 -
1.3 Patógenos emergentes-----	7 -
1.3.1 Importancia sanitaria-----	8 -
1.3.2 Patógenos emergentes de importancia en la salud pública-----	9 -
1.4 <i>Listeria monocytogenes</i> -----	10 -
1.4.1 <i>Listeria monocytogenes</i> asociado a cadena de proceso y comercialización --	10 -
1.4.2 Aspectos epidemiológicos-----	11 -
1.4.2.1 Listeriosis-----	12 -
1.4.2.2 Serotipos -----	13 -
1.4.3 <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 -----	13 -
1.5 Antagonismo bacteriano-----	13 -
1.5.1 Bacterias Lácticas -----	14 -
1.5.1.1 Herramientas metabólicas con actividad antibacteriana -----	15 -
1.5.1.1.1 Ácidos orgánicos -----	15 -
1.5.1.1.2 Bacteriocinas -----	16 -
1.5.1.1.3 Actividad lítica-----	17 -
1.5.1.1.4 Otros metabolitos producidos por Bacterias Lácticas -----	18 -
1.6 <i>Pediococcus acidilactici</i> -----	18 -
1.6.1 Sustancias antibacterianas producidas por <i>P. acidilactici</i> -----	19 -
1.6.2 <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042-----	19 -
1.6.2.1 Proteasas producidas por <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042-----	19 -
1.7 Pruebas <i>in vitro</i> para evaluar antibiosis-----	21 -
1.7.1 Pruebas de punto final -----	21 -

1.7.2 Pruebas descriptivas-----	22 -
1.7.2.1 Concentración Inhibitoria Mínima y Concentración Bactericida Mínima-	23 -
1.7.3 Zimografía <i>in situ</i> para detección de actividad lítica -----	24 -
ANTECEDENTES -----	24 -
JUSTIFICACIÓN-----	26 -
HIPÓTESIS-----	26 -
OBJETIVOS-----	27 -
Objetivo general-----	27 -
Objetivos particulares -----	27 -
2. MATERIAL Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL -----	28 -
2.1. Microorganismos -----	29 -
2.2. Medios de cultivo-----	29 -
2.2.1 Medio MRS para el cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042-----	29 -
2.2.2 Medio BHI para el cultivo de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313 -----	30 -
2.3. Reactivación de cepas-----	33 -
2.3.1. Reactivación de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 y verificación de pureza-----	33 -
2.3.2. Reactivación de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 y verificación de pureza--	33 -
2.3.3. Tinción de Gram de ambas cepas -----	33 -
2.4. Identificación molecular de las cepas-----	34 -
2.4.1 Identificación de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 mediante PCR-----	34 -
2.4.1.1. Extracción de ADN de <i>P. acidilactici</i> 8042 -----	34 -
2.4.1.2. Condiciones empleadas para la amplificación de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 mediante PCR-----	35 -
2.4.1.3. Análisis de productos de PCR mediante Electroforesis-----	36 -
2.4.2. Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313 mediante PCR -----	37 -
2.4.2.1. Extracción de ADN de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 -----	37 -
2.4.2.2. Condiciones empleadas para la amplificación de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313 mediante PCR-----	38 -
2.4.2.3 Electroforesis para el análisis de los productos de PCR -----	39 -
2.5. Criopreservación de las cepas-----	39 -
2.5.1. Criopreservación de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042-----	39 -
2.5.2. Criopreservación de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 -----	39 -
2.6. Cinéticas de crecimiento bacteriano -----	40 -
2.6.1. Cinética de crecimiento de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 -----	40 -
2.6.2. Cinética de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313-----	41 -
2.6.3. Determinación de parámetros de crecimiento de ambas cepas-----	41 -
2.7. Caracterización del sobrenadante de cultivo de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 con actividad bacteriana-----	44 -
2.7.1. Obtención de Sobrenadantes del cultivo de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 -----	44 -

2.7.2. Determinación de concentración de proteínas del sobrenadante-----	45 -
2.7.3. Determinación de proteínas del sobrenadante por electroforesis en gel SDS- PAGE -----	45 -
2.7.4. Pruebas de actividad antibacteriana -----	46 -
2.7.4.1 Preparación del microorganismo susceptible-----	47 -
2.7.4.2 Pruebas de difusión en agar -----	47 -
2.7.4.3 Curva de inhibición o muerte -----	50 -
2.8. Evaluación de actividad lítica del sobrenadante por técnicas zimográficas -----	52 -
3. RESULTADOS -----	54 -
3.1 Verificación de la pureza de las cepas -----	54 -
3.1.1 Morfología colonial y tinción de Gram de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 ---	54 -
3.1.2. Morfología colonial y tinción de Gram de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 -	55 -
3.2 Identificación molecular de las cepas mediante PCR -----	55 -
3.2.1 Identificación mediante PCR de la cepa de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 -----	55 -
3.2.2 Identificación mediante PCR de la cepa de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 -	56 -
3.3 Cinéticas de crecimiento de las cepas problema -----	57 -
3.3.1 Cinética de crecimiento de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 -----	57 -
3.3.2 Cinética de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313 -----	58 -
3.4 Caracterización de los sobrenadantes de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042-----	59 -
3.4.1 Cuantificación de proteína por Método de Bradford -----	59 -
3.4.2 Perfil electroforético (SDS-PAGE) de los sobrenadantes -----	60 -
3.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de cultivo de <i>P.</i> <i>acidilactici</i> ATCC 8042-----	62 -
3.5.1 Pruebas de difusión en agar -----	62 -
3.5.2 Pruebas de dilución en caldo-----	63 -
3.6. Determinación de actividad lítica de los sobrenadantes de cultivo de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 -----	69 -
3.6.1 Zimograma copolimerizado con <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313-----	69 -
3.6.1.1 Zimograma <i>in situ</i> con proteína de sobrenadante de cultivo de fase media logarítmica de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042-----	70 -
3.6.1.2 Zimograma <i>in situ</i> con proteína de sobrenadante de cultivo de fase tardía logarítmica de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042-----	71 -
DISCUSIÓN-----	73 -
CONCLUSIONES-----	78 -
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	80 -
ANEXOS-----	93 -

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Formulación de medio MRS modificado y Agar MRS comercial	- 30 -
Cuadro 2. Secuencia y posición de primers utilizados en la amplificación de <i>P. acidilactici</i>	- 35 -
Cuadro 3. Parámetros cinéticos de ambas cepas bacterianas	- 59 -
Cuadro 4. Concentración de proteína de los sobrenadantes de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 en fase media y tardía logarítmica	- 60 -
Cuadro 5. Masa molecular relativa expresada en kDa.....	- 61 -
Cuadro 6. Micrométodo para la cuantificación de proteínas con el reactivo de Bradford	- 93 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético de los principales grupos de BL basado en el análisis comparativo de secuencias del ARN ribosomal 16S	- 15 -
Figura 2. Mecanismo de acción de las bacteriocinas	- 17 -
Figura 3. Representación esquemática del sitio de reconocimiento de las peptidoglicano hidrolasas	- 20 -
Figura 4. Resumen metodológico	- 28 -
Figura 5. Resumen metodológico del objetivo 1	- 32 -
Figura 6. Condiciones empleadas para la amplificación de los genes de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	- 36 -
Figura 7. Condiciones empleadas para la amplificación de los genes del género <i>Listeria</i> y la especie <i>monocytogenes</i>	- 38 -
Figura 8. Resumen metodológico del objetivo 2	- 43 -
Figura 9. Resumen metodológico del objetivo 3	- 49 -
Figura 10. Resumen metodológico del objetivo 4	- 51 -
Figura 11. Morfología colonial (a) y tinción de Gram de <i>P. acidilactici</i> ATCC 4082 (b).....	- 54 -
Figura 12. Morfología colonial (a) y tinción de Gram de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 (b)	- 55 -
Figura 13. Electroforesis en gel para la amplificación de los productos de PCR para la identificación molecular de <i>P. acidilactici</i> y <i>L. monocytogenes</i>	- 56 -
Figura 14. Cinética de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	- 57 -
Figura 15. Cinética de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	- 58 -
Figura 16. Perfil electroforético de las proteínas de sobrenadantes (SDS-PAGE).....	- 60 -

Figura 17. Prueba de difusión con pozos en capa suave de Agar BHI al 0.6% inoculado con <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 estandarizada	- 63 -
Figura 18. Curva de inhibición de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 frente a diferentes cantidades de proteína de sobrenadante de cultivo de 6 h de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042.....	- 64 -
Figura 19. Curva de inhibición de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 frente a diferentes cantidades de proteína de sobrenadante de cultivo de 8 h de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042.....	- 65 -
Figura 20. Análisis de resultados de prueba de dilución en caldo	- 67 -
Figura 21. Análisis estadístico en MINITAB, del efecto de las variables combinadas sobre las UFC/mL.....	- 68 -
Figura 22. Gel SDS-PAGE copolimerizado y proteína de sobrenadante de cultivo de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 de 6h	- 70 -
Figura 23. Gel SDS PAGE copolimerizado y proteína de sobrenadante de cultivo de 8 h. SDS-PAGE al 12% copolimerizados	- 71 -
Figura 24. Curva patrón de Albúmina Sérica Bovina por el método de Bradford	- 96 -
Figura 25. Curva para determinar la Masa molecular relativa por interpolación	- 96 -

ABREVIATURAS

±: más-menos

ATCC: American Type Culture Collection

BL: Bacteria Láctica

BHI: Brain Heart Infusion (Infusión Cerebro Corazón)

BSA: Bovine Serum Albumin (Albúmina de Suero Bovino)

°C: grados centígrados

CBM: Concentración Bactericida Mínima

CDC: Center for Disease Control

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

D.O: Densidad Óptica

ETA: Enfermedad Transmitida por Alimentos

g: gramos

FDA: Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)

GRAS: Generally Recognized As Safe (generalmente reconocidos como seguros)

h: Horas

kDa: kilodaltones

L: Litro

log: logaritmos

meq: miliequivalentes

mg: miligramo

mL: mililitro

mm: milímetros

mM: milimolar

MPM: Marcador de Peso Molecular

MRS: Medio MRS (De Man, Rogosa y Sharpe)

MRS m: Medio MRS modificado

NCCLS: National Committee on Clinical Laboratory Standards

nm: nanómetro

N: Normalidad

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPAS Organización Panamericana de la Salud

PAGE: Polyacrylamide Gel

Electrophoresis (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida)

pb: pares de bases

PBS: Solución Buffer Fosfato

PGH: Peptidoglicano hidrolasa

PCR: Polimerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Rf: Masa molecular relativa

rpm: revoluciones por minuto

RTE : Ready To Eat (listos para su consumo)

SDS: Sodium Duodecyl Sulphate (Duodecil Sulfato de Sodio)

STEC: Shiga-toxin *Escherichia coli* (*E. coli* productora de toxina Shiga)

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

v/v: volumen/ volumen

w/v: peso/ volumen

μL: microlitro

μg: microgramo

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son un problema de salud pública en todo el mundo. Uno de los principales patógenos emergentes reportados es *Listeria monocytogenes* (CDC, 2009). La mayoría de los casos de listeriosis transmitida por alimentos, son causados por alimentos mínimamente procesados o listos para su consumo “ready-to-eat” (Tompkin, 2002), tales como leches, derivados lácteos como quesos frescos, mantequillas y cremas, crustáceos cocidos, productos de mar ahumados, vegetales, frutas ácidas y otros alimentos como salchichas, patés, perros calientes, salamis, jamones cocidos, rollos de carne, carnes cortadas en porciones, carnes molidas, hamburguesas, *nuggets* de pollo, jamón, *pizzas*, sándwiches y ensaladas (Muñoz *et al.*, 2011). El consumo de este tipo de alimentos ha aumentado notablemente, debido a los nuevos estilos de vida, sin embargo los alimentos “ready-to-eat” son consumidos sin un tratamiento adicional, que pueda eliminar o reducir la carga microbiana (Yang *et al.*, 2016). Por otro lado en alimentos mínimamente procesados, la refrigeración es generalmente el principal factor utilizado para el control de patógenos, sin embargo los patógenos psicrótrofos como *Listeria monocytogenes*, pueden crecer en alimentos refrigerados (Välimaa *et al.*, 2015; Tompkin, 2002).

Listeria monocytogenes es un contaminante ubicuo del ambiente, agente causal de listeriosis, enfermedad de baja prevalencia pero de gran preocupación en la seguridad de alimentos por su alta tasa de mortalidad, tiene un gran impacto en la salud de los consumidores además de las pérdidas económicas en la industria alimentaria (Kapetanakos, 2016). Además es capaz de sobrevivir y crecer en una gran variedad de alimentos, superficies y equipos (Stratakos *et al.*, 2016).

En este sentido, el creciente interés de los consumidores en los alimentos con mínimo procesamiento, sabor natural o listos para su consumo, ha llevado a la industria alimentaria a centrarse en la aplicación de tecnologías alternativas e innovadoras para el desarrollo de productos frescos de calidad, sin comprometer la seguridad alimentaria, tales como el uso de bacterias lácticas y sus metabolitos (Kapetanakos *et al.*, 2016).

Las bacterias lácticas (BL) han sido utilizadas en la elaboración de alimentos fermentados, con el objetivo de proporcionar sabor, color y aroma característicos (Messens y De Vuyst 2002), además poseen la capacidad de producir biocompuestos que pueden inhibir el crecimiento de microorganismos, por lo que estas bacterias y sus metabolitos son utilizados como bioconservadores en la industria alimentaria contra microorganismos deteriorantes y patógenos, como alternativas a los métodos de conservación químicos tradicionales (Botina, 2008).

Se ha estudiado la cepa de la BL *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, debido a su capacidad de inhibir a otros microorganismos al adicionarse como cultivo iniciador en la fermentación de productos cárnicos (Rivera-Quiroz, 2004), así como en estudios *in vitro* se ha demostrado que la cepa produce varias hidrolasas que actúan sobre sustratos proteicos y sobre el peptidoglicano de la pared celular de bacterias Gram positivas (Llorente 2008). Martínez-Trejo (2011), mediante pruebas de actividad antimicrobiana, tales como difusión en agar y dilución en agar, probó el efecto inhibitorio de los sobrenadantes de cultivo de la cepa de *P. acidilactici* frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Siguiendo esta línea de investigación Munguía-Villavicencio (2015) demostró actividad de peptidoglicano hidrolasa en los sobrenadantes de la cepa frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, bacteria Gram negativa.

En este sentido, en la presente investigación se continuó con la evaluación del efecto antagónico de los sobrenadantes de la cepa ATCC 8042, sobre el crecimiento de la bacteria patógena *Listeria monocytogenes* ATCC 15313.

1. REVISIÓN DE LA LITERATURA

1.1 Inocuidad de los alimentos

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la inocuidad de los alimentos engloba acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos. Las políticas y actividades que persiguen dicho fin, abarcan toda la cadena alimentaria, desde la producción primaria hasta el consumo final, resaltando los controles clave de higiene necesarios en cada etapa (FAO, 2002).

Entre las definiciones de Inocuidad Alimentaria destaca “La garantía de que los alimentos no causarán daño al consumidor cuando se preparen y consuman de acuerdo con el uso al que se destinen” (*Codex Alimentarius*, 2009).

Un alimento inocuo y apto para consumo es aquel que no está descompuesto o contaminado, dicha contaminación puede ser por patógenos microbianos, virus, parásitos, productos químicos, cuerpos extraños y materias indeseables (FAO, 2002; *Codex Alimentarius* 2009).

1.1.1 Tendencias en el consumo de alimentos

En las últimas décadas se han producido cambios drásticos, por la multiplicidad de factores que han influido en los estilos de vida y en los patrones de consumo alimentario de la población (FAO/OMS, 1997)

Con el crecimiento de las poblaciones urbanas, se han generado cambios en los hábitos de consumo de alimentos, abandonando los alimentos muy procesados, en favor de los más frescos o mínimamente procesados, ya que los consumidores los consideran superiores desde el punto de vista nutricional (OMS/OPAS, 2015).

De igual manera junto con el aumento de los ingresos y poder adquisitivo de los consumidores, también ha aumentado la demanda de alimentos ya preparados y listos para su consumo, que responden a su vez a los cambios de estilos de vida, debido a la facilidad de acceso (FAO, 2000; OMS, 2015; FAO/OMS, 1997).

1.1.2 Alimentos mínimamente procesados y listos para su consumo

De acuerdo a la clasificación del sistema NOVA, los Alimentos mínimamente procesados son alimentos sin procesar que se alteran de maneras tales que no se agrega o introduce ninguna sustancia nueva (como grasas, azúcares o sal), pero que pueden implicar que se eliminen ciertas partes del alimento. Estos alimentos pueden ser de origen vegetal (hojas, tallos, raíces, tubérculos, frutos, semillas) o animal (carne u otros tejidos y órganos, huevos, leche) y son distribuidos poco después de la cosecha, recolección, matanza o crianza (OMS/OPAS, 2015).

Los procesos que incluyen son el limpiado, lavado, cepillado, descascarado, pelado, molienda, ralladura, corte, desmenuzamiento, deshuese, secado, descremado, pasteurizado, esterilizado, enfriamiento, refrigeración, congelamiento, embotellamiento, cobertura, empaquetado al vacío, asimismo la fermentación mediante añadidura de microorganismos, siempre y cuando no genere alcohol (OMS/OPAS, 2015).

Como ya se mencionó, cada vez es más frecuente el consumo de alimentos preparados, lo que ha provocado que la industria alimentaria transforme alimentos ya procesados, tanto de origen vegetal como animal, en alimentos listos para el consumo, que pueden consumirse sin ningún tratamiento térmico adicional, lo que ha incrementado su popularidad (Rodríguez, *et al.*, 2010)

La FAO/OMS (1998) define a los alimentos listos para su consumo como cualquier alimento (incluidas las bebidas) que se consuma normalmente en estado crudo o cualquier alimento

manipulado, elaborado, mezclado, cocido o preparado de otra manera sin ninguna manipulación ulterior.

Estas tendencias en la demanda de alimentos, es decir, la característica de ser alimentos mínimamente procesados o listos para su consumo, la inocuidad, el valor nutricional, la aceptación sensorial de los mismos, obligan a la búsqueda de nuevos sistemas y técnicas que permitan asegurar el suministro de alimentos inocuos a los consumidores (OMS, 2015).

1.1.3 Bioconservación como estrategia tecnológica

Una primera aproximación para garantizar la seguridad de los alimentos es prevenir su contaminación durante la producción. La aplicación de tecnologías alimentarias es esencial para prevenir las enfermedades de transmisión por alimentos ya que son eficaces tanto para el control de microorganismos patógenos como deteriorantes, por lo que se aplican con el objetivo de asegurar la alimentación y la extensión de la vida útil de los productos alimenticios (OMS, 1995).

La bioconservación es una tecnología natural para la preservación de los alimentos, la cual consiste en la inoculación del alimento con microorganismos con propiedades antibacterianas (Leroi *et al.*, 2015). Se define como la extensión en la vida de anaquel y la mejora de la seguridad de los alimentos utilizando microbiota natural o controlada y sus productos antibacterianos que producen naturalmente (Hugas, 1998).

En la bioconservación de alimentos se incluyen desde técnicas utilizadas para obtener alimentos más seguros hasta la generación de alimentos mínimamente procesados y sin aditivos. Las metodologías de bioconservación más comúnmente utilizadas en alimentos son: la adición de cultivos puros de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas; agregar preparaciones crudas de bacteriocinas, licor de fermentación o concentrados; adición de sustancias antagonistas purificadas o semi-purificadas y la adición de bacterias lácticas mesófilas que actúan cuando se rompe la cadena fría (Hugas, 1998).

Las bacterias lácticas constituyen parte de la microbiota inicial de los alimentos y pueden producir un rango amplio de compuestos antimicrobianos: sustancias proteicas y ácidos grasos que pueden inhibir o reducir la microbiota indeseable en productos alimenticios (Hugas, 1998).

1.2 Microecología de los alimentos

Existen muchos factores que influyen en el crecimiento de microorganismos en el alimento, entre ellos, los que se encuentran relacionados con las características propias del alimento, es decir, los factores intrínsecos, mismos que, al interactuar con los factores extrínsecos, determinan la microecología de los alimentos (Adams y Moss, 2008). De esta manera el alargamiento de la vida de anaquel y el mantener las características organolépticas de los alimentos, están asociados a un gran número de factores interrelacionados, es decir, la microbiota del alimento, los factores intrínsecos y los extrínsecos a él (Zhou *et al.*, 2010).

El ambiente que rodea al alimento, desde su origen en la producción primaria hasta que llega al consumidor, después de los procesos de transformación, ejerce una influencia decisiva para obtener un ambiente inocuo, libre de contaminantes que puedan dañar la salud (FAO, 2009). Es posible que un alimento sufra alguna contaminación no intencional, es decir, se pueden encontrar componentes naturales del propio alimento, toxinas bacterianas, productos derivados del procesamiento del alimento y de la contaminación ambiental, como pesticidas o fertilizantes, entre otros (Rodríguez, 2011).

1.2.1 Factores intrínsecos y extrínsecos

El control de los factores físicos, químicos, bioquímicos y microbiológicos, es esencial para la preservación, inocuidad y calidad de los alimentos. Los factores principales que afectan la sobrevivencia y el crecimiento microbiano se pueden clasificar de la siguiente forma:

- a) Factores intrínsecos: aquellos factores químicos y físicos que actúan dentro del alimento (nutrientes, pH, actividad del agua (A_w), potencial Redox (Eh), viscosidad, presencia de conservadores y otras sustancias antimicrobianas, microestructura, etc.)
- b) Factores extrínsecos (temperatura, humedad relativa, presión parcial de oxígeno, características de envasado, almacenamiento, distribución y condiciones de mostrador etc.) (Castellano *et al.*, 2008).

1.2.2 Tecnología de barreras

Los métodos de conservación tradicionales como congelación, pasterización, esterilización, deshidratación, están basados en la manipulación uno o más de los factores ya mencionados. En la actualidad, se busca la combinación de dos o más factores que interaccionen aditiva o sinérgicamente controlando a la población microbiana, evitando la aplicación de un solo factor de conservación en forma severa, lo que mejora la calidad nutrimental y sensorial del alimento, permitiendo el procesamiento de productos más frescos y sanos, con menos aditivos y listos para preparar y servir. A esta combinación de factores se le ha denominado tecnología de obstáculos o factores combinados (Leistner, 1992).

La tecnología de obstáculos o tecnología de barreras implica la utilización de diferentes técnicas de conservación, dentro de las que sobresalen los tratamientos térmicos, aditivos químicos, empaques en atmósferas modificadas, almacenamiento a bajas temperaturas, campo de pulsos eléctricos, entre otros (Escobar *et al.*, 2014, Gálvez *et al.*, 2010).

1.3 Patógenos emergentes

Los microorganismos son capaces de adaptarse y evolucionar para sobrevivir a los diversos estímulos del ambiente en el que se desarrollan, es decir, a los nuevos modos de producción, conservación y envasado de los alimentos, lo que ha dado lugar a nuevos peligros para la

inocuidad incluso con las modernas técnicas de conservación (Gram *et al.*, 2002; Escobar *et al.*, 2014).

Un patógeno emergente se define como aquel que causa enfermedades en una nueva población o cuya incidencia ha ido aumentando a través de las últimas dos décadas (Adams y Moss, 2008).

Así, en las últimas décadas, varios microorganismos como bacterias, virus, parásitos y aflatoxinas se han convertido en causas potenciales de enfermedad transmitida por los alimentos. La creciente demanda de alimentos frescos, la tendencia hacia la elaboración mínima de los alimentos, la forma en que se envasan los alimentos, el mayor período de almacenamiento, las dificultades para combatir los peligros durante la producción han disminuido consigo la capacidad de combatir organismos tales como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp* y *Campylobacter jejuni*, microorganismos que han aparecido y vuelto a aparecer. Algunas bacterias relativamente desconocidas se han identificado como causas importantes de enfermedades alimentarias, por ejemplo, *Vibrio parahaemolyticus* y *Yersinia enterocolitica* (FAO/OMS, 2003; CDC, 2013).

1.3.1 Importancia sanitaria

Según la OMS (2007), casi el 75% de enfermedades en los últimos años son causadas por patógenos en productos de origen animal y ya que los patógenos no reconocen las fronteras internacionales, representan un gran desafío para el gobierno, así como para la salud pública.

Las nuevas formas de producción de alimentos y su comercialización, la presencia de aditivos químicos y residuos de fármacos agroquímicos y veterinarios, como el uso y abuso de antibióticos en la producción animal que posee un riesgo adicional de resistencia bacteriana, constituyen un gran peligro para la seguridad alimentaria (Castellano *et al.*, 2008).

En este sentido, organismos internacionales como la FAO y la OMS han buscado introducir un enfoque integrado para la bioseguridad que armonice las políticas y la legislación para mejorar la gestión de los riesgos relacionados con la alimentación y la agricultura (OMS, 2007).

1.3.2 Patógenos emergentes de importancia en la salud pública

Como ya se ha mencionado, estos microorganismos patógenos se presentan como consecuencia en cambios ecológicos o a consecuencia de avances tecnológicos:

- a) *Salmonella enterica* variedad Thyphimurium DT104 es un patógeno intestinal de gran importancia en salud pública. DT104 está ampliamente distribuido en el ganado y aves de corral principalmente y su incidencia en humanos está aumentando en infección por contacto o por ingerir leche sin pasteurizar. Microorganismo resistente a antibióticos, principalmente ampicilina, estreptomycinina y tetraciclina, por lo que más de un tercio de las personas infectadas requieren hospitalización, y aproximadamente el 3% de los casos son de consecuencias mortales (Rajashekara *et al.*, 2000; FAO/OMS, 2003).
- b) *Escherichia coli* O157:H7 enterohemorrágica, productor de toxina Shiga (STEC por sus siglas en inglés), se ha convertido en importante patógeno transmitido por los alimentos. Fue reconocido en 1982, pero los métodos de detección suficientemente sensibles no están aun ampliamente disponibles en la mayoría de los laboratorios, por lo que las infecciones no son confirmadas, obstaculizando así los progresos en la identificación de sus reservorios y fuentes (FAO/OMS, 2003; *Codex Alimentarius*, 2004).
- c) *Listeria monocytogenes* es un patógeno intracelular, capaz de invadir a los macrófagos. Agente causal de listeriosis, considerado como un patógeno emergente debido a que a pesar de ser un microorganismo mesófilo, que se ha recuperado de alimentos almacenados en refrigeración a 5°C y en alimentos congelados (Carpentier y Cerf, 2011).

- d) *Campylobacter jejuni* es la principal causa de infecciones entéricas en la mayoría de los países desarrollados, elevándose la tasa de campilobacteriosis en niños menores a 2 años de edad que causa alta morbilidad y eventualmente mortalidad. *C. jejuni* se asocia a las aves de corral principalmente, a carne de vaca, de cerdo, lácteos y derivados, pescados y derivados, vegetales frescos y alimentos envasados con atmósfera modificada (FAO, 2000).

1.4 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es un bacilo Gram positivo, facultativo intracelular, anaeróbico, no esporulado, puede estar solo o formando cadenas cortas, y crece a temperaturas de 0 a 45 °C, con temperatura óptima de 30 a 37 °C; sobrevive a temperaturas de refrigeración o congelación (psicrótrofo) y es capaz de desarrollarse a pH de 4.4 a 9.6, siendo el óptimo 7.5. Así mismo, crece en concentraciones altas de NaCl (10 %w/v) (Wilson y Salyers, 2002; Winkelströter *et al.*, 2015).

1.4.1 *Listeria monocytogenes* asociado a cadena de proceso y comercialización

En años recientes se han presentado brotes de enfermedades alimentarias causadas por *Listeria monocytogenes* en varias partes del mundo. *L. monocytogenes* sobrevive a procesos tradicionales que normalmente se utilizan en la conservación de alimentos y además puede persistir en diferentes entornos de procesamiento de alimentos (Zhang *et al.*, 2010).

A pesar de que son muchos y diversos los alimentos que pueden contaminarse con *L. monocytogenes*, las epidemias y los casos esporádicos de listeriosis están asociados a alimentos listos para consumo y mínimamente procesados, los cuales pueden ser contaminados durante y después de su procesamiento ya que la bacteria es capaz de sobrevivir a pH bajo (menos a 4.4), altos valores de a_w (0.83) y temperaturas de refrigeración y aunque fácilmente muere con técnicas estándar de cocción (70°), estos alimentos son una oportunidad esencial para la multiplicación y propagación del patógeno, debido a un

tratamiento térmico posterior insuficiente, por lo que el control del crecimiento de *L. monocytogenes* en este tipo de alimentos, es importante para la industria alimentaria (FDA, 2014; Dussault *et al.*, 2015).

L. monocytogenes se ha aislado de alimentos como leche líquida cruda y pasteurizada, quesos helados, hortalizas crudas, embutidos fermentados de carne cruda o cocida, carne de ave cruda o cocida, carnes crudas, y productos del mar crudos y ahumados (FAO/OMS, 2004).

1.4.2 Aspectos epidemiológicos

La alta capacidad de *L. monocytogenes* de sobrevivir en presencia de varios factores de estrés ambiental, como el calor, el frío, la sal, la alta osmolaridad y condiciones ácidas; su distribución amplia en el ambiente; su capacidad para formar biopelículas sobre superficies bióticas y abióticas, incluyendo acero inoxidable, caucho, vidrio y polipropileno, le permiten su introducción al entorno del procesamiento y la contaminación de alimentos por contacto con equipo, drenajes y otras instalaciones. *L. monocytogenes* se ha aislado de diversas fuentes, como tierra, vegetación, ensilados, materia fecal, aguas y aguas negras (Castellano, *et al.*, 2014; Caballero *et al.*, 2013; FDA, 2014; Winkelströter *et al.*, 2015).

Es un microorganismo oportunista, afecta a mujeres embarazadas, neonatos, personas mayores e individuos con depresión del sistema inmunológico; además 5 a 10% de humanos sanos son portadores asintomáticos del microorganismo (FAO/OMS, 2004).

Listeria monocytogenes cuenta con diversos factores de virulencia envueltos en el ciclo intracelular del microorganismo, tales como adhesinas (Lap, FbpA, LapB, InlJ); proteínas de invasión (InlA y InlB). Factores involucrados en la colonización como la toxina, listeriolisina O (LLO); dos fosfolipasas, fosfatidilinositol-PLC (PI-PLC) y fosfatidilcolina-PLC (PC-PLC) y factores accesorios como la proteína p60; mediadores de respuesta al estrés; enzimas superóxido dismutasa y catalasa, y una proteína ActA para evitar la autofagia (Wilson y Salyers, 2002).

1.4.2.1 Listeriosis

La listeriosis, aunque es una enfermedad poco común, es una enfermedad grave, con una morbilidad de 10% y una mortalidad de 20-30%, situándose entre las enfermedades transmitidas por alimentos de mayor relevancia social y económica (representando grandes pérdidas en la industria alimentaria) (FAO/OMS, 2004; Gahan y Hill, 2005).

Los brotes de listeriosis son difíciles de detectar, ya que los casos relacionados son geográficamente y temporalmente dispersos, detectándose principalmente en los países industrializados, posiblemente debido a las costumbres alimentarias y medios de conservación de los alimentos (Nucera, 2010). En general, los alimentos implicados han presentado concentraciones de *L. monocytogenes* superiores a 10^3 CFU/g (FAO/OMS, 2004), pero en algunos casos la concentración observada ha sido considerablemente menor, 10^2 UFC/g (Dos Santos *et al.*, 2007), esto aunque el límite vigente de *L. monocytogenes* en alimentos listos para su consumo sea de 0.04 UFC/g (FAO/OMS, 2004).

Las diversas manifestaciones clínicas asociadas a la listeriosis pueden agruparse en dos categorías: listeriosis invasiva y listeriosis no invasiva. La listeriosis invasiva se produce cuando el patógeno atraviesa la barrera intestinal y alcanza sistemas y órganos que son blanco de infección, como el sistema nervioso central, el útero grávido o la sangre, ocasionando meningitis, bacteremias, septicemias, meningoencefalitis, absceso cerebral o espinal y tromboencefalitis. La listeriosis invasiva se caracteriza por una tasa de letalidad alta y las infecciones pueden producir secuelas (FAO/OMS, 2004).

Los casos de listeriosis no invasiva (conocida como gastroenteritis febril por listerias) se manifiestan por síntomas de gastroenteritis, como diarrea, fiebre, cefalea y mialgias, tras un periodo de incubación corto. Estos brotes se han producido generalmente tras la ingestión de dosis altas de *L. monocytogenes* por personas previamente sanas (Wilson y Salyers, 2002; Gahan y Hill, 2005; FAO/OMS, 2004).

1.4.2.2 Serotipos

Al parecer, todas las cepas de *L. monocytogenes* son patógenas: sin embargo, la virulencia relativa de aislados individuales de *L. monocytogenes* pueden variar considerablemente. Existen alrededor de 13 serotipos de *L. monocytogenes*, sin embargo la mayoría de los casos de listeriosis se asocia a un número limitado de serotipos 4b, 1/2a y 1/2b, que son los causantes de más del 95% de los casos de listeriosis humana y en menor porcentaje los serotipos 1/2c, 3 y 4 (Martín, 2014). Los serotipos predominantes 1/2a, 1/2b y 4b se han identificado en humanos por ingesta de quesos, carne, helado y pescado (Sim, 2002).

1.4.3 *L. monocytogenes* ATCC 15313

Es una cepa patógena, serotipo 1/2a, no hemolítica, crece en medio de cultivo BHI (Brain Heart Infusion) a una temperatura de 37°C.

Se recomiendan las prácticas, equipo de contención y las instalaciones de Bioseguridad Nivel 2 cuando se trabaja con cultivos del agente, deben usarse guantes y protección ocular cuando manipulen materiales infectados. Si bien la ingestión es la vía de exposición más común, la cepa también puede causar infecciones oculares y cutáneas por contacto directo. Debido a los posibles riesgos para el feto, las mujeres embarazadas deben ser advertidas del riesgo de exposición a la cepa (ATCC, 2015; CDC, 2009).

1.5 Antagonismo bacteriano

El antagonismo microbiano es una relación negativa; es la inhibición, deterioro o muerte de un microorganismo por acción de otro. Hasta ahora, los mecanismos de acción que se conocen involucran: la antibiosis, producción de enzimas líticas, parasitismo, competencia por los nutrientes y espacio e inducción de resistencia (Hernández, 2007; Janisiewicz y Korsten, 2002).

Algunas Bacterias Lácticas, con propiedades antimicrobianas demostradas generalmente asociadas a alimentos, han sido probadas para incrementar la inocuidad y prolongar la vida de anaquel de los alimentos debido a sus propiedades antagonistas que derivan de la competencia de nutrientes y de la producción de metabolitos antimicrobianos (Ananou *et al.*, 2007).

1.5.1 Bacterias Lácticas

Las BL son cocos o bacilos, Gram positivas, no esporuladas, no móviles, consideradas mesófilas pero pueden crecer en rangos entre 4 y 45°C, son ácido tolerantes (la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5 (Carr *et al.*, 2002; Magnusson, 2003).

Las Bacterias Lácticas consideradas por la FDA (Food and Drug Administration) como ingredientes con *status* GRAS (Generally Recognized As Safe) son usadas en la bioconservación de alimentos como cultivos protectores, destacándose por su producción de ácido láctico y otros metabolitos relacionados con fenómenos de antagonismo, que son capaces de controlar e inhibir el crecimiento de bacterias no deseadas, tanto patógenas como deteriorantes (Caplice, 1999). Han sido además, utilizadas en la elaboración de alimentos fermentados, con el objetivo de proporcionar sabor, color y aroma característicos durante la fermentación, lo que es muy apreciado por el consumidor (Holzapfel, 1995).

El grupo de bacterias lácticas asociadas con los alimentos incluyen los géneros: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (Figura 1) (Caplice, 1999; Ananou *et al.*, 2007).

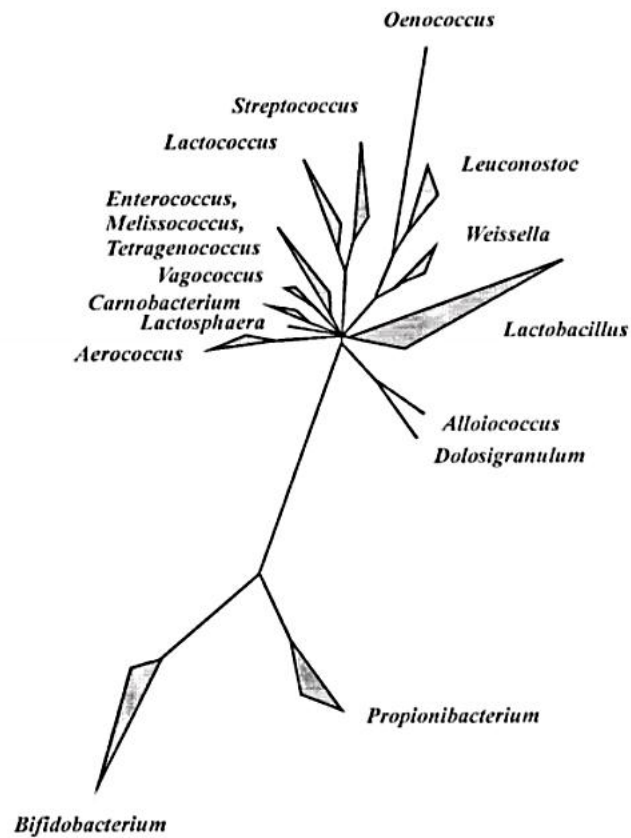


Figura 1. Árbol filogenético de los principales grupos de BL basado en el análisis comparativo de secuencias del ARN ribosomal 16S

Fuente: Holzapfel *et al.*, 2001

1.5.1.1 Herramientas metabólicas con actividad antibacteriana

Los mecanismos de las BL implicados en la interferencia microbiana incluyen la competencia de nutrientes, competencia por los sitios de adherencia, la generación de un ambiente desfavorable (acidificación del medio) y la producción de sustancias inhibitorias (Caplice, 1999, Winkelströter *et al.*, 2015).

1.5.1.1.1 Ácidos orgánicos

Como mecanismos antimicrobianos específicos, las BL producen ácidos orgánicos, tales como ácido acético, propiónico y láctico, reducen el pH intracelular alterando los procesos

metabólicos al proporcionar un entorno ácido desfavorable para el crecimiento de microorganismos patógenos y deteriorantes, además el efecto de antagonismo resulta de la interferencia con el potencial de la membrana citoplasmática y el sistema de transporte activo (Holzapfel, 1995; Magnusson, 2003).

1.5.1.1.2 Bacteriocinas

La BL, también son capaces de producir bacteriocinas, que son péptidos de bajo peso molecular. Estos inhibidores proteicos actúan a través de la despolarización de membrana o inhibiendo la síntesis de la pared de la célula blanco. Actúan contra microorganismos relacionados cercanamente afectando la permeabilidad por lesión en la membrana externa (Figura 2) (Hugas, 1998; Magnusson, 2003). Las bacteriocinas se clasifican en: bacteriocinas de Clase I “lantibióticos”, como la Nisina, tienen actividad contra Gram positivas, entre ellas *Listeria monocytogenes*; las de Clase II no lantibióticos, son péptidos pequeños no modificados, que han mostrado actividad contra *Listeria spp* (como la pediocina PA-1) y las bacteriocinas de Clase III, que son proteínas grandes, hidrolasas termolábiles, bacteriolisinas (Cotter *et al.*, 2005; Magnusson, 2003; FDA, 1998).

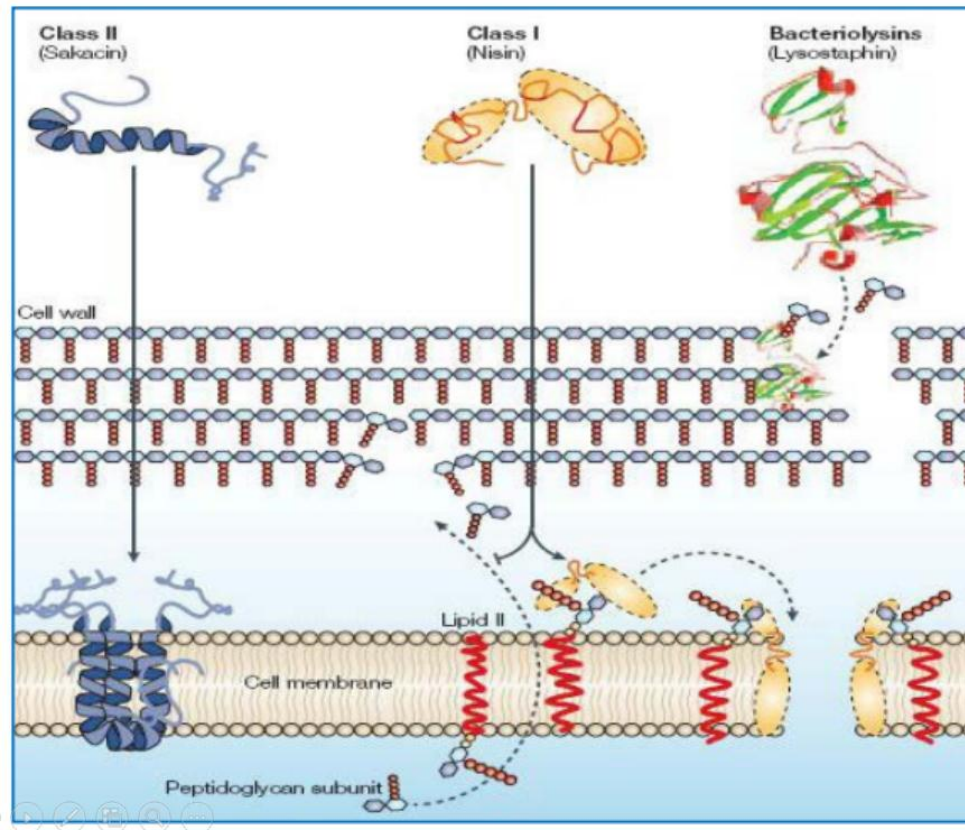


Figura 2. Mecanismo de acción de las bacteriocinas

Fuente: Cotter *et al.*, 2005

Las bacteriocinas pueden ser aplicadas para la inactivación de patógenos Gram negativos en alimentos en combinación con otras barreras o tratamientos que induzcan daño celular o alteración en la membrana celular (Gálvez *et al.*, 2010).

1.5.1.1.3 Actividad lítica

Se han reportado proteasas en los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Destacan, por su conservación en alimentos, las Peptidoglicano hidrolasas (PGH), que tienen un efecto hidrolítico sobre los enlaces glucosídicos o peptídicos que se encuentran en el peptidoglicano, principal componente de la pared celular bacteriana, produciendo lisis celular de microorganismos alterantes y patógenos de los alimentos ((Llorente, 2008 a y b).

1.5.1.1.4 Otros metabolitos producidos por Bacterias Lácticas

Otros metabolitos producidos por BL incluyen peróxido de hidrógeno (H₂O₂), su efecto inhibitorio es mediado por la peroxidación de lípidos de membrana y destruye proteínas celulares y estructuras moleculares básicas de los ácidos nucleicos, lo cual genera cambios irreversibles en la membrana; reuterina, afecta a virus, hongos, protozoarios y bacterias debido a la inhibición de una reductasa; el diacetilo, componente importante en el aroma y el sabor; dióxido de Carbono, con habilidad para reducir el pH interno y externo. Distintos autores reportan que ya se produjo el primer antibiótico Reuterocyclina, con espectro de inhibición limitado a Gram positivas (Magnusson *et al.*, 2003; Caplice, 1999; Ross, 2002). Los principales metabolitos con potencial bioconservador son los péptidos antimicrobianos, que pueden ser bacteriocinas o BLIS (sustancias inhibitorias similares a bacteriocinas). Las BLIS se definen como péptidos antimicrobianos que no se caracterizaron completamente con respecto a las secuencias de aminoácidos y propiedades bioquímicas. Tienen potencial bactericida y bacteriostático contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Leite *et al.*, 2016).

1.6 *Pediococcus acidilactici*

El género *Pediococcus*, pertenece a la familia *Streptococaceae*. Este género comprende siete especies: *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, *P. inopinatus*, *P. claussenni* y *P. cerevisiae* (Holzapfel *et al.*, 2006).

Pediococcus acidilactici es un coco Gram positivo y homofermentativo (produce ácido láctico a partir de glucosa, galactosa, arabinosa, manitol y dextrinas). Se presenta en tétradas o pares, no móvil, ni esporulado, anaerobio facultativo, catalasa negativo y oxidasa negativo. Crece a 30± 2°C, su temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 40°C, con un máximo de 52°C; se destruye por calentamiento a 72°C durante 10 min. El pH óptimo del medio de crecimiento es de 6 a 6.5 (Holzapfel *et al.*, 2006).

Pediococcus acidilactici se ha utilizado en la industria alimentaria como cultivo iniciador en la fermentación industrial de carnes, lácteos y vegetales, ya que cuenta con potencial bioconservador en el control del crecimiento de bacterias de interés sanitario (Holzapfel, 1995).

1.6.1 Sustancias antibacterianas producidas por *P. acidilactici*

Entre las sustancias antibacterianas producidas por *Pediococcus acidilactici*, se reportan pediocinas Clase II, tales como Pediocina PA-1/AcH, siendo de interés debido a su actividad antilisterial, contra *Clostridium botulinum* y *C. perfringens*. También se ha demostrado la existencia de pediocina 252 producida por *P. acidilactici* NCDC 252 (Miller *et al.*, 2005; Kumari *et al.*, 2014, Nieto *et al.*, 2006).

1.6.2 *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Cepa liofilizada, crece en Medio Lactobacilli MRS a 37°C. Se recomiendan las prácticas, equipo de contención y las instalaciones de Bioseguridad Nivel 1 cuando se trabaja con cultivos del agente, ya que se conoce no causa enfermedad consistente en humanos adultos inmunocompetentes y presume riesgo potencial mínimo para el personal del laboratorio y el medio ambiente (ATCC, 2015; CDC, 2009).

1.6.2.1 Proteasas producidas por *P. acidilactici* ATCC 8042

Las proteasas son enzimas que rompen enlaces peptídicos de las proteínas. Destacan, por su conservación en alimentos, las Peptidoglicano hidrolasas (PGH) que son enzimas endógenas con efecto hidrolítico sobre enlaces glucosídicos y peptídicos, e intervienen en la remodelación, recambio e inserción de monómeros de peptidoglicano de la pared celular en bacterias; dependiendo del tipo de enlace que hidrolicen, se clasifican en: muramidásas, glucoamidásas, amidásas, carboxipeptidásas y endopeptidásas (Figura 3). Muchas de ellas

coexisten en la pared celular de las bacterias tomando funciones de enzimas de recambio en la pared celular o autolisinas que causan la muerte celular (Lortal *et al.*, 1997; Mora *et al.*, 2003; Callewaert *et al.*, 2011).

Describe Mora en 2003, la presencia de enzimas autolíticas con actividad de PGH (116 kDa) en extractos proteicos de membranas celulares de *P. pentosaceus* y *P. acidilactici*, donde las N- acetilmuramidasa juegan un papel importante en la separación celular después de la división de las bacterias lácticas y en la liberación de otras enzimas al autolizarlas (Mora *et al.*, 2003).

Llorente (2008), describe la producción de tres enzimas extracelulares obtenidas de los sobrenadantes de cultivos de *P. acidilactici* ATCC 8042. Dos con actividad proteolítica (200 y 50 kDa) sobre gelatina, caseína y elastina y otra (107 kDa) con actividad gelatinolítica, y una con actividad peptidoglicano hidrolasa (110 kDa), demostrado a través de técnicas zimográficas en geles SDS-PAGE copolimerizados con células de *M. lysodeicticus* ATCC 4698 y otros microorganismos de interés sanitario.

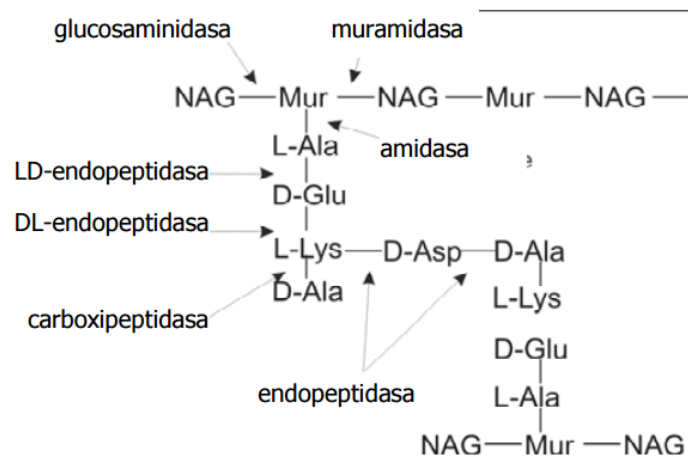


Figura 3. Representación esquemática del sitio de reconocimiento de las peptidoglicano hidrolasas

Fuente: Steen, 2015

1.7 Pruebas *in vitro* para evaluar antibiosis

Existen diversos métodos microbiológicos para determinar la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes inhibitorios, bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas (Pidcock, 1990). Los métodos usados se pueden dividir en *in vitro* o pruebas discriminativas, que incluyen cualquier prueba en que el compuesto no es aplicado directamente al producto bajo condiciones de uso, y en las pruebas de aplicación, que son aquellas en que el antimicrobiano es aplicado directamente en un alimento, para determinar su efecto sobre la microbiota natural o sobre un microorganismo inoculado (Davidson y Parish, 1989; Parish y Davidson, 1993). Las pruebas *in vitro* pueden ser subdivididas en pruebas de punto final y pruebas descriptivas (Parish y Davidson, 1993).

1.7.1 Pruebas de punto final

Las pruebas de punto final son aquellas en que un microorganismo es probado por un período arbitrario y los resultados reflejan el poder inhibitorio de un compuesto solo por ese tiempo determinado (Parish y Davidson, 1993).

a) Método de difusión en agar

Método aceptado por la FDA y recomendado como estándar por el NCCLS (National Committee on Clinical Laboratory Standards) en el que se utiliza el sobrenadante de cultivo, extractos crudos o la sustancia pura previamente identificada. El microorganismo indicador en fase de crecimiento logarítmico es inoculado en una sobrecapa de agar suave, en la cual una vez solidificada se hacen pozos o se colocan penicilindros o sensidiscos, en los que se adiciona una cantidad conocida del sobrenadante o sustancia pura y las cajas se incuban en las condiciones del microorganismo de prueba por 24 horas.

Durante la incubación, las sustancias inhibitorias difunden radialmente desde el pozo a través del agar. Posterior a la incubación, se miden los halos de inhibición (mm) obtenidos (NCCLS, 2005; Piddock, 1990).

b) Método de dilución en agar

Los métodos de dilución se utilizan generalmente cuando se desean datos cuantitativos para determinar cuándo un antimicrobiano es letal para el microorganismo de prueba. El método de dilución en agar se basa en diluciones secuenciales dobles de la muestra que contenga sobrenadante o la sustancia con actividad antimicrobiana, las cuales se probarán en agar que contenga una concentración conocida del microorganismo de prueba (Lewis y Montville, 1991; Parish y Davidson, 1993).

c) Método de dilución en caldo

En esta prueba se utilizan una serie de tubos con medios bacteriológicos líquidos a los que se les añaden cantidades conocidas del antimicrobiano diluido seriadamente y del microorganismo de prueba estandarizado. La evaluación de la actividad inhibitoria de esta prueba se lleva a cabo realizando muestreos periódicos para determinar la sobrevivencia o crecimiento en UFC/ml, los tubos son incubados por 16-24 horas a la temperatura óptima del microorganismo de prueba (Lewis y Montville, 1991; Parish y Davidson, 1993).

1.7.2 Pruebas descriptivas

En las pruebas descriptivas se realiza un muestreo periódico para determinar los cambios en el número de células viables con respecto a un tiempo determinado por pruebas turbidimétricas y curvas de inhibición o muerte (Parish y Davidson, 1993).

a) Prueba turbidimétrica

Mide el efecto de un compuesto con actividad antimicrobiana sobre el crecimiento de microorganismos, al medir el incremento de turbidez con respecto al tiempo con un espectrofotómetro y se pueden ver diferentes tipos de inhibición con el microorganismo indicador: incremento en la extensión de la fase lag de las células tratadas, supresión de la fase estacionaria, disminución en la velocidad de crecimiento en la fase log, reflejándose esto en una supresión del nivel de crecimiento total, comparado con un control (Parish y Davidson, 1993).

b) Curva de inhibición o muerte

Debe acompañar a las pruebas turbidimétricas. Esta prueba incluye la inoculación de un microorganismo en un medio adicionado con un antimicrobiano, seguida de un período de incubación y de un muestreo periódico para determinar sobrevivencia o crecimiento en UFC/ml. Se puede observar un incremento en la fase lag, una disminución en la velocidad de crecimiento con poco efecto en la fase lag y/o un efecto letal o curva de tiempo de muerte (Parish y Davidson, 1993).

1.7.2.1 Concentración Inhibitoria Mínima y Concentración Bactericida Mínima

La prueba de dilución en caldo puede utilizarse para determinar la letalidad del microorganismo de prueba. La concentración más baja que produce >99.9% de muerte del microorganismo de prueba es designada como la concentración bactericida mínima (CBM) o concentración letal mínima (CLM) (NCCLS, 2005).

También, en ambos métodos de dilución se genera un estadístico conocido como la concentración inhibitoria mínima (CIM), que es definida como la concentración más baja de

un antimicrobiano que previene el crecimiento de un microorganismo después de un período de incubación especificado (Barry, 1986).

1.7.3 Zimografía *in situ* para detección de actividad lítica

La aplicación de electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) en la detección de enzimas bacteriolíticas ha abierto un camino para el estudio de las Peptidoglicano hidrolasas. Las PGH pueden ser visualizadas como zonas líticas claras con luz indirecta, después de un lavado para eliminar el SDS y de su incubación en buffer renaturalizante, en contraste con la pared celular opaca (o células completas) que se incorporan en los geles. La tinción con azul de metileno permite identificar más claramente las bandas líticas (LeClerc y Asselin, 1989).

Se pueden detectar cambios en la estructura de la pared celular y cambios en concentración mínima bacteriolítica en el gel que contiene la pared celular o las células de interés como sustratos (Shockman y Holtje, 1994). La masa molecular de las bandas bacteriolíticas puede ser estimada con marcadores de peso molecular (Sugai, 1997).

ANTECEDENTES

En virtud de que otras cepas de *Pediococcus acidilactici* producen bacteriocinas, Llorente (1998) planteó la posibilidad de que *P. acidilactici* ATCC 8042 produjera este tipo de moléculas, lo que pudo demostrar con la inhibición de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P adicionando el sobrenadante de la cepa de interés aplicando pruebas cualitativas de difusión en agar y pruebas cuantitativas de turbidimetría en dilución en caldo, y la determinación de la curva de inhibición y la CIM, concluyendo que la cepa es productora de bacteriocinas.. Sin embargo en 2008, Llorente demostró que la cepa no posee los genes que codifican para la producción de pediocinas, aunque posee una actividad antibacteriana, relacionada directamente a enzimas intracelulares con actividad de PGH, demostrada mediante pruebas microbiológicas y electroforéticas, contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, *Listeria*

innocua y *Bacillus cereus*, y algunas Gram negativas: *Escherichia coli* y *Salmonella* entérica serovar Tiphymurium, observándose el daño celular por microscopía electrónica de barrido (MEB). Evaluó la actividad lítica sobre *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, mediante técnicas de zimografía *in situ* y se demostró actividad proteolítica sobre caseína y gelatina, encontrando una PGH con masa molecular de 116 kDa y dos proteasas extracelulares, una >200 kDa y otra de 107 kDa.

En cuanto a la investigación aplicada en alimentos, Rivera-Quiroz (2004) utilizó la cepa como cultivo iniciador, utilizando el cultivo y sus sobrenadantes en la elaboración de modelos cárnicos embutidos tipo salami, adicionados con *S. aureus* como microorganismo indicador, demostrando su disminución de log UFC/mL en los salamis inoculados tanto con *P. acidilactici* como con sus sobrenadantes de cultivo.

Posteriormente, Martínez-Trejo (2011) demostró que el sobrenadante del cultivo de *P. acidilactici* 8042 en fase media logarítmica tiene actividad antagonista contra *P. aeruginosa* y *L. monocytogenes*, mediante pruebas de actividad antimicrobiana, de difusión en agar, dilución en agar y dilución en caldo.

En 2015, Munguía-Villavicencio evaluó el efecto de los sobrenadantes en fase logarítmica y estacionaria del cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 sobre el crecimiento y la producción de algunos factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, estableciendo la disminución en la producción de pirocianina y aumento de pioverdina mediante espectrofotometría. Asimismo, demostró tener efecto sobre la reducción en la producción de exopolisacáridos. También se comprobó actividad de PGH en zimogramas sobre *M. lysodeikticus* con bandas 115, 110 y 61 kDa, y sobre *P. aeruginosa* se observaron dos proteínas con actividad lítica, presentes solo en sobrenadantes de fase estacionaria. Mediante pruebas de actividad antimicrobiana, se demostró que los sobrenadantes de *P. acidilactici* en las distintas fases provocan un efecto retardador en el fase *lag* de *P. aeruginosa*.

JUSTIFICACIÓN

Debido al gran interés que tiene la búsqueda de nuevas estrategias para el control eficaz de *Listeria monocytogenes* (patógeno emergente) en alimentos, se busca en este trabajo utilizarlo como microorganismo de prueba mediante diferentes estrategias de evaluación de los productos antibacterianos de la cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Ya que sólo se ha demostrado el efecto inhibitorio del sobrenadante del cultivo *P. acidilactici* ATCC 8042 sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 mediante algunas pruebas cualitativas (Martínez Trejo, 2011).

HIPÓTESIS

Si el sobrenadante de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 demuestra poseer actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, entonces se podrán aplicar diferentes estrategias para caracterizar su efecto antagónico frente a este patógeno.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto inhibitorio *in vitro* de los sobrenadantes del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, identificando la fase de crecimiento en que ocurre la actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, al correlacionar la concentración de proteínas con la inhibición.

Objetivos particulares

1. Verificar la identidad de las cepas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 por técnicas microbiológicas y moleculares.
2. Demostrar la actividad antibacteriana de los sobrenadantes del cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 en fase logarítmica frente a *L. monocytogenes* ATCC 15313 mediante técnicas de difusión en agar.
3. Determinar el efecto inhibitorio de los sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en fase logarítmica, sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 mediante pruebas cuantitativas de dilución en caldo para obtener la concentración inhibitoria mínima y bactericida mínima.
4. Probar la actividad inhibitoria de los sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en fase logarítmica sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 mediante técnicas de zimografía en gel.

2. MATERIAL Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

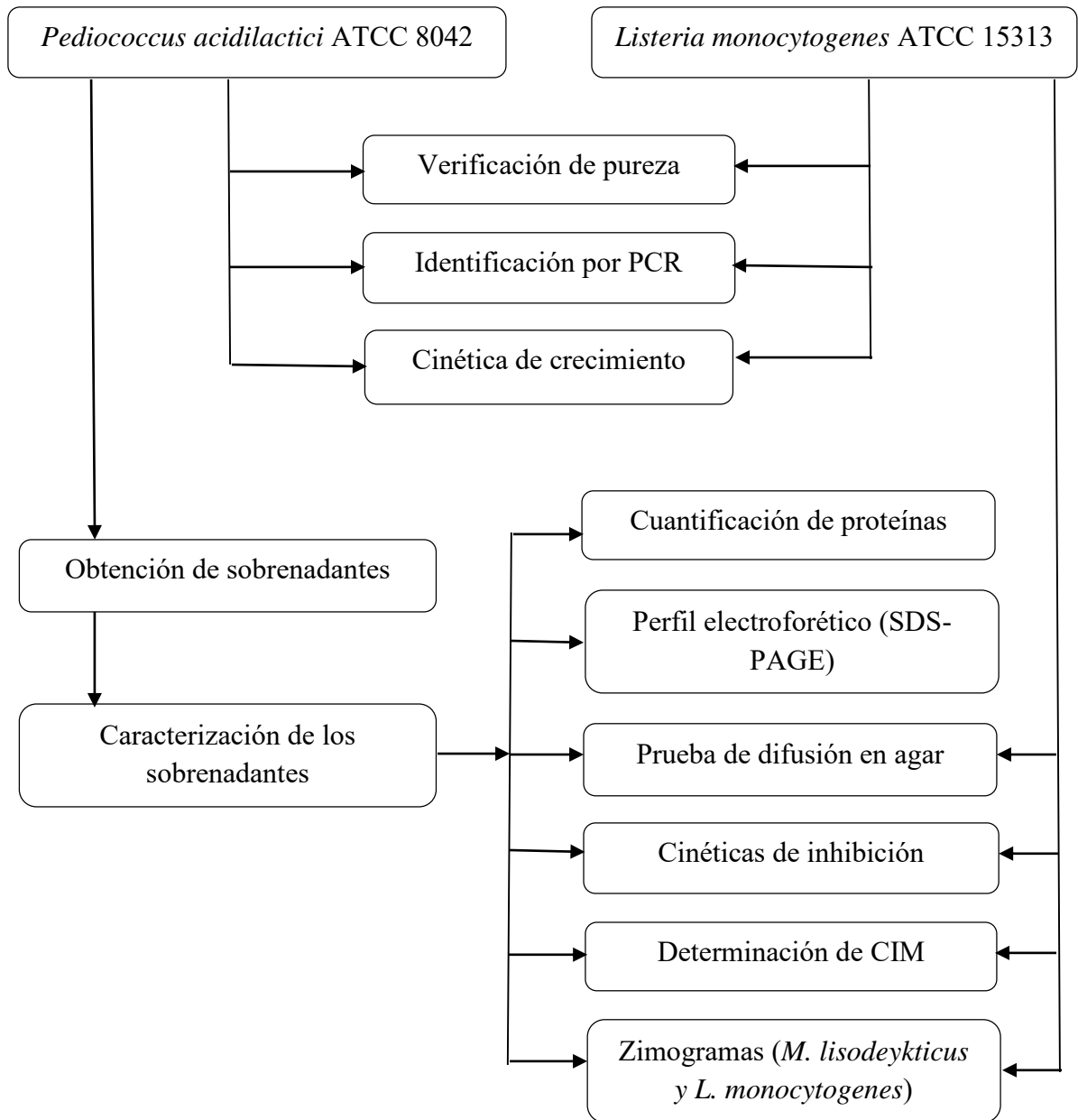


Figura 4. Resumen metodológico

2.1. Microorganismos

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron pellets de las cepas liofilizadas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (bacteria ácido láctica) y la cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 (microorganismo de prueba).

También se utilizó la cepa liofilizada de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 (Sigma-Aldrich), como sustrato en los zimogramas de actividad *in situ* mediante electroforesis en gel.

Todas las cepas fueron proporcionadas por el laboratorio de Bioconservación (L-7) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

2.2. Medios de cultivo

2.2.1 Medio MRS para el cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

El medio de cultivo para el crecimiento de *Pediococcus acidilactici* fue el Medio MRS (De Man Rogosa and Sharp) (Difco MT) modificado por Llorente (1998), por la adición de 10% (w/v) de sacarosa y 0.1% (w/v) de ácido ascórbico.

Los ingredientes se pesaron y se resuspendieron en 950 ml de agua destilada en matraces Fernbach de capacidad de 2.5 L, para un volumen de trabajo de 1L, de acuerdo con el método utilizado por Llorente (2008). Por separado, en 10 mL de agua destilada estéril se preparó el ácido ascórbico y en 40 mL, la solución de sacarosa (Cuadro 1).

El medio se esterilizó por separado con el fin de evitar las reacciones de Maillard; la solución de sacarosa y los demás ingredientes resuspendidos en 950 mL se esterizaron en autoclave (Hirayama HV-50) a 121° C durante 15 min. La solución de ácido ascórbico fue esterilizado

por filtración con membrana (Millipore, 0.22 µm). Posteriormente se incorporaron suavemente las soluciones de sacarosa y ácido ascórbico al resto del medio.

Se utilizó como medio sólido el medio *Lactobacilli* MRS Broth (Difco^{MT}), adicionado de 1.5 % agar bacteriológico (Bioxon, BD) (Llorente, 2008).

La esterilidad de los medios se probó a 30±2° C durante 24 h en estufa bacteriológica (Model 12-140, Incubator, Quincy lab).

Cuadro 1. Formulación de medio MRS modificado y Agar MRS comercial

Ingrediente	Caldo (g/L)	Proveedor	Agar (g/L)
Citrato de Amonio	2.0	Meyer, México	2.0
Acetato de Sodio	5.0	Meyer, México	5.0
Sulfato de Magnesio	0.1	J.T. Baker, México	0.1
Sulfato de Manganeso	0.05	J.T. Baker, México	0.05
Fosfato dipotásico	2.0	J.T. Baker, USA	2.0
Peptona proteosa No.3	10.0	Difco, BD, USA	10.0
Extracto de carne	10.0	Bioxon, BD, México	10.0
Extracto de levadura	5.0	Bioxon, BD, México	5.0
Glucosa	0.0		20.0
Sacarosa	10.0	Bioxon, BD, México	0.0
Monoleato de polisorbitán (Tween 80)	1.0	Sigma, USA	1.0
Ácido ascórbico	1.0	Baker, México	0.0
Agar bacteriológico	0.0	Bioxón, BD, México	15.0

Fuente: Modificado de Llorente (2008)

2.2.2 Medio BHI para el cultivo de *Listeria monocytogenes* ATCC 15313

Para el crecimiento de la cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 se utilizó el Medio BHI (Brain Heart Infusion) (Bioxon BD).

Se prepararon 30 ml de caldo BHI en un matraz Erlenmeyer con tapón de rosca y capacidad de 50 ml siguiendo las indicaciones del envase. Los medios fueron esterilizados en autoclave durante 15 min a 121°C (Hirayama HV-50).

Como medio sólido se utilizó el medio BHI adicionado con Agar bacteriológico al 1.5% (BD Bioxon).

La esterilidad de los medios se verificó a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas en estufa bacteriológica (Model 12-140, Incubator, Quincy lab).

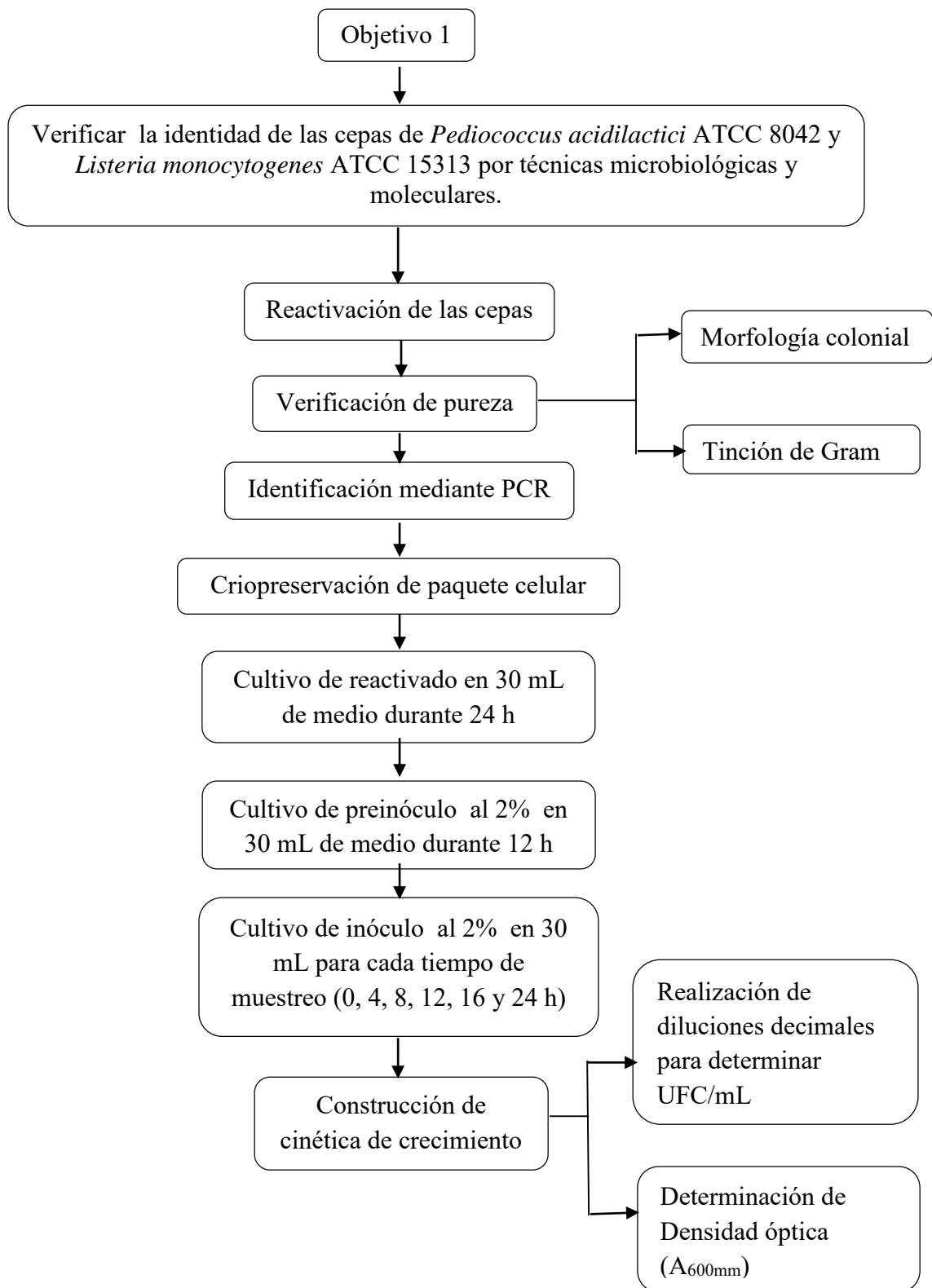


Figura 5. Resumen metodológico del objetivo 1

2.3. Reactivación de cepas

2.3.1. Reactivación de *P. acidilactici* ATCC 8042 y verificación de pureza

El pellet liofilizado de la cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, se reconstituyó en 30 ml de caldo MRS modificado estéril y se incubó en estufa bacteriológica a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Posteriormente se sembró por estría en caja de Petri con agar MRS al 1.5% y se incubó en estufa bacteriológica a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h para observar la morfología colonial.

Para verificar la pureza de la cepa se realizó la tinción de Gram (Gram Stain Kit, BD™) para observar las características microscópicas de la cepa.

2.3.2. Reactivación de *L. monocytogenes* ATCC 15313 y verificación de pureza

La cepa liofilizada de *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 proporcionada en pellet, se colocó en 30 ml de caldo BHI para su reactivación en condiciones de esterilidad y se incubó a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h en estufa bacteriológica.

Se verificó la pureza de la cepa mediante sembrado por estría en placa con agar BHI al 1.5%, incubando durante 24 h a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ para observar la morfología colonial. Se realizó frotis con tinción de Gram para observar las características microscópicas.

2.3.3. Tinción de Gram de ambas cepas

Para la tinción de Gram de ambas cepas se utilizó el B-D™ Gram Stain Kit. Se tomó una azada del cultivo fresco y se colocó en un portaobjetos limpio, se fijó a la flama y se tiñó con cristal violeta durante 1 min, se lavó con agua destilada y se cubrió con lugol (solución yoduro al 4%) durante 1 min, posteriormente se decoloró con una solución de alcohol-acetona y se lavó nuevamente con agua destilada, por último se tiñó con safranina durante 1

min y se retiró el exceso con agua destilada. Los frotis se dejaron secar a temperatura ambiente y se observaron al microscopio.

2.4. Identificación molecular de las cepas

2.4.1 Identificación de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 mediante PCR

La identificación de la cepa se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para detectar la fracción 16S y el gen *ldhD* de *P. acidilactici*.

Bajo condiciones de esterilidad se realizó un cultivo al 2% (v/v) de *P. acidilactici* ATCC 8042, en 30 mL de caldo MRS modificado y se incubó a 30±2°C durante 12 h. El paquete celular se obtuvo de una alícuota de 1.5 mL del cultivo centrifugando a 5,000 rpm 10 min a 4°C (Centurion Scientific, K3 Series) en tubos Eppendorf con capacidad de 2 mL.

2.4.1.1. Extracción de ADN de *P. acidilactici* 8042

Para la extracción de ADN de la cepa ATCC 8024 se utilizó la técnica de fenol-cloroformo de acuerdo a Burbano (2006), modificada y adaptada de acuerdo con lo siguiente.

El paquete celular se resuspendió en 0.5 mL de amortiguador TE (Tris Cl 10 mM, EDTA 1 mM). Se agregaron 5 µL (2 mg/mL) de lisozima y se mezcló en agitador tipo Vórtex, la mezcla se incubó a 37°C durante 2 horas en estufa bacteriológica. Se adicionó 1 µL (10 µg/mL) de SDS y 1.25 µL (50 µg/mL) de proteinasa k, se incubó a 37°C durante 1 h. Se agregaron 17 µL de NaCl [5 M] y 12 µL de Bromuro de hexadecil-trimetil-amonio CTAB [CTAB 10% w/v en NaCl 0.7 M] y se colocó la mezcla en baño maría a 65°C durante 20 minutos. Posteriormente se añadió fenol-cloroformo en volumen 1:1 y se centrifugó a 3,500 rpm durante 10 min. Se obtuvo la fase acuosa y se agregó 1 µL (5µg/mL) de ARNasa y se mantuvo durante toda la noche a 4°C. Se adicionó nuevamente fenol-cloroformo (volumen 1:1) y se centrifugó (3,500 rpm/10min) para obtener la fase acuosa, a la que se le agregaron

2 volúmenes de etanol y se mantuvo a -20°C durante 2 horas (Burbano, 2006). Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se decantó, el botón obtenido se dejó a temperatura ambiente hasta la evaporación total del etanol y finalmente se resuspendió en 25 µL de amortiguador TE (Tris Cl 10 mM, EDTA 1 mM).

2.4.1.2. Condiciones empleadas para la amplificación de *P. acidilactici* ATCC 8042 mediante PCR

La identificación se llevó a cabo de acuerdo a Mora *et al.* (1997), modificado y adaptado. Se utilizaron los primers *Pac*, *Ppe*, *Pu*, *LdhDF* y *LdhDR* (sintetizados en Laboratorio de Síntesis del IBT-UNAM) para regiones variables del gen 16S ARNr específico del género *Pediococcus* y del gen D-Lacto Deshidrogenasa específico de la especie *P. acidilactici* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Secuencia y posición de primers utilizados en la amplificación de *P. acidilactici*

Primer	Nomenclatura	Longitud (pb)	Secuencia (5'-3')
Pac	S-S-P. pent-67 (<i>P. pentosaceus</i>)-a-S-22	872	CGAACTTCCGTTAATTGATTAT
Ppe	S-S-P.aci-69 (<i>P. acidilactici</i>)-a-S-22		CGAACTTCCGTTAATTGATCAG
Pu	S-*-Lab-940 (<i>P.acidilactici</i>)-a-A-18		ACCTTGCGGTCTGACTCC
<i>ldhDF</i>	<i>ldh</i> -S-P.acid-1192 (<i>P.acidilactici</i>)-a-S-20	449	GGACTTGATAACGTACCCGC
<i>ldhDR</i>	<i>ldh</i> -S-P.acid-1640 (<i>P.acidilactici</i>)-b-A-20		GTTCCGTCTTGCATTTGACC

Fuente: Mora *et al.*, 1997

En una reacción de 25 µL se mezclaron: 0.5 µL de cada uno de los primers con 9 µL de agua desionizada libre de nucleasas; 1 µL de ADN y 12.5 µL de PCR Master Mix® (solución premezclada de dNTP's, Taq polimerasa, buffer de Taq y MgCl₂).

La etapa de desnaturalización para la amplificación fue a 94°C durante 6 min. La temperatura de alineamiento se fue a 67°C por 1 min, realizándose 36 ciclos, y la extensión se llevó a cabo a 72°C durante 1 min y al finalizar siguió una etapa durante 5 min a la misma temperatura (Figura 6). La amplificación se realizó en un Termociclador (Axigen® MaxyGene™ II) con el apoyo y facilidades prestadas por el Dr. Víctor Rubén Tenorio Gutiérrez en el Laboratorio de Bacteriología del CENID-Microbiología Animal del INIFAP.

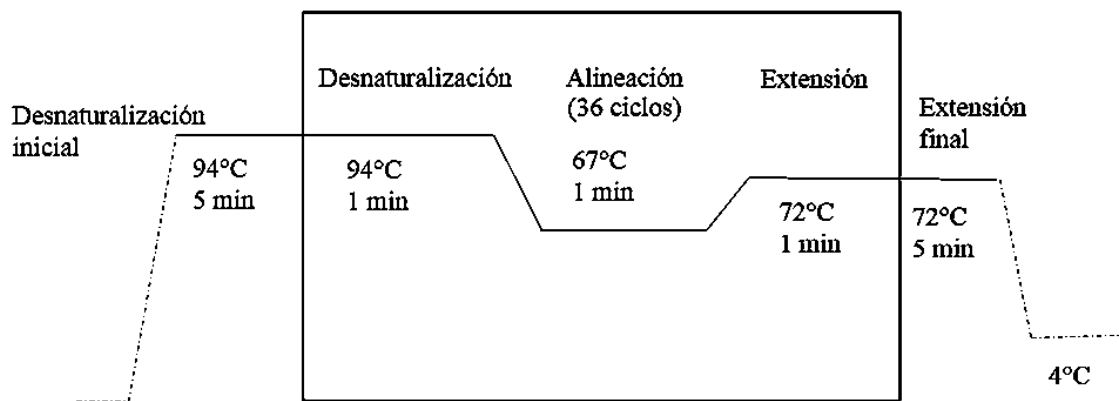


Figura 6. Condiciones empleadas para la amplificación de los genes de *P. acidilactici* ATCC 8042

2.4.1.3. Análisis de productos de PCR mediante Electroforesis

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TAE buffer 0.05X y se añadieron 3 µL de colorante Midory Green. Los carriles del gel se cargaron con 5 µL de los productos del PCR mezclados con 1 µL de marcador de carga (6x DNA loading Dye). El peso molecular de las bandas se determinó con 5 µL de marcador de Peso molecular (10,000 pb) Mass Ruler Ladder Mix, ready-to-use (Thermo Scientific). La electroforesis se desarrolló a 80 Volts durante 1 h. Los geles se visualizaron y se fotografiaron bajo luz UV en transiluminador (Gel Logic 1500, Imaging System).

2.4.2. Identificación de *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 mediante PCR

Para obtener el paquete celular de la cepa de *Listeria monocytogenes* se realizó un cultivo por asada en 50 mL de caldo BHI en condiciones de esterilidad, y se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas. El cultivo se transfirió a tubos cónicos con capacidad de 50 ml (Neptune) para ser centrifugado a 3,600 rpm durante 10 min (Thermo electron corporation, IEC CL10 centrifuge) y finalmente se decantó el sobrenadante.

2.4.2.1. Extracción de ADN de *L. monocytogenes* ATCC 15313

El paquete celular obtenido del cultivo se resuspendió en 2.5 mL de amortiguador TE (Tris Cl 10 mM, EDTA 1 mM). Se agregaron 5 μg (2 mg/mL) de lisozima, y se mezcló en agitador tipo Vórtex, la mezcla se incubó a 37°C durante 2 horas en estufa bacteriológica. Se adicionaron 2.5 μL (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de SDS y 6.25 μL (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de proteinasa k, se incubó la mezcla a 37°C durante 1 hora. Se agregaron 84 μL de NaCl [5 M] y 60 μL de Bromuro de hexadecil-trimetil-amonio CTAB [CTAB 10% w/v en NaCl 0.7 M] y se colocó la mezcla en baño maría a 65°C durante 20 minutos. Posteriormente se añadió fenol-cloroformo en volumen 1:1 y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min. Se obtuvo la fase acuosa y se agregaron 1.25 μL (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de ARNasa y se mantuvo durante toda la noche a 4°C . Se adicionó fenol-cloroformo (volumen 1:1) y se centrifugó en las mismas condiciones (3,500 rpm/10min) para obtener la fase acuosa superior y se agregaron 2 volúmenes de etanol para mantenerse a -20°C durante 2 horas. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se decantó, el ADN se dejó a temperatura ambiente hasta que el etanol se evaporó completamente y el botón se resuspendió en 100 μL de amortiguador TE (Tris Cl 10 mM, EDTA 1 mM).

2.4.2.2. Condiciones empleadas para la amplificación de *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 mediante PCR

Para amplificar el gen *iap* (1450 pb) de *Listeria spp.*, se emplearon los primers UNILIS A' y LIS1B. La técnica de PCR se llevó a cabo de acuerdo a Bubert (1999) modificado y adaptado, con un volumen de reacción de 12.5 µL, en donde se mezclaron 1.25 µL de buffer, 1 µL de dNTPs, 2 µL de MgCl₂, 0.5 µL de cada primer, 1 µL de ADN polimerasa, 1.5 µL de ADN y 4.5 µL de agua libre de nucleasas. Se empleó un paso inicial de desnaturalización a 94° C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, alineación a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 2 min y extensión final 72°C por 10 minutos en termociclador (Labnet, MultiGene II).

Para la identificación de la especie *L. monocytogenes* se emplearon los iniciadores MAR1 y MAR2 que producen un fragmento de 450 pb específico de *L. monocytogenes* (Manzano, 1997). El volumen de reacción fue de 12.5 µL mezclado como se describió para la reacción de identificación de género. La desnaturalización inicial fue a 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos; alineación a 45°C por 30 segundos, 46°C, 90 segundos de extensión a 72°C y una extensión final de 10 minutos a la misma temperatura en termociclador (Axigen, MaxyGene II) (Figura 7).

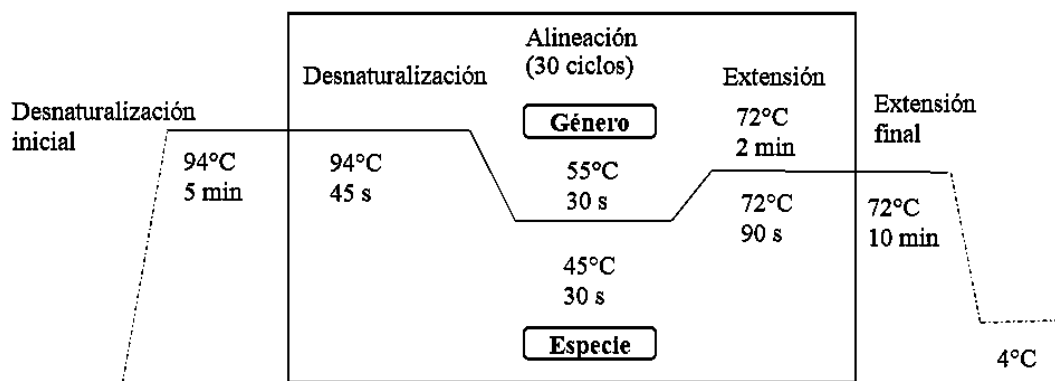


Figura 7. Condiciones empleadas para la amplificación de los genes del género *Listeria* y la especie *monocytogenes*

2.4.2.3 Electroforesis para el análisis de los productos de PCR

Los resultados de la prueba de PCR se compararon con los controles positivo (cepa de *L. monocytogenes* 9 (1-4)) obtenida del laboratorio de microbiología en el INIFAP y negativo (ADN reemplazado por agua destilada). Los productos de PCR (5 µL) fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% preparados con amortiguador TAE 0.5x que contenían 1 µL de colorante Midory Green. Para visualizar los productos se empleó un transiluminador de luz UV y los geles fueron fotografiados (Gel Logic 1500, Imaging System). El tamaño de los productos de PCR se obtuvo comparando su posición en el gel con la del marcador Mass Ruler Ladder Mix, ready-to-use (Thermo Scientific) de 10,000 pb.

2.5. Criopreservación de las cepas

2.5.1. Criopreservación de *P. acidilactici* ATCC 8042

De la cepa reactivada de *P. acidilactici* se realizó un pase del 2 % (v/v) a 500 mL de medio MRS m estéril y se incubó durante 12 horas a 30±2°C. El paquete celular de 40 mL de cultivo se obtuvo por centrifugación a 5,000 rpm durante 10 min a 4°C (Centurium Scientific, K3 Series) en tubos cónicos con capacidad de 50 mL, se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 20 mL de medio MRS- glicerol (50%-50%), y se conservó 1 mL del mismo en criotubos estériles Eppendorf de 2 mL de capacidad y se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su utilización (Llorente, 2008; Martínez-Trejo, 2008).

2.5.2. Criopreservación de *L. monocytogenes* ATCC 15313

Por asada de un cultivo confluyente de *L. monocytogenes* se inoculó la cepa reactivada en 30 mL de caldo BHI estéril y se incubó a 35 ±2°C durante 24 h. Posteriormente se inoculó 1 mL del cultivo a tubos cónicos (Axygen®, Scientific) de 15 mL de capacidad que contenían 10 mL de caldo BHI y se incubaron durante 12 h a 35°C. Se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 5,000 rpm durante 10 min a 4°C (Centurion Scientific, K2015R), se decantó

el sobrenadante y se lavó el paquete con 10 mL de agua peptonada 0.1% estéril, se homogenizó en vórtex a máxima velocidad durante 30 segundos y se volvió a centrifugar. El paquete celular de 10 mL de cultivo se resuspendió con 200 µL de una solución preparada estéril con 20% glicerol (v/v) 80% de caldo nutritivo (1 mL) contenida en un criotubo con 13 perlas de vidrio estériles, y se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su utilización (Llorente, 2008).

2.6. Cinéticas de crecimiento bacteriano

2.6.1. Cinética de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Un criovial de la cepa fue reactivado en 30 mL de caldo MRS modificado (MRS m) en un matraz Erlenmeyer con capacidad de 50 mL durante 24 h a 30±2° C, posteriormente se realizó un preinóculo del 2% (v/v) del cultivo a un matraz con las mismas características durante 12 horas a 30±2° C.

Para obtener la cinética de crecimiento durante 24 horas se inocularon frascos para cada tiempo de muestreo (0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h) con el 2% (v/v) del preinóculo, incubando a 30±2°C.

En cada tiempo de muestreo se realizaron diluciones decimales 10⁻¹ a 10⁻⁶ en agua peptonada al 0.1% (Anexo 1) y siembra en placa de 20 µL de cada dilución (por triplicado) en Agar MRS al 1.5% incubando a 30±2°C durante 24 h para determinar las UFC/mL. En paralelo se determinó la densidad óptica con un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf®) en una longitud de onda de A_{600nm} utilizando como blanco el medio MRS sin inocular.

Para determinar las UFC/mL, se tomaron como representativas las cajas que presentaron las diluciones que contenían de 25 a 250 colonias de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994, que abarca el método para la preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

Se usó el factor de dilución para determinar el número de células viables por mL, de la siguiente manera:

$$\text{Número de UFC/mL} = \frac{\text{No. Promedio de colonias} \times \text{inverso de dilución}}{\text{Volumen de la gota (0.02 mL)}}$$

Los resultados se transformaron a logaritmo base 10. Se realizaron 3 réplicas, cada una con dos repeticiones.

2.6.2. Cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* ATCC 15313

Se adicionaron en 30 mL de BHI, 2 esferas de vidrio con *L. monocytogenes* (preparadas previamente) y de este cultivo se prepararon posteriormente los preinóculos en 30 mL de BHI al 2% (v/v) y se incubaron a 35°C durante 12 h, a partir de los cuales se inocularon matraces Erlenmeyer con 30 mL de BHI estéril para cada tiempo de muestreo (0 a 24 h cada 4 h), se inóculo al 2% (v/v) y se incubaron a 35±2°C.

Para determinar las UFC/mL se realizaron diluciones decimales en agua peptonada (0.1%) como se describió anteriormente para *P. acidilactici* y se sembraron 20 µL de cada dilución en Agar BHI 1.5% incubando a 24 h. La D.O. se determinó con espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf®) a A_{600nm} utilizando como blanco el medio BHI sin inocular para cada tiempo de muestreo.

Se realizaron 3 réplicas, cada una con dos repeticiones.

2.6.3. Determinación de parámetros de crecimiento de ambas cepas

Tanto para la cinética de crecimiento de la cepa de *P. acidilactici*, como para la de *L. monocytogenes*, se calcularon la tasa de crecimiento (*k*) y el tiempo de generación (*t_{gen}*)

empleando las siguientes ecuaciones y de acuerdo a los datos obtenidos en la fase de crecimiento logarítmico:

Tasa de crecimiento:

$$k = \frac{\log_{10}[X_t] - \log_{10}[X_0]}{0.301 \times t} = \text{gen}/h$$

Dónde:

X_t = Máximo de UFC/ml

X_0 = Mínimo de UFC/mL

t = Tiempo transcurrido entre X_t y X_0 (horas)

Tiempo de generación:

$$t_{gen} = \frac{1}{k} = h/gen$$

Dónde:

k = Tasa de crecimiento

Definiéndose el tiempo de generación como el tiempo necesario para duplicar la población bacteriana, es decir el número de células y la masa celular se duplica. El tiempo de generación está relacionado con la tasa de crecimiento, la cual se define como el cambio en número de células o masa celular por unidad de tiempo (Dos Santos, 2007).

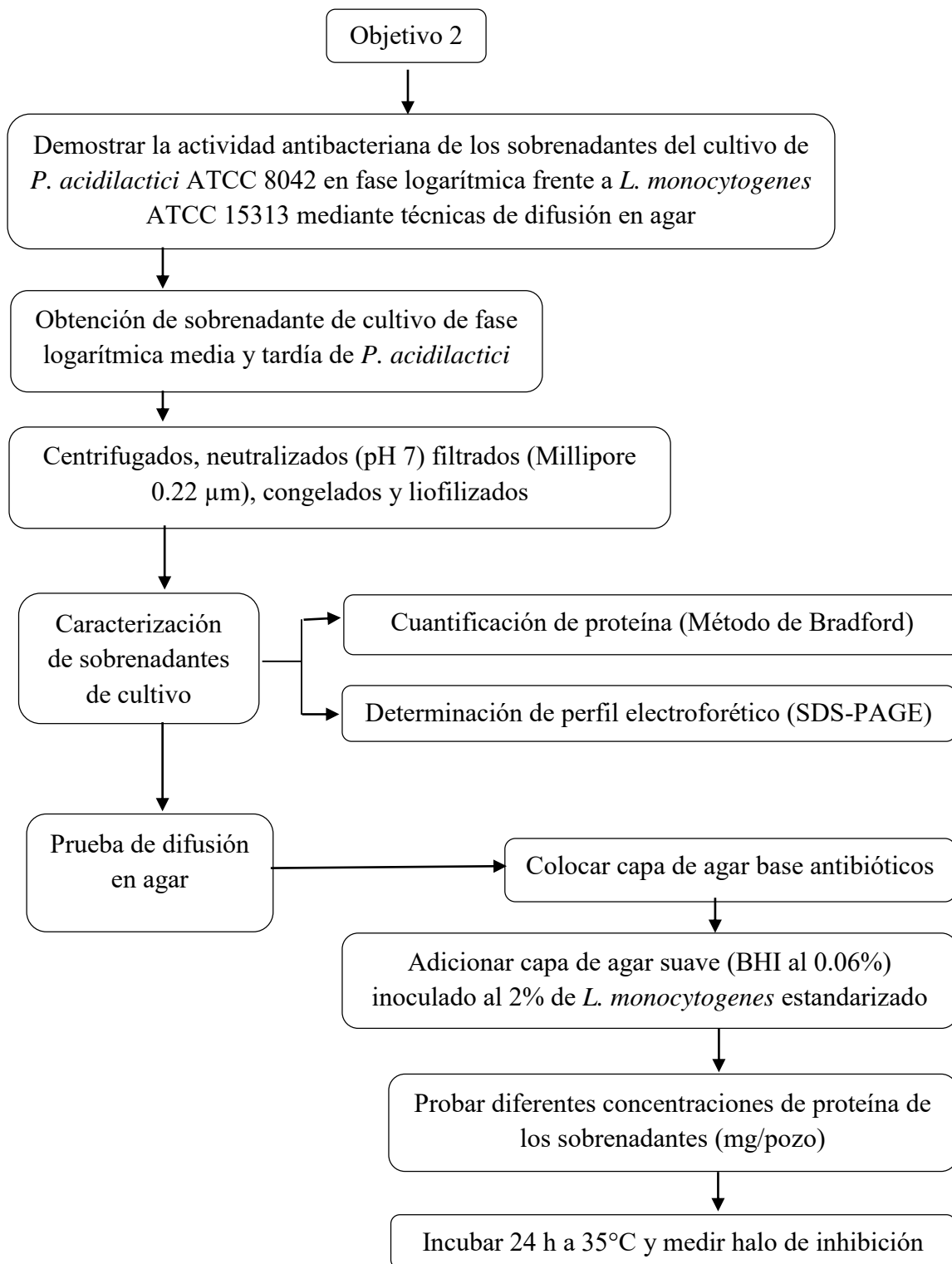


Figura 8. Resumen metodológico del objetivo 2

2.7. Caracterización del sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 con actividad bacteriana

2.7.1. Obtención de Sobrenadantes del cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042

Se reactivó un criovial de la cepa de *P. acidilactici* (en glicerol) en 30 ml de MRS m y se incubó a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h. Se cosecharon las células por centrifugación a 6,000 rpm, durante 10 minutos a 4°C y el paquete celular obtenido se inoculó en 1 L de medio MRS m estéril en Fernbach y se colocaron a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante hasta fase logarítmica media (6 h) y la fase logarítmica tardía (8 h). El cultivo de cada fase se dispensó por separado en tubos de 50 ml de capacidad para centrifugar a 6,000 rpm durante 25 min a 4°C . Se obtuvo el sobrenadante, se tituló el ácido láctico y se neutralizó a $\text{pH } 7 \pm 0.02$ con NaOH 0.1 N (Nieto, 2006). Posteriormente se esterilizó por filtración con membrana Millipore ($0.22 \mu\text{m}$) y se repartió en volúmenes de 25 mL en tubos cónicos con capacidad de 50 mL para congelar durante 24 h a -50°C y liofilizar bajo las mismas condiciones (adaptado de Llorente, 1998).

Para titular el ácido láctico en los sobrenadantes, primero se midió el pH inicial de los 5 mL de los mismos con un potenciómetro; se agregaron 5 gotas de Fenofaleína, y mientras se agitaba suavemente la muestra, con una pipeta graduada se fue agregando por goteo NaOH 0.1 N hasta que la muestra viró a color rosa (NMX-F-102-NORMEX-2010; NOM-155-SCFI-2003).

El ácido láctico se tituló sustituyendo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de ácido láctico} = \frac{(V) (N \text{ NaOH}) (\text{meq ácido láctico})}{\text{Volumen de la muestra}} \times 100$$

Dónde:

V = volumen de NaOH gastado

N = normalidad del NaOH

meq ácido láctico = 0.09

2.7.2. Determinación de concentración de proteínas del sobrenadante

Para la determinación de la concentración de proteínas se construyó una curva patrón con cantidades crecientes de Albúmina Sérica de Bovino (BSA), cantidades decrecientes de agua destilada estéril y 200 μ L del colorante azul brillante de Coomassie G-250 (Reactivo de Bradford), se mezclaron en vórtex (Thermo Scientific) y se dejaron reposar por 5 minutos para tomar la lectura a temperatura ambiente a una longitud de onda de $A_{595\text{nm}}$, en espectrofotómetro (BioPhotometer, EppendorfTM) frente a un blanco de reactivo de Bradford (Anexo 2). Para la cuantificación de la proteína del sobrenadante liofilizado, 25 mL de sobrenadante se resuspendieron en 2.5 mL de agua destilada estéril (concentrado 10X) y se hicieron diluciones tales que permitieran obtener una absorbancia ($A_{595\text{nm}}$) dentro del intervalo de la curva patrón previamente construida, al adicionar colorante azul brillante de Coomassie e incubar la mezcla durante 5 min (Bradford, 1976). La concentración de proteína de los sobrenadantes se obtuvo al interpolar los valores de absorbancia de la muestra, en la curva patrón.

Este método se basa en la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico (azul brillante de Coomassie G-250) y los residuos básicos y aromáticos de las proteínas, en donde se produce un cambio en el color de rojo a azul y un aumento en la absorbancia (465 a 595 nm, el cual se mide en espectrofotómetro (Bradford, 1976).

2.7.3. Determinación de proteínas del sobrenadante por electroforesis en gel SDS-PAGE

El perfil electroforético de las proteínas de los sobrenadantes de *P. acidilactici* ATCC 8042 se realizó de acuerdo a Llorente (2008), siguiendo las especificaciones del equipo Mini PROTEAN® Tetra Cel de BIO-RAD (Anexo 3). La electroforesis se realizó bajo condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970) y reductoras. Se precipitaron las proteínas de las muestras de sobrenadante (10X) con la técnica de Metanol-Cloroformo (Wessel y Flüggé 1984), la cual consistió en tomar 400 μ L de la muestra, adicionar 600 μ L de Metanol, 150 μ L de

Cloroformo y 450 µL de agua destilada estéril, agitando vigorosamente después de cada adición. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 min a 4° C, se retiró la capa acuosa superior y se adicionaron 600 µL de Metanol para volver a centrifugar bajo las mismas condiciones. Se decantó el sobrenadante y se dejó a temperatura ambiente hasta la evaporación total del Metanol.

El pellet de proteínas precipitadas (1 mg) se resuspendió en 40 µL del buffer de Laemmli de Bio-Rad (Duodecil Sulfato de Sodio, azul de bromofenol Tris-HCl y glicerol) con β-mercaptoeptanol (950-50 µL) y se desnaturalizaron a 95°C por 5 min. Se colocaron 30 µL de la muestra en los geles de Poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% y se utilizó un marcador de peso molecular (MPM) (Prestained Low Range SDS/PAGE, Bio-Rad). El gel se dejó correr a 90 volts por 150 min. Los geles se desmontaron y se tiñeron “overnight” con Azul Brillante de Coomasie al 0.25% en 450 mL de Metanol y 100 mL de ácido acético aforado a 1000 mL con agua destilada estéril y se destiñeron en metanol- ácido acético- agua bidestilada (200 mL, 150 mL, 650 mL) en agitación.

Posteriormente se calculó la Masa molecular relativa o movilidad relativa (Anexo 4), que se define como:

$$R_f = \frac{\text{Distancia que migra una determinada proteína}}{\text{Distancia que migra el frente del gel}}$$

(Lomonte, 2009).

2.7.4. Pruebas de actividad antibacteriana

Para determinar la susceptibilidad de los microorganismos a diversos agentes inhibitorios, bajo condiciones de laboratorio, existen diversos métodos estandarizados, en este sentido, para probar la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 (fase media logarítmica y fase tardía logarítmica) sobre *L. monocytogenes*

ATCC 15313 se utilizaron pruebas de difusión en agar y la construcción de la cinética de inhibición, así como la actividad lítica mediante zimogramas *in situ*.

2.7.4.1 Preparación del microorganismo susceptible

Para obtener cultivos estandarizados de la cepa de *L. monocytogenes* ATCC 15313, se inocularon 2 perlas de vidrio en 30 mL de caldo BHI. Se incubó durante 24 h a 35 ± 2 °C, y a partir de éste se inoculó otro matraz con 30 mL de caldo BHI al 2% y se incubó hasta la fase media logarítmica $8 \log$ UFC/mL). Con el cultivo se realizaron series de diluciones decimales y se realizó cuenta en placa en agar BHI al 1.5 % al aplicar 20 μ L por triplicado para cada dilución y se realizó el conteo de las colonias después de 24 h de incubación de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994 (Llorente, 2008).

2.7.4.2 Pruebas de difusión en agar

Se utilizó el agar antibióticos No. 11 para determinar la susceptibilidad al antimicrobiano (Llorente, 1998). Una vez estandarizado el microorganismo susceptible se realizaron las pruebas de actividad antimicrobiana.

De acuerdo a pruebas preliminares en donde fueron variadas las concentraciones del sobrenadante concentrado (10X), las concentraciones de proteína precipitada así como la manera en la que fue resuspendida, PBS (Anexo 4) o BHI, y la cantidad de microorganismo de prueba inoculado al agar suave, se decidió realizar la prueba de difusión de la siguiente manera:

En cajas de Petri estériles se formó una capa base de Agar antibióticos No. 11 estéril (20 mL), una vez solidificada, se adicionó una capa de agar suave (20 mL de caldo BHI con 0.6% de agar bacteriológico) inoculado con 5 μ L de la segunda dilución de *L. monocytogenes* ATCC 15313 estandarizado, equivalente a $5 \log$ UFC/mL en fase logarítmica, sobre ella se

formaron pozos con penicilindros estériles (Pidcock, 1990; Llorente, 1998; NCCLS, 2005, Blanco *et al.*, 2016).

En los pozos formados se agregaron 200 μL de sobrenadante (10X) de cada fase de crecimiento, media y tardía logarítmica (6 y 8 h), correspondientes a 0.008 y 0.009 mg de proteína/pozo, respectivamente. Las cajas se dejaron incubar a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h para observar el halo de inhibición. Se utilizó como control positivo 200 μL de una solución de ácido láctico 0.57%, equivalente a la cantidad de ácido encontrada en los sobrenadantes de cultivo y como control negativo 200 μL de medio MRS modificado.

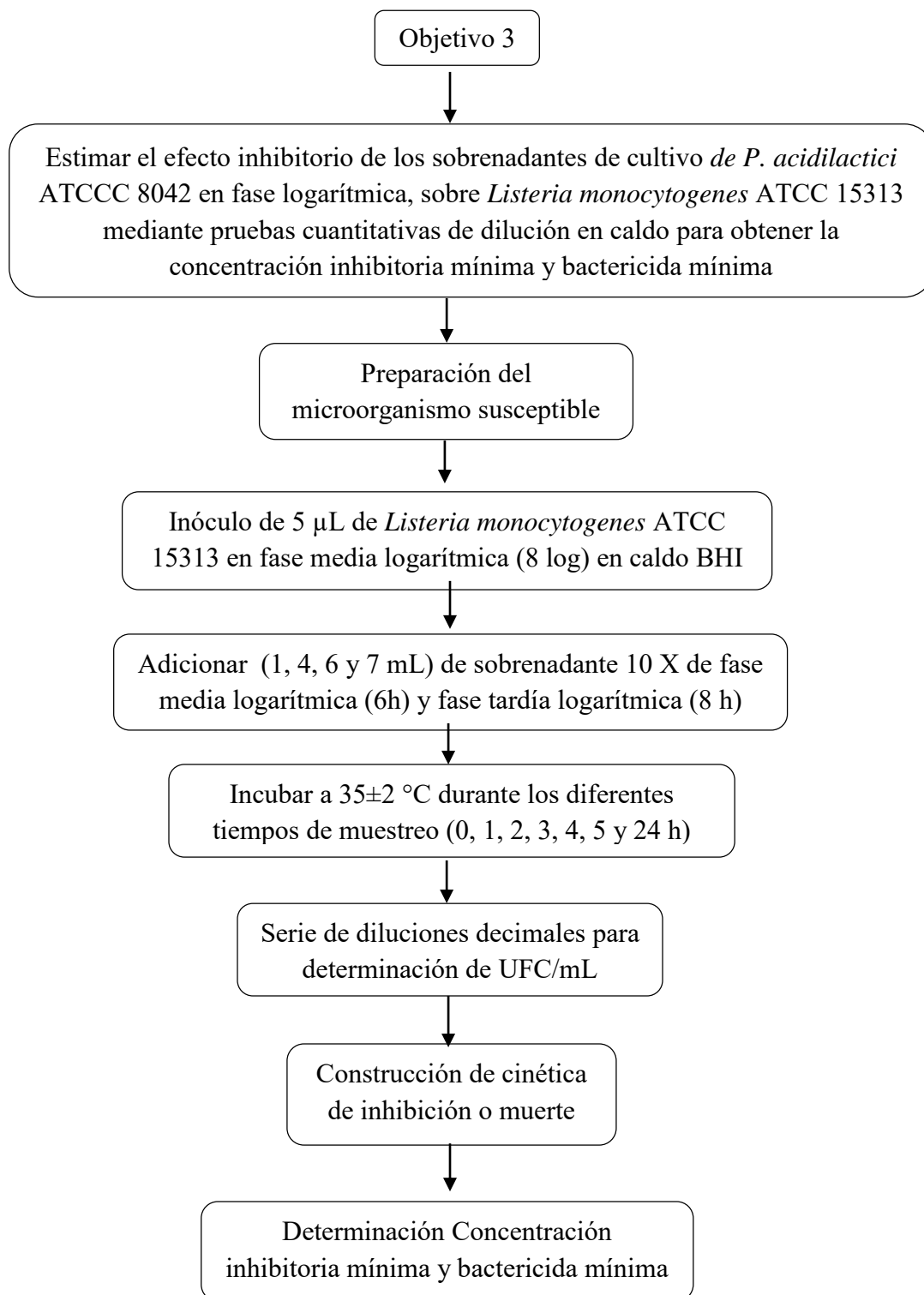


Figura 9. Resumen metodológico del objetivo 3

2.7.4.3 Curva de inhibición o muerte

Para la cuantificación de la actividad antimicrobiana *in vitro* se desarrolló la prueba de dilución en caldo para la construcción de la curva de inhibición o muerte, consistió en utilizar una serie de medios bacteriológicos líquidos a los que se les añadieron cantidades conocidas del sobrenadante y del microorganismo de prueba, y con base en muestreos periódicos se determinó el crecimiento en UFC/mL (Lewis y Montville, 1991; Parish y Davidson, 1993)

Se realizaron pruebas preliminares en donde se utilizaron diversas concentraciones de los sobrenadantes (10X) y diversas concentraciones de la proteína precipitada de los sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042, de la misma manera se variaron los volúmenes y logaritmos del cultivo de *L. monocytogenes* ATCC 15313 estandarizado en fase media logarítmica. De acuerdo a estas pruebas se decidió utilizar un inóculo de 5 µL de la segunda dilución de *L. monocytogenes* estandarizado (equivalente a 3 log UFC/mL) en fase media logarítmica en 1 mL de caldo BHI y posteriormente se adicionaron diferentes volúmenes de los Sobrenadantes 10X (1, 4, 6 y 7 mL), tanto de fase media logarítmica (correspondientes a 0.043, 0.172, 0.258 y 0.301 µL) como de fase tardía logarítmica (0.045, 0.18, 0.27 y 0.315 µL). Con el fin de determinar el crecimiento de *L. monocytogenes* y construir la curva de inhibición, se contaron las UFC/ml a las 0,1, 2, 3, 4, 5 y 24 h, mediante diluciones decimales con agua peptonada 0.1% y sembrando 20 µL por triplicado de cada dilución en cajas con agar BHI al 1.5 % incubando a 35±2°C. Como grupo testigo se utilizó el inóculo de *L. monocytogenes* en caldo BHI sin inocular el sobrenadante, como control positivo se adicionó 1 mL de una solución de ácido láctico al 0.57% y como control negativo, diferentes volúmenes (1, 4, 6 y 7 mL) de medio MRS modificado (10X) adicionados al caldo BHI con *L. monocytogenes*.

Los datos obtenidos de 3 réplicas fueron graficados para obtener la curva de inhibición (Llorente, 2008; NOM-110-SSA1-1994).

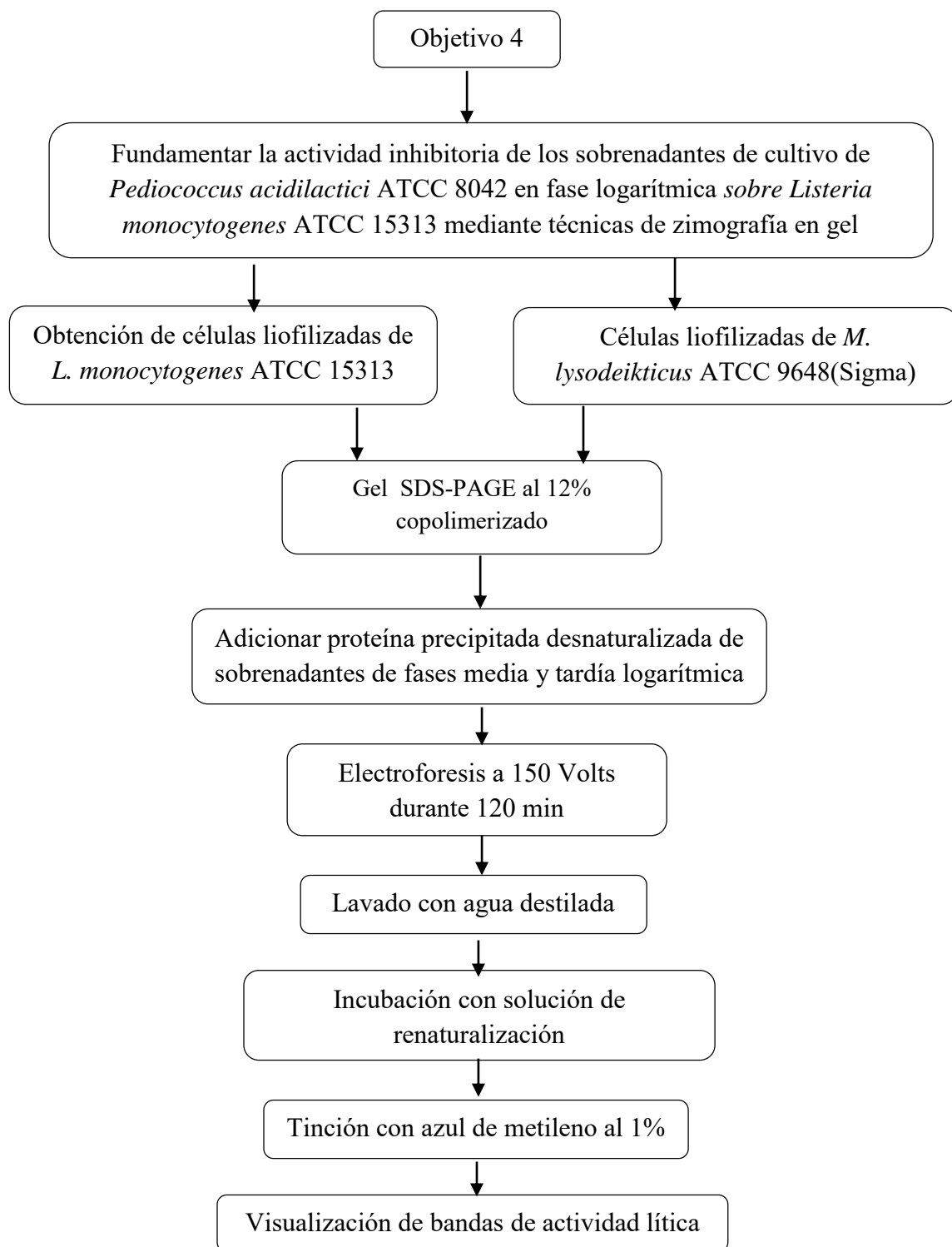


Figura 10. Resumen metodológico del objetivo 4

2.8. Evaluación de actividad lítica del sobrenadante por técnicas zimográficas

Para fundamentar la actividad inhibitoria de los sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 se emplearon técnicas zimográficas.

Los métodos de zimografía *in situ* empleados se fundamentan en la copolimerización de los sustratos proteicos, en este caso se emplearon las células liofilizadas de *M. lysodeikticus* y de *L. monocytogenes* con la mezcla de poliacrilamidas, que permite identificar las bandas de actividad lítica (Peptidoglicano hidrolasa) y a su vez separar a las proteínas responsables por electroforesis en gel. Es necesario lavar los geles seguido de un paso de renaturalización, para poder evidenciar la actividad, al recuperar su estructura funcional (LeClerc y Asselin, 1989).

Se realizaron electroforesis en geles desnaturalizantes de Poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% copolimerizado con células liofilizadas de *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 y *M. lysodeikticus* ATCC 4698 (Sigma) para evidenciar la actividad de PGH presente en los sobrenadantes.

Las células de *L. monocytogenes* ATCC 15313 para copolimerizar el gel, se cosecharon de un cultivo al 2% (v/v) en 30 mL de BHI hasta fase media logarítmica, se obtuvo el paquete por centrifugación a 6,000 rpm durante 20 min a 4° C, se congelaron y liofilizaron de la misma manera que el sobrenadante.

Se precipitó la proteína de los sobrenadantes (fase media logarítmica y fase tardía logarítmica) por el método de Metanol-Cloroformo (Wessel y Flügge, 1984) (aproximadamente 0.06 mg) y se desnaturalizó a 95°C por 5 min junto a 35 µL de buffer de muestra de Laemmli (BIO-RAD) y 2-mercaptoetanol.

Los geles al 12 % se copolimerizaron con 0.2% (w/v) de células liofilizadas de *L. monocytogenes* ATCC 15313, resuspendidas en parte del volumen de agua a adicionar en su formulación. La electroforesis se llevó a cabo durante 150 volts durante 120 min, en cámara Mini PROTEAN® Tetra Cel de BIO-RAD. Los geles se lavaron con agua destilada estéril durante 30 min y se incubaron en una solución amortiguadora de renaturalización (Tris-HCl 25 mM pH 8 con Tritón al 1%) “overnight” a 35 ± 2 °C en agitación suave. Se tiñeron con azul de metileno (Sigma) al 1% v/w en KOH al 0.1% w/v y se destiñeron con agua destilada en agitación suave a temperatura ambiente (Llorente, 2008; Mora, 2003).

Para el control se utilizaron como sustrato en gel SDS-PAGE al 12%, células liofilizadas de *M. lysodeikticus* ATCC 4698 al 2% (w/v), utilizando el procedimiento descrito anteriormente.

3. RESULTADOS

3.1 Verificación de la pureza de las cepas

La pureza de las cepas bacterianas empleadas para el desarrollo de este trabajo se verificó mediante la observación de morfología de las colonias mediante siembra en agar y la técnica de tinción de Gram.

La tinción de Gram es una tinción simple que clasifica a las bacterias como Gram positivas o Gram negativas en función de la composición y estructura de la pared celular.

3.1.1 Morfología colonial y tinción de Gram de *P. acidilactici* ATCC 8042

En las placas de agar MRS se observaron colonias circulares, blanquecinas, lisas y convexas, con bordes definidos, con un diámetro de alrededor de 1 a 2 mm (Figura 11a). En el frotis se identificaron cocos Gram positivos agrupados en pares y tétradas, siendo éste tipo de disposición una característica del microorganismo (Figura 11b). Los hallazgos concuerdan con lo establecido por Axelsson (2004).

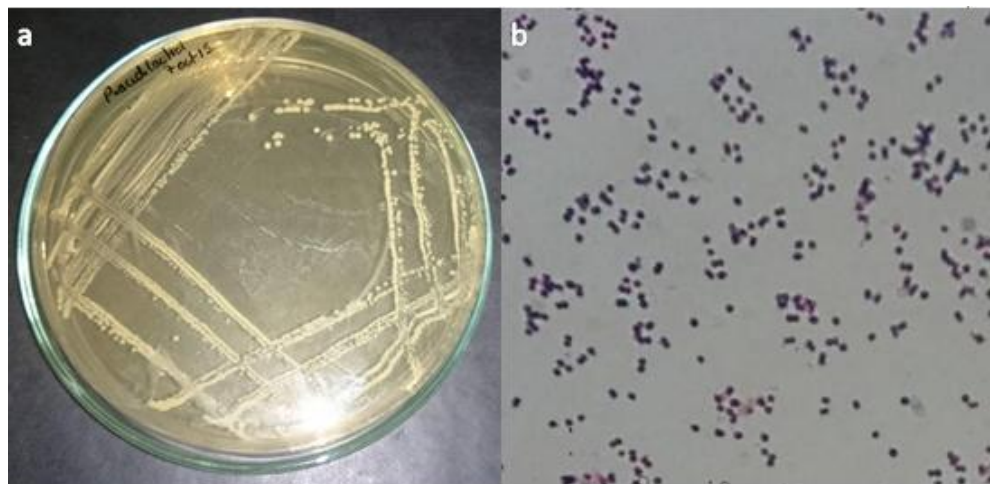


Figura 11. Morfología colonial (a) y tinción de Gram de *P. acidilactici* ATCC 4082 (b)

3.1.2. Morfología colonial y tinción de Gram de *L. monocytogenes* ATCC 15313

Se observaron colonias pequeñas (1 a 2 mm), lisas, con bordes regulares (Figura 12a) en el agar BHI a las 24 h de incubación. En el frotis se identificaron bacilos cortos Gram positivos que pueden estar solo o formando cadenas cortas (Figura 12b). Los hallazgos son los esperados de acuerdo a Wilson (2008).

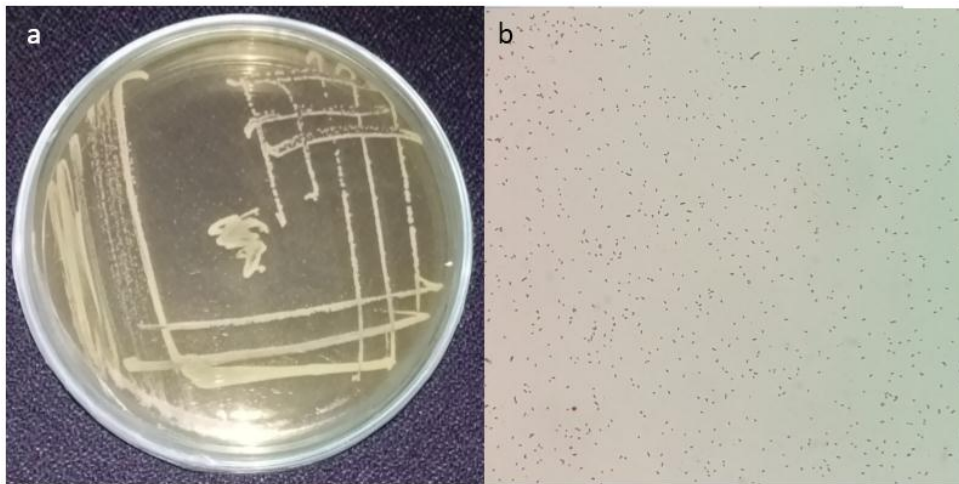


Figura 12. Morfología colonial (a) y tinción de Gram de *L. monocytogenes* ATCC 15313(b)

3.2 Identificación molecular de las cepas mediante PCR

3.2.1 Identificación mediante PCR de la cepa de *P. acidilactici* ATCC 8042

Los productos de PCR de *P. acidilactici* ATCC 8042 visualizados en electroforesis en gel y fotografiados se muestran en la (Figura 13a). El carril 3 muestra la ausencia de banda de amplificación, ya que aquí se colocó la muestra control (sin material genético). En el carril 2 se observan dos bandas amplificadas, de aproximadamente 870 pb y de 449 pb, las cuales corresponden a la subunidad 16S del ARN ribosomal específico del género *Pediococcus* y al gen que codifica para la enzima D-lactato deshidrogenasa para la identificación de la especie

P. acidilactici respectivamente. Se logró la identificación de acuerdo a lo establecido por (Mora, 1997) corroborado por Llorente, 2008 y Munguía-Villavicencio, 2015.

3.2.2 Identificación mediante PCR de la cepa de *L. monocytogenes* ATCC 15313

Los geles para la electroforesis de los productos de PCR de *L. monocytogenes* ATCC 15313 se muestran en la (Figura 13b). Se observa en el carril 2 una banda de aproximadamente 1528 pb que corresponden a la amplificación del gen *iap* para la identificación del género *Listeria* y en el carril 3 se observa una banda amplificada de aproximadamente 450 pb correspondientes a la especie *L. monocytogenes*. Los hallazgos concuerdan con lo establecido por (Bubert, 1999; Manzano, 1998).

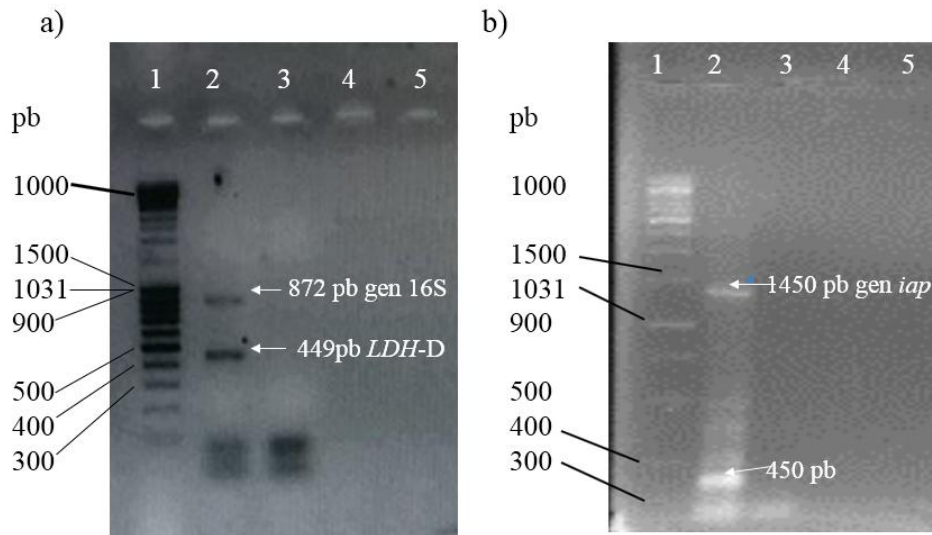


Figura 13. Electroforesis en gel para la amplificación de los productos de PCR para la identificación molecular de *P. acidilactici* y *L. monocytogenes*

a) Carril 1 (Master Ruler DNA Ladder Mix), carril 2 (ADN *P. acidilactici*), carril 3 control negativo (sin ADN). **b)** Carril 1 (Master Ruler DNA Ladder Mix), carril 2 Identificación de género (ADN *Listeria monocytogenes*), carril 3 Identificación de especie (ADN *L. monocytogenes*), carril 4 control negativo (sin ADN).

3.3 Cinéticas de crecimiento de las cepas problema

3.3.1 Cinética de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

En la Figura 14 se presenta la cinética de crecimiento de *P. acidilactici*, en donde se identificó la ausencia de la fase lag, estableciéndose la fase logarítmica temprana a las 4 h, la media a las 6 h y la tardía a las 8 h, determinándose un promedio para D.O. de las 6 h de 0.860 ± 0.02 y a las 8 h, 1.127 ± 0.05 , con $3.47 \times 10^8 \pm 0.1$ UFC/ml, seguida fase estacionaria de las 12 a las 24 h. Las BL crecen rápidamente durante la fermentación, alcanzando niveles de 10^8 a 10^9 UFC/ml; característica importante para *Pediococcus spp.* (Leistner, 1995).

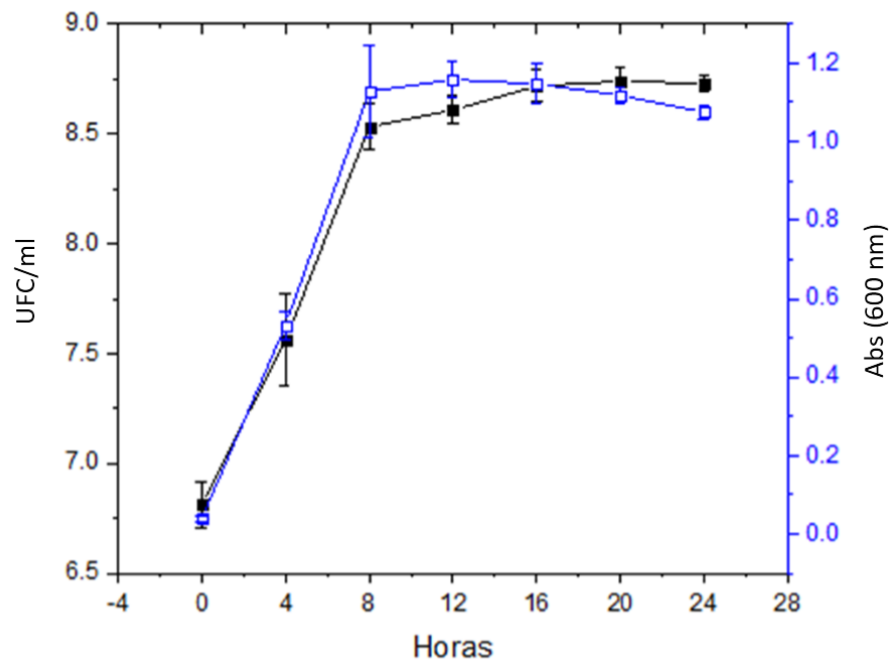


Figura 14. Cinética de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC 8042

■ UFC/mL; □ Abs (600 nm)

Se presenta promedio y desviación estándar de tres réplicas

3.3.2 Cinética de crecimiento de *Listeria monocytogenes* ATCC 15313

En la figura 15 se observa el promedio de las cinéticas de crecimiento realizadas en medio BHI, en donde el microorganismo alcanza su fase media logarítmica a las 6 h de cultivo con una población de $8.08 \times 10^8 \pm 0.04$ UFC/ml y una D.O. de 0.458 ± 0.01 (fase establecida para someterla al ensayo frente al sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici*). A partir de las 12 horas de crecimiento se observa una D.O. en disminución, lo que permitió establecer como fase estacionaria. Estos resultados coinciden con lo reportado por Cheroutre (1998), quien encuentra la fase media logarítmica entre las 6 y las 7 horas, en ausencia de la fase de latencia.

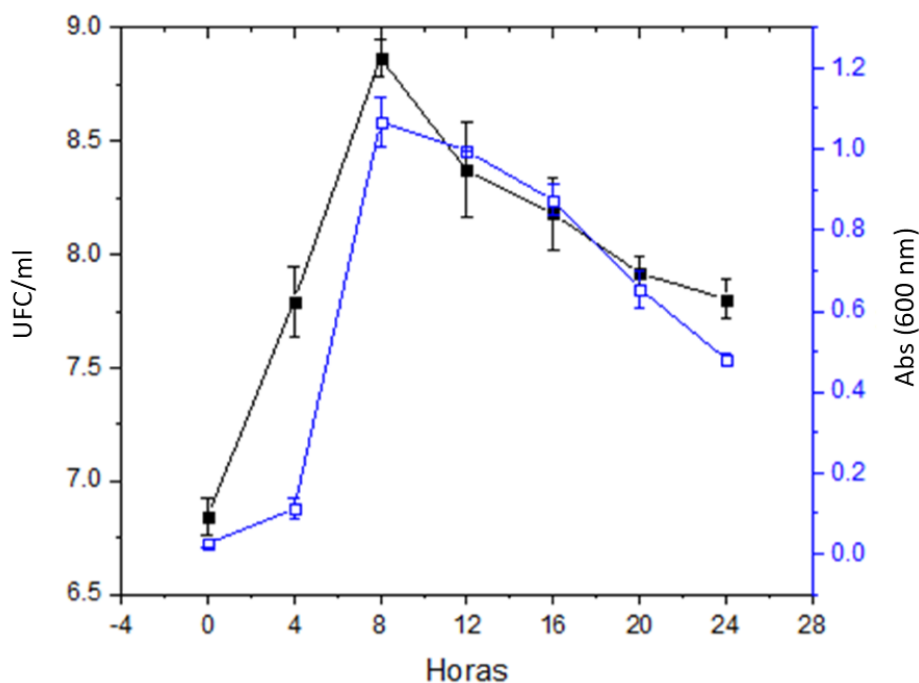


Figura 15. Cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* ATCC 15313

■ UFC/mL; □ Abs (600 nm)

Se presenta promedio y desviación estándar de tres réplicas

Con los datos obtenidos en la construcción de la cinética de crecimiento, fue posible determinar la tasa de crecimiento (k) y el tiempo de generación (t_{gen}) para ambas cepas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Parámetros cinéticos de ambas cepas bacterianas

Cepa	Tasa de crecimiento (gen/h)	Tiempo de generación (h/gen)
<i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	1.14	0.87
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	0.98	1.01

3.4 Caracterización de los sobrenadantes de *P. acidilactici* ATCC 8042

De acuerdo a las cinéticas de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC se decidió obtener el sobrenadante de la fase logarítmica de cultivo, según la metodología de Llorente (2008). Se obtuvieron entonces, los sobrenadantes de las horas 6 y 8 (fase logarítmica media y tardía) con el fin de caracterizarlos respecto a la cuantificación de proteína, perfil electroforético, actividad en pruebas antimicrobianas como difusión en agar y dilución en caldo, así como su actividad *in situ* mediante zimografía, utilizando como microorganismo susceptible *L. monocytogenes* ATCC 15313.

3.4.1 Cuantificación de proteína por Método de Bradford

La cuantificación de proteínas del sobrenadante del cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 se llevó a cabo por el método de Bradford (1976). Después de construir una curva patrón con diluciones conocidas con Albúmina Sérica Bovina (BSA) (BIO-RAD), se graficaron los resultados de donde se obtuvo la siguiente ecuación: $y = 0.0404x + 0.013$ y se estableció una correlación entre los resultados de $r^2 = 0.9924$ (Anexo 5). De esta manera fue posible obtener la concentración de proteína mediante la interpolación de los valores de absorbancia (595 nm) de la muestra de sobrenadante 10X en la curva patrón y despejando los valores respectivos de x de la ecuación de la recta ($y = mx + b$).

La concentración de proteínas del sobrenadante es expresada por los promedios y la desviación estándar de n=5 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Concentración de proteína de los sobrenadantes de *P. acidilactici* ATCC 8042 en fase media y tardía logarítmica

Fase del cultivo de <i>P. acidilactici</i> 8042	Hora de cultivo	Concentración de proteína (mg/mL)
Media logarítmica	6	0.043±0.1
Tardía logarítmica	8	0.045±0.1

3.4.2 Perfil electroforético (SDS-PAGE) de los sobrenadantes

Para la precipitación de proteínas se adaptó la metodología establecida por Wessel (1984) aplicada previamente por Munguía-Villavicencio (2015) para una mayor definición de los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes de cultivo de 6 y 8 h de *P. acidilactici* ATCC 8042. En la figura 16 se muestra el gel de electroforesis SDS-PAGE al 12% (Figura 16) con 1 mg de proteína obtenida de los sobrenadantes de ambas fases de crecimiento.

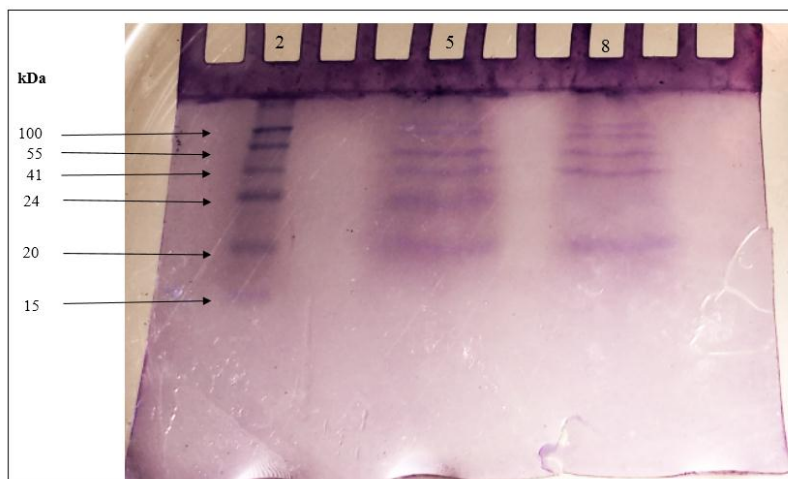


Figura 16. Perfil electroforético de las proteínas de sobrenadantes (SDS-PAGE)

Carril 2. MPM (Prestained Low Range SDS/PAGE, Bio-Rad), Carril 5. Proteína precipitada de sobrenadante de 8 de cultivo de *P. acidilactici*, Carril 8. Proteína precipitada de sobrenadante de 6 h de cultivo.

La electroforesis en gel SDS-PAGE permite estimar el peso molecular (PM) de una proteína, comparando su Movilidad relativa (Rf) electroforética con la de proteínas de un PM conocido (Lomonte, 2009).

Se calculó la Masa molecular relativa de las proteínas de los sobrenadantes de 6 y de 8 h encontradas en los gels, de acuerdo al peso molecular de los Marcadores de Peso Molecular (MPM) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Masa molecular relativa expresada en kDa

Masa molecular relativa (kDa) de las proteínas de los sobrenadantes de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 en perfiles electroforéticos	
Sobrenadante de 6 h de cultivo	Sobrenadante de 8 h de cultivo
77.64±0.5	77.64±0.3
70.79±0.1	70.79±0.1
54.37±0.3	54.37±0.3
41.53±0.2	41.53±0.2
	33.81±0.4
20.333±0.1	20.333±0.1

Se presenta promedio y desviación estándar de 3 réplicas

Se puede observar que la fase logarítmica de crecimiento presenta un perfil electroforético similar entre la fase media y la tardía, difiriendo solo de una banda de aproximadamente 33 kDa que se encuentra ausente en el sobrenadante obtenido a las 6 horas.

3.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042

3.5.1 Pruebas de difusión en agar

EL NCCLS (2005) recomienda utilizar el agar Müller Hinton para mediar la susceptibilidad a antimicrobianos, sin embargo, de acuerdo a pruebas preliminares, las pruebas de difusión se realizaron con Agar antibióticos No. 11, probándose los sobrenadantes de 6 y 8 h de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042, frente a un cultivo estandarizado de *L. monocytogenes* en fase logarítmica.

Tras probar en las pruebas de difusión en agar, adicionando la proteína precipitada, así como diferentes medios para su resuspensión y diversos volúmenes de sobrenadante, estandarizando el microorganismo de prueba, empleando variantes de la técnica de difusión en agar, como la técnica entre capas, sólo fue posible obtener halo de inhibición de 1.16 ± 0.05 cm al agregar 200 μ L de la solución de ácido láctico al 0.57% en un pozo (control positivo) (Figura 17), por lo que la actividad específica de los sobrenadantes no fue posible determinarse mediante la prueba de difusión en agar, definiéndose las unidades de actividad específica como los mm de inhibición registrados alrededor del pozo por mg de proteína colocado en él (Bhunja, 1991).

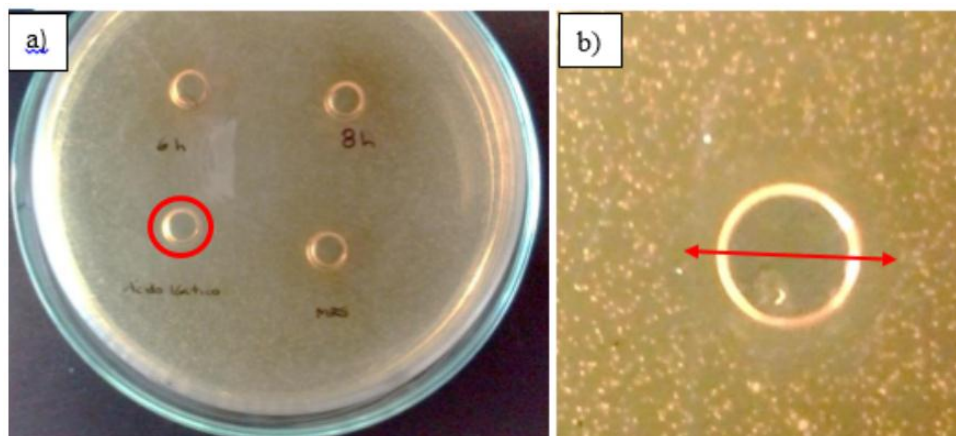


Figura 17. Prueba de difusión con pozos en capa suave de Agar BHI al 0.6% inoculado con *L. monocytogenes* ATCC 15313 estandarizada

- a) Pozos adicionados con 200 μ L de sobrenadante de cultivo (10X) 6 y 8 h, ácido láctico al 0.57% (halo de inhibición) y medio MRS modificado (10X).
 b) Halo de inhibición de 1.16 ± 0.05 cm por 200 μ L de ácido láctico

Es importante recordar que los resultados de las pruebas de difusión tienen el limitante propio de la difusión del agente inhibidor por lo que fue necesario realizar pruebas cuantitativas complementarias (NCCLS, 2005).

3.5.2 Pruebas de dilución en caldo

La cuantificación *in vitro* de la actividad antimicrobiana se realiza habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución, denominadas pruebas descriptivas (Hoover, 1993).

De acuerdo pruebas preliminares donde se probó la adición de proteína precipitada resuspendida en diversos medios, como PBS y Tritón al 0.1%, así como la adición de diferentes volúmenes de sobrenadante concentrado, una vez estandarizado el microorganismo sensible (previamente descrita su preparación), se inocularon 5 μ L de *L. monocytogenes* ATCC 15313 en 995 μ L de BHI y se adicionaron diferentes concentraciones de proteína de sobrenadante 10X de fase media y tardía logarítmica (6 y 8 h) para encontrar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida.

Se adicionaron 1, 4, 6, y 7 ml del sobrenadante concentrado de 6 h de cultivo equivalentes a 0.043, 0.017, 0.258, 0.301 mg de proteína (Figura 18) y del sobrenadante de cultivo de 8 h, equivalentes a 0.045, 0.18, 2.7 y 0.315 mg de proteína respectivamente (Figura 19). La cuantificación de las células viables se realizó a las 0, 1, 2, 3, 4 y 24 h, y se graficó una curva de inhibición con los resultados obtenidos.

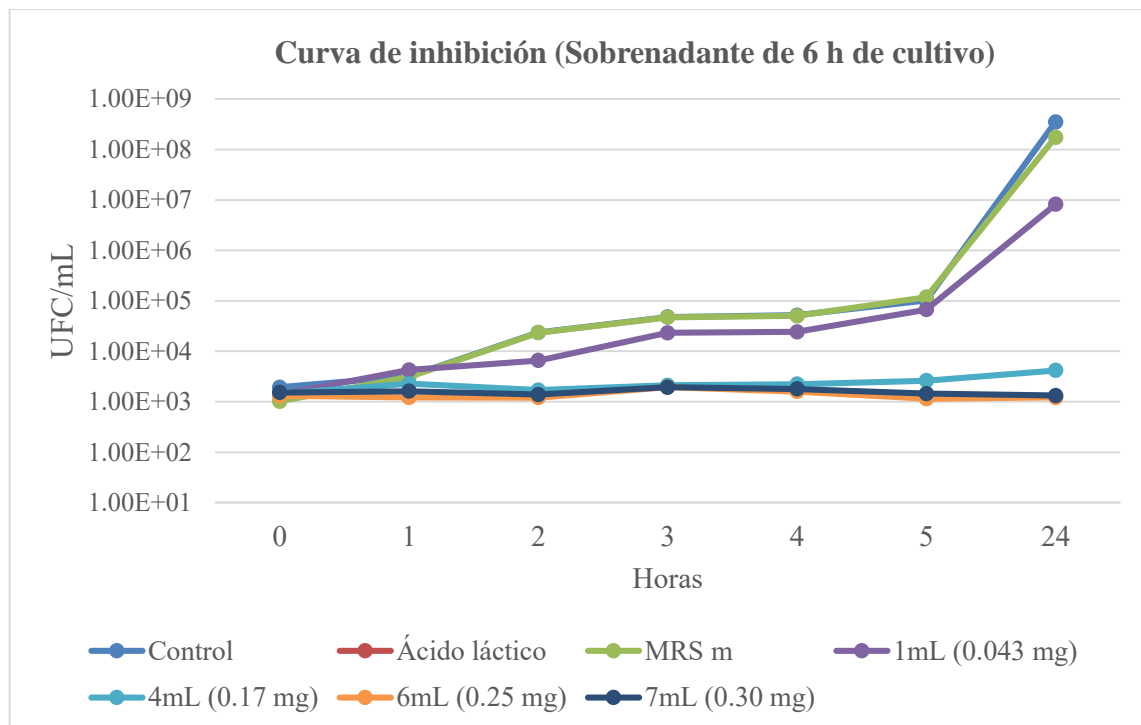


Figura 18. Curva de inhibición de *L. monocytogenes* ATCC 15313 frente a diferentes cantidades de proteína de sobrenadante de cultivo de 6 h de *P. acidilactici* ATCC 8042. Proteína en sobrenadante (1 mL= 0.043 mg; 4 mL= 0.172 mg; 6 mL= 0.258 mg y 7 mL= 0.301); grupo control (*L. monocytogenes* en BHI) y control negativo 1000 μ L de medio MRS modificado

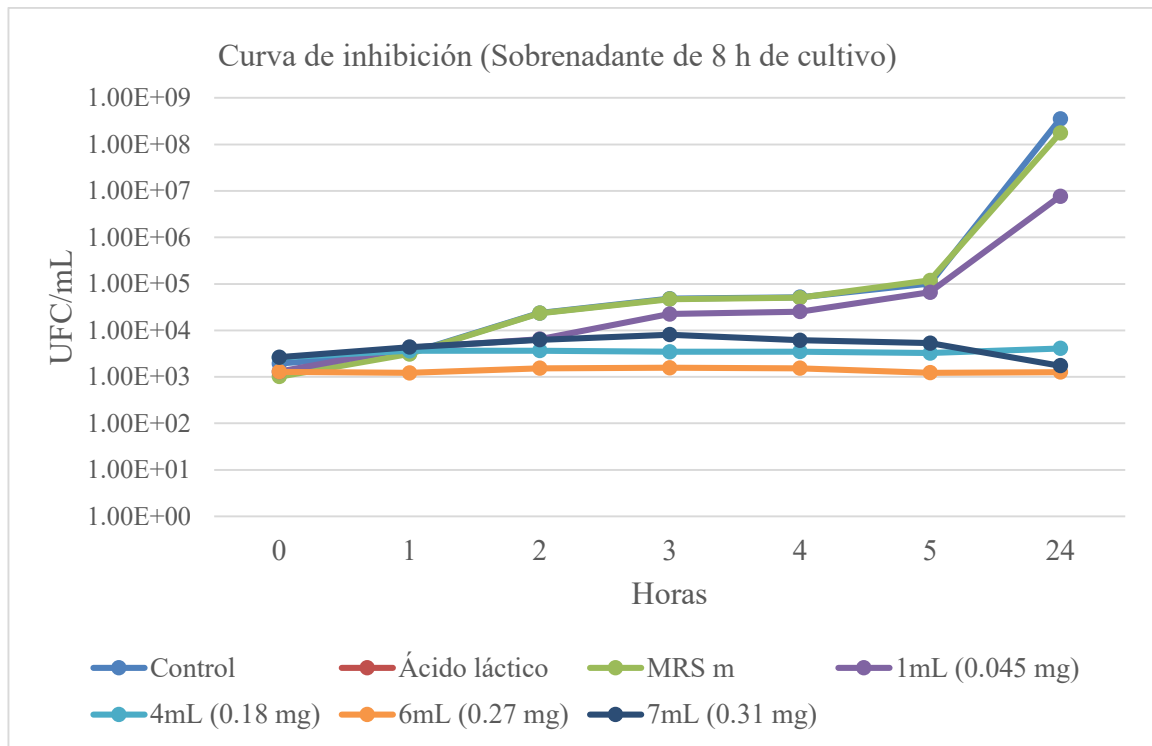


Figura 19. Curva de inhibición de *L. monocytogenes* ATCC 15313 frente a diferentes cantidades de proteína de sobrenadante de cultivo de 8 h de *P. acidilactici* ATCC 8042

Proteína de sobrenadante (1 mL=0.045 mg; 4 mL= 0.18 mg; 6 mL= 0.27 mg y 7 mL= 0.315 mg), grupo control (*L. monocytogenes* en BHI) y control negativo (1000 μ L) de medio MRS m

En las gráficas se observa que el grupo control (*L.monocytogenes* en caldo BHI), así como en control negativo, (*L. monocytogenes* en caldo BHI más medio MRS m), tuvieron un crecimiento a la 24 h de 8 log, mientras que al adicionar el sobrenadante de las fases tanto media (6 h) como tardía logarítmica (8h) hubo una disminución del conteo de células viables a las 24 h de incubación, cuando se inicia con 3 log (hora 0).

El comportamiento de *L. monocytogenes* ATCC 15313 es similar cuando se adiciona el mismo volumen de sobrenadante (10X) de diferentes fases de cultivo, lo que podría explicarse a que en las distintas fases obtenidas existe una concentración similar de proteína.

Con la determinación de UFC/ml a las 24 h se observa que al adicionar 1 mL de sobrenadante 10X (0.043 y 0.045 mg de proteína de sobrenadante de 6 y 8 h de cultivo, respectivamente) se observa un efecto inhibitorio de 1 log en el crecimiento de *L. monocytogenes* en comparación con el grupo control. Mientras que al adicionar mayor volumen (4,6 y 7 mL) de sobrenadante de ambas fases de cultivo, es decir mayor cantidad de proteína, se observa una inhibición de 5 log efecto sobre el microorganismo de prueba, al alcanzar un crecimiento de 3 log a las 24 h.

En la gráfica no fue posible representar el efecto bacteriolítico del ácido láctico como control positivo, sobre *L. monocytogenes*, ya que inhibió completamente el crecimiento del microorganismo de prueba desde la hora 0, lo que podría indicar actividad bactericida sobre el microorganismo de prueba.

La actividad inhibitoria del sobrenadante se determinó mediante la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), es decir la concentración más baja del sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 que inhibió el crecimiento de *L. monocytogenes* ATCC 15313 de acuerdo a las cinéticas de inhibición. De este modo, la concentración inhibitoria mínima del sobrenadante de 6 h de cultivo es de **0.043 mg/mL** (1 mL de sobrenadante) y la del sobrenadante de 8 h de cultivo es de **0.045 mg/mL** (1 mL de sobrenadante), obteniéndose una reducción de 1 log UFC/mL sobre 3 log UFC/mL de *L. monocytogenes* ATCC 15313.

3.5.2.1 Análisis estadístico de la Prueba de dilución en caldo

Se realizó un análisis de Varianza con un diseño factorial en el programa estadístico MINITAB. Para el diseño factorial se estableció como variable de respuesta, las UFC/mL obtenidas. También se establecieron los 3 siguientes bloques: fase de obtención de sobrenadantes, la concentración de proteína (mL de sobrenadante 10X adicionado) y el tiempo de muestreo, cada uno con sus correspondientes niveles. Los niveles establecidos para la fase de obtención de sobrenadantes, fueron 2 (6 y 8 h); para la concentración de proteína, 6 niveles (1, 4, 6, y 7 mL de sobrenadante 10 X, Medio MRS m y BHI adicionado con *L.*

monocytogenes ATCC 15313) y para el tiempo de muestreo, 7 niveles (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 24 h). Se analizó el efecto de cada una de las variables independientes sobre la variable de respuesta, es decir, fase de obtención de sobrenadante (A), concentración de proteína (B) y tiempo de muestreo (C). Así mismo se analizó el efecto de la interacción AB, AC, BC y ABC sobre la variable de respuesta.

De acuerdo al análisis estadístico se determinó que entre las concentraciones de proteínas obtenidas de los sobrenadantes de las distintas fases de crecimiento no hay diferencia significativa ($p > 0.05$), es decir, 0.043 mg/mL de proteína de sobrenadante obtenido a las 6 h de cultivo, no es diferente a 0.045 mg/mL de proteína de sobrenadante de 8 h de cultivo (Figura 20).

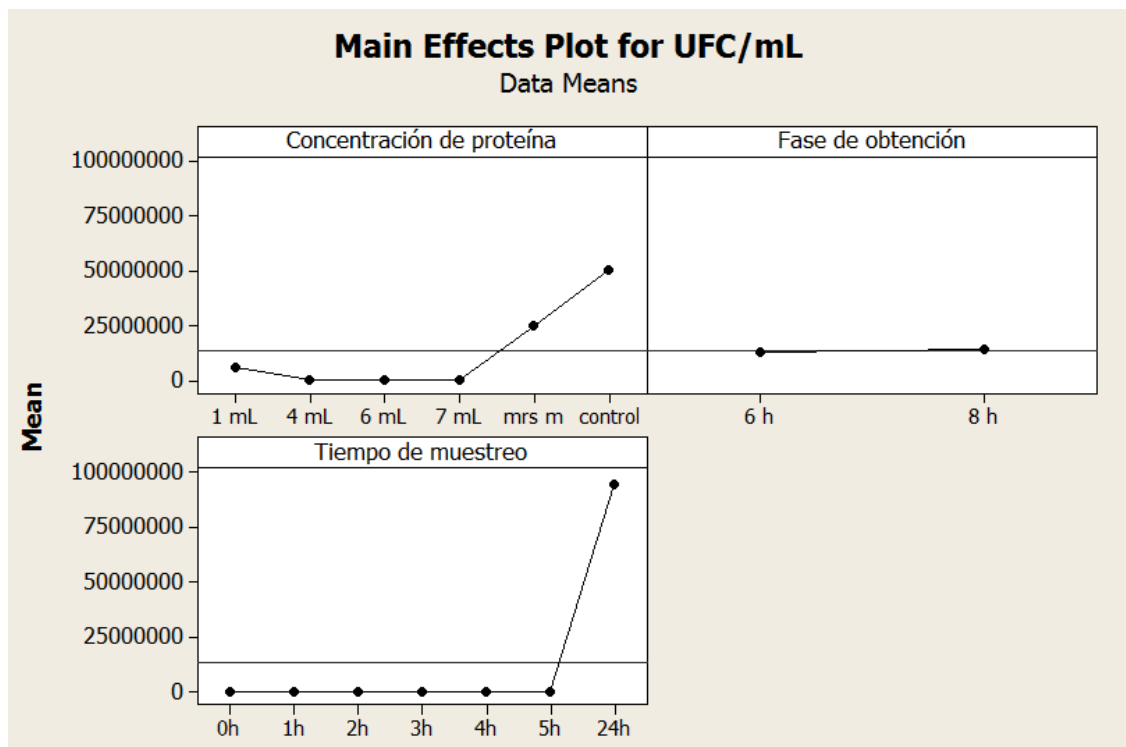


Figura 20. Análisis de resultados de prueba de dilución en caldo

Sin embargo los diversos volúmenes de sobrenadantes adicionados, es decir, 1, 4, 6 y 7 mL, (correspondientes a 0.043, 0.17, 0.25 y 0.30 mg de proteína de sobrenadante de 6 h de cultivo

y 0.045, 0.18, 0.27 y 0.31 mg de proteína de sobrenadante de 8h, respectivamente), sí tienen un efecto diferente respecto al control (Medio BHI inoculado con *L. monocytogenes*) y al control negativo (BHI inoculado con *L. monocytogenes* más Medio MRS m) al analizar las UFC/mL, obteniendo menor número al adicionar la proteína de sobrenadante (Figura 20). Lo que indica que la proteína se sobrenadante 10X de cualquiera de las fases, tiene un efecto significativo ($p < 0.05$) en la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* ATCC 15313.

Asimismo, el tiempo de muestreo tiene un efecto significativo a las 24 h de incubación ($p < 0.05$) en el conteo de UFC/mL, en relación a las 0, 1, 2, 3, 4 y 5 h de muestreo (Figura 20).

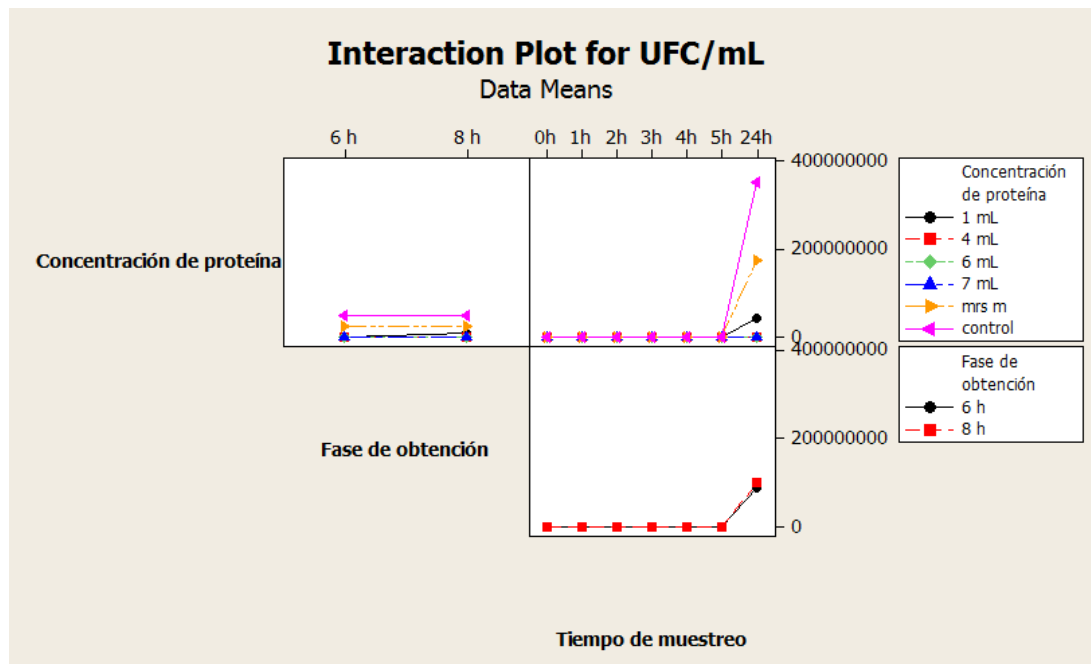


Figura 21. Análisis estadístico en MINITAB, del efecto de las variables combinadas sobre las UFC/mL

Al analizar el efecto de la interacción de las variables (Figura 21) sobre las UFC/mL, se observa que la concentración de proteína* tiempo de muestreo (BC) es la que tiene un efecto significativo ($p < 0.05$), determinándose una mayor inhibición en el conteo de UFC/mL a las 24 h de muestreo, conforme aumenta la concentración de proteína adicionada (de

sobrenadante de ambas fases de obtención). De esta manera, independientemente de la fase de cultivo de la que se obtuvo el sobrenadante, se determinó que adicionando 4, 6 y 7 ml del sobrenadante 10X, el efecto inhibitorio es similar entre sí, obteniéndose conteos de UFC/mL (log) similares a las 24 h, sin embargo este efecto inhibitorio es diferente y mayor al que se obtiene al adicionar 1 mL de proteína de sobrenadante 10X.

Las interacciones AB (fase de obtención* concentración de proteína), AC (fase de obtención* tiempo de muestreo) y ABC (fase de obtención* concentración de proteína* tiempo de muestreo) no presentan significancia estadística ($p>0.05$) (Figura 21).

Ante estos resultados se esclareció que no hay diferencia significativa entre la concentración de proteína que poseen los sobrenadantes obtenidos de las diferentes fases de cultivo, sin embargo al adicionarse ya sea 1, 4, 6 o 7 mL de sobrenadante 10X (los cuales corresponden a diferentes concentraciones de proteína previamente indicadas) sí se obtiene un efecto significativo sobre el conteo de UFC/mL ($p<0.05$), mientras que el control (BHI con *L. monocytogenes*) y el control negativo (BHI más *L. monocytogenes* y Medio MRS m) no tienen significancia estadística. De esta manera se evidencia un efecto inhibitorio en el crecimiento de *L. monocytogenes* ATCC 15313 a las 24 h de incubación, por parte de los sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042.

3.6. Determinación de actividad lítica de los sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042

3.6.1 Zimograma copolimerizado con *Listeria monocytogenes* ATCC 15313

Para la detección de hidrolasas de paredes celulares en geles de poliacrilamida al 12%, se empleó la técnica de zimografía copolimerizada con células liofilizadas de *L. monocytogenes* ATCC 15313 y con células de *M. lysodeikticus* ATCC 4698 (microorganismo indicado como sustrato en pruebas de actividad lítica por la NCCLS), obteniéndose las siguientes imágenes (Figura 22 y Figura 23) de actividad *in situ* de los sobrenadantes de cultivo de 6 h y 8 h de la

cepa *P. acidilactici* ATCC 8042, en donde se evidencia la actividad lítica como zonas claras de diversos pesos moleculares.

3.6.1.1 Zimograma *in situ* con proteína de sobrenadante de cultivo de fase media logarítmica de *P. acidilactici* ATCC 8042

En el gel de actividad *in situ* copolimerizado con *L. monocytogenes* ATCC 15313 fue posible determinar 2 bandas de actividad lítica de aproximadamente 75 ± 0.03 , y 23 ± 0.001 kDa por la proteína de sobrenadante de *P. acidilactici* ATCC 8042 de 6 h (Figura 22 a), así como un bandeo secundario poco definido de 25 ± 0.003 , mismas que se observan en el gel copolimerizado con el microorganismo control (Figura 22 b). Las bandas de lisis encontradas coinciden con las bandas encontradas en el perfil electroforético de 20 y 77 kDa. Esto evidenció que los sobrenadantes de *P. acidilactici* ATCC 8042 poseen actividad de PGH en células Gram positivas, como lo había demostrado Llorente en 2008 contra *M. lysodeikticus* ATCC 4698.

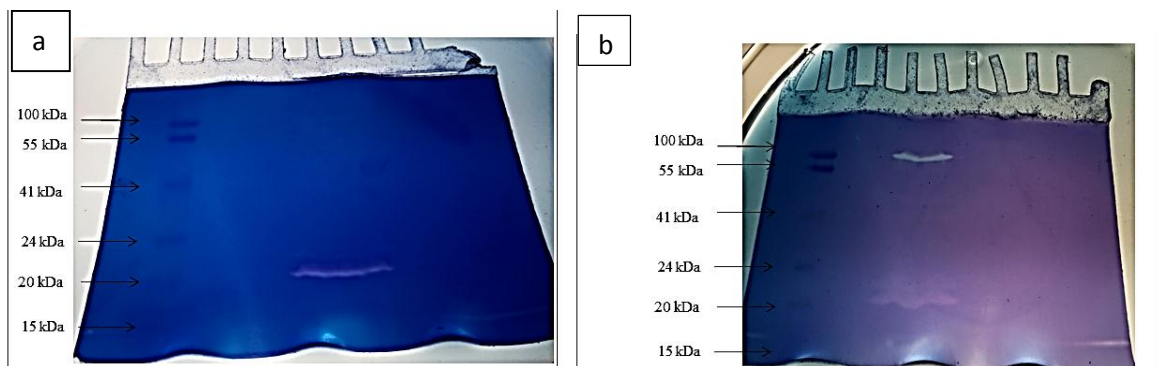


Figura 22. Gel SDS-PAGE copolimerizado y proteína de sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 de 6h

SDS-PAGE al 12% copolimerizados con

- a) células liofilizadas de *L. monocytogenes* ATCC 15313 Carril 2 MPM (Prestained SDS/PAGE Low Range, BIO-RAD). 6. Proteína (0.06 mg) del Sobrenadante de 6 h
- b) *M. lysodeikticus* 4698. Carril 2. MPM. 5. Proteína (0.06 mg) de Sobrenadante de 6 h.

3.6.1.2 Zimograma *in situ* con proteína de sobrenadante de cultivo de fase tardía logarítmica de *P. acidilactici* ATCC 8042

En el gel copolimerizado con células de *L. monocytogenes* ATCC 15313 (Figura 23 a) se demostró la actividad lítica del sobrenadante de 8 h de cultivo, obteniendo una banda de aproximadamente 24 ± 0.02 y otra de 22 ± 0.02 kDa, las cuales son visibles también en el gel con el microorganismo utilizado como control (Figura 23 b).

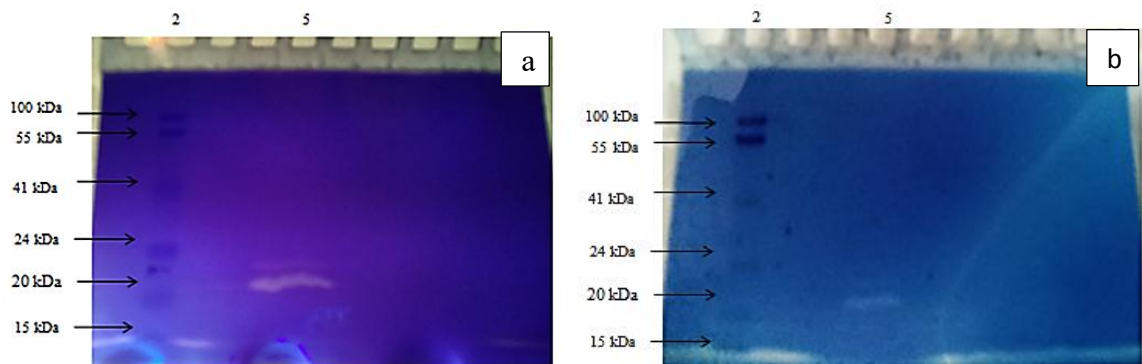


Figura 23. Gel SDS PAGE copolimerizado y proteína de sobrenadante de cultivo de 8 h. SDS-PAGE al 12% copolimerizados

a) células liofilizadas de *L. monocytogenes* ATCC 15313 y

b) *M. lysodeikticus* 4698. Carril 2. MPM (Prestained Low Range SDS/PAGE, Bio-Rad).

Carril 5. Proteína precipitada (0.06 mg) del Sobrenadante de cultivo de 8 h.

Las figuras 22 y 23 muestran que los sobrenadantes de *P. acidilactici* ATCC 8042 generan lisis en células de *M. lysodeikticus* y *L. monocytogenes*, evidenciando la presencia de actividad PGH en estos; las bandas de lisis se observan a 75 kDa sólo en sobrenadantes de 6 h y otra entre 22 y 23 kDa, así como un bandeo poco definido entre 24 y 25 kDa en sobrenadantes de 8 horas.

Aunque Llorente (2008) y Munguía-Villavicencio (2015) demostraron patrones de actividad PGH extracelular de *P. acidilactici* ATCC 8042, no habían evidenciado zona de lisis de 20 kDa para la fase logarítmica, sin embargo, Munguía-Villavicencio (2015) demostró bandas líticas de aproximadamente 20 y 17 kDa, en zimografía copolimerizada con *P. aeruginosa*

ATCC 9027 con los sobrenadantes de fase estacionaria, así como el bandeo poco definido que explica por la presencia de algunas otras bandas en los perfiles electroforéticos.

Como se mencionó, la actividad inhibitoria de los sobrenadantes de *P. acidilactici* ATCC 8042 contra algunas bacterias Gram positivas (Llorente, 2008), como *L. monocytogenes*, es atribuida a la presencia de una PGH debido a su efecto lítico en la pared celular de estas bacterias.

DISCUSIÓN

Actualmente, los consumidores se muestran interesados y preocupados por la relación entre la alimentación y la salud. La demanda de un uso reducido de aditivos y de procesamiento parece contradictoria para un mercado que pide alimentos más seguros y de buen sabor. Estas demandas ponen a la industria alimentaria bajo presión para buscar soluciones innovadoras. Las novedades sobre el metabolismo de bacterias lácticas ofrecen perspectivas para su aplicación funcional importante desde el punto de vista industrial, contribuyendo principalmente a la seguridad microbiana y con la oferta de ventajas sensoriales, tecnológicas, nutricionales o sanitarias (Castellano *et al.*, 2008).

En este trabajo se ofrecen evidencias de que la cepa de colección *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 presenta actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, mediante pruebas cuantitativas (curva de inhibición o muerte) y zimografía *in situ*.

En las pruebas de difusión en agar al utilizar sobrenadantes de fase media logarítmica y fase tardía logarítmica de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 como microorganismo indicador, no fue posible obtener un halo de inhibición, aunque este haya sido estandarizado para las diversas pruebas de actividad antimicrobiana realizadas (como se describe previamente en la preparación del microorganismo de prueba), sin embargo, Llorente (2008) reportó un halo de inhibición de los sobrenadantes frente a *L. innocua* ATCC 33099 de 42 mm y Martínez-Trejo (2011), un halo de aproximadamente 28 mm frente a *L. monocytogenes* ATCC 15313, esto se podría explicar de acuerdo a Bhunia, (1991) quien menciona que aún en cepas de un mismo género la sensibilidad frente a sustancias de actividad inhibitoria suele ser diferente. Además de la posibilidad de una menor producción de proteínas en los sobrenadantes debido a la fecha en que fue recibida la cepa de BL, y esto se podría corroborar con Martínez-Trejo (2011) quien reporta una concentración de proteína de 0.246 mg/ 160 µL de sobrenadante de fase media logarítmica y Munguía-Villavicencio (2015), de 2.63 y 3.24 mg/mL, mientras que en este trabajo se encontró una concentración mucho menor: 0.043 mg/mL y 0.045 mg /mL en fase media y

tardía logarítmica respectivamente. Por otro lado, se sabe que *L. monocytogenes* es capaz de desarrollar resistencia a bacteriocinas producidas por *P. acidilactici* (Milillo, 2013); además la inhibición también está dada por la temperatura según estudios donde la ausencia o incremento o decremento de la inhibición depende de la temperatura de incubación o almacenamiento, inhibiendo más a temperaturas de refrigeración (Jofré, 2008, Nieto, 2006), sin embargo las pruebas de difusión en agar se realizaron de acuerdo a la temperatura indicada para las pruebas de actividad antimicrobiana por NCCLS (2005).

Para la precipitación de las proteínas se ensayó la técnica de Wessel y Flügge (1984) con Metanol- cloroformo, sin embargo esta se tuvo que adaptar metodológicamente para mejorar el rendimiento de los precipitados, permitiendo utilizar menor volumen de reactivos y solo 400 μ L de la muestra de sobrenadante y de esta manera fue posible una mayor definición para los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes de cultivo. En los perfiles electroforéticos se demostró la ausencia de una proteína del sobrenadante de 6 h que sí está presente en el sobrenadante de 8 h, esto corresponde a Munguía-Villavicencio (2015) que reporta diferentes proteínas producidas en las distintas fases, incrementando el número de bandas conforme cambia la etapa de cultivo, así mismo fue posible corroborar que la concentración y la cantidad de proteínas producidas por los sobrenadantes obtenidos en este trabajo, fue menor a la reportada por Munguía-Villavicencio (2015), lo que podría explicar la ausencia de halo de inhibición en las pruebas de difusión en agar.

Al realizar las pruebas tanto de difusión en agar como de dilución en caldo, se consideraron diversos aspectos al trabajar con la cepa de bacteria láctica, para descartar que el efecto inhibitorio esté dado por la producción de ácido láctico y corroborar que no es la única fuente de actividad antilisterial de *P. acidilactici* ATCC 8042, los sobrenadantes se ajustaron pH 7 ± 0.02 , (Milillo 2013), así como también se tituló el ácido láctico de los sobrenadantes y para las pruebas de actividad antimicrobiana se utilizó como control positivo una solución de ácido láctico al 0.57%. Al adicionar esta solución en las pruebas de difusión y de dilución se observa un efecto de inhibición, una función bactericida desde la hora 0 de incubación, reportándose un halo de inhibición de 15 mm al adicionar 200 μ L y no crecimiento a la

determinación de UFC/ml. Este efecto bactericida encontrado coincide con el reportado por Pellicer (2009) sobre *Listeria* spp., donde se explica la capacidad de inhibición o muerte por la naturaleza lipolítica de los ácidos orgánicos, y a su toxicidad relacionada con la permeabilidad de la membrana bacteriana y la acidificación del contenido celular (Pellicer, 2009). Al comparar el resultado bactericida obtenido del control positivo con el obtenido al adicionar sobrenadantes (no inhibitorio), nos indica que el efecto antagónico de los sobrenadantes no está dado por la producción de ácido láctico.

Como el NCCLS (2005) indica, se deben realizar pruebas complementarias a la de difusión en agar para determinar la CIM, por lo que se realizaron pruebas de dilución en caldo. En todos los casos, es decir, tras enfrentarlos a las diferentes concentraciones de proteína (1, 4, 6 y 7 mL de sobrenadantes 10X), se demostró un efecto similar al que reporta Martínez-Trejo (2011) para *L. monocytogenes* y al de Llorente (2008) para *L. innocua*, es decir, se demostró una inhibición de las células viables UFC/mL. A las 24 h de incubación se observa que conforme se aumenta el volumen de sobrenadante adicionado, aumenta el efecto inhibitorio.

La reducción en la concentración de células de *L. monocytogenes* ATCC 15313 podría deberse a la generación tanto de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y otras enzimas proteolíticas, explica Blanco (2016), quien encuentra una inhibición de *L. monocytogenes* en co-cultivo con *Lactobacillus sakei* (BL). Otro comportamiento similar reportado por Martínez-Trejo (2011) fue el del control negativo (MRS m) donde no se observa inhibición en el crecimiento de *L. monocytogenes*. Con esto y con el ajuste de pH de los sobrenadantes, podemos decir que el medio MRS m no tiene el mismo efecto retardador que los sobrenadantes de *P. acidilactici* ATCC 8042 sobre *L. monocytogenes* ATCC 15313 y que dicho efecto se debe a las proteínas producidas por éste, sin embargo no se puede presumir un efecto de muerte celular, también podemos decir que el efecto no está dado por el ácido láctico producido por los sobrenadantes.

De los resultados presentados en la cinética de inhibición, se estableció la Concentración Mínima Inhibitoria para esta investigación, y la concentración más baja de sobrenadante de

P. acidilactici ATCC 8042 que previno el crecimiento de *L. monocytogenes* ATCC 15313 después de 24 h de incubación fue de 0.043 mg/ml y 0.045 mg/ml de proteína (correspondientes a 1 mL de sobrenadante de fase media y fase tardía logarítmica, respectivamente).

El nivel de supresión de crecimiento no llegó a la Concentración Mínima Bactericida, pues se requería alcanzar el 99.9% de inhibición. La mayor reducción del crecimiento de *L. monocytogenes* ATCC 15313 fue de 5 log, dato similar al reportado por Milillo (2013), quien compara la capacidad de inhibición de *P. acidilactici* con la de otras bacterias lácticas sobre *L. monocytogenes*, encontrando que esta BL inhibe más que otras, 4.5 log en 24 h.

Para corroborar que el efecto inhibitorio de los sobrenadantes está dado por una producción de proteínas se realizaron zimogramas de actividad *in situ* copolimerizados, probando que las proteínas producidas por el sobrenadante de cultivo de fases media y tardía logarítmica poseen efecto lítico sobre *L. monocytogenes* ATCC 15313 y *M. lysodeikticus* ATCC 9648.

En los geles SDS-PAGE (12%), se observan las bandas de lisis provocadas por los sobrenadantes de ambas fases de cultivo sobre ambos sustratos, sin embargo difieren en peso molecular dependiendo de la fase de obtención del sobrenadante.

Al calcular la masa molecular relativa, se pudo definir que las zonas de lisis corresponden a bandas proteicas de aproximadamente 75 y 20 kDa, así como también fue posible evidenciar un bandeo secundario de aproximadamente 25 kDa, este hallazgo concuerda con lo reportado por Munguía- Villavicencio (2015), quien explica que el bandeo secundario pudiera deberse a la presencia de alguna otra banda en los mismos perfiles electroforéticos. Aunque esto podría deberse a la técnica de precipitación de proteína, ya que el método de metanol-cloroformo, utilizado en esta investigación, está indicado para precipitar proteínas de medios líquidos en presencia de lípidos y detergentes (Wessel y Flüggé, 1984), lo que podría explicar por qué se observaron mejores resultados con esta forma a diferencia de la de ácido tricloroacético que utilizó Llorente (2008) (Jiang, 2004).

En esta línea de investigación ya se ha demostrado actividad de PGH en las proteínas de los sobrenadantes de *P. acidilactici* ATCC 8042, aunque no utilizando como sustrato *L. monocytogenes* ATCC 15313, sin embargo, la banda de 20 kDa también es reportada por Munguía- Villavicencio 2015), encontrándola solo en los sobrenadantes de fase estacionaria. De igual manera Llorente (2008) reporta una banda de PGH de aproximadamente 100 kDa, frente a *M. lysodeikticus*, la que podría compararse o corresponder a la encontrada en este trabajo, de 75 kDa al calcular la movilidad relativa. Este resultado, es decir, la diferencia de peso molecular, pudiera deberse a que la movilidad relativa de la proteína está dada por el tipo sustrato y el porcentaje de poliacrilamida en el gel copolimerizado, es decir se reduce o aumenta su migración, lo que corresponde a lo publicado por Hummel (1996) quien menciona que la adición de gelatina al gel SDS-PAGE parece reducir la migración de la proteína en un 15-20%, que se puede comparar con el retraso de la proteína estándar, sugiriendo que el peso molecular de las proteasas no pudo ser estimado con precisión. En este sentido, las zonas líticas de 100 kDa reportada por Llorente (2008) y la de 75 kDa, reportada en este trabajo, podrían estar dadas por la misma proteína, sin embargo al estudiarse en diferentes concentraciones del sustrato en el gel copolimerizado, 0.2% (Llorente, 2008) y 0.02% de *M. lysodeikticus* y *L. monocytogenes* (en el presente trabajo) podría verse afectada la movilidad relativa.

Bajo el concepto y mecanismo de acción de las bacteriocinas de acuerdo a Cotter (2005), el antecedente de que Mora (2003) refiere a la cepa de *P. acidilactici* ATCC 8042 como no pediocinogénica y Llorente (2008) demostró la ausencia de gen *pedB* que codifica para las pediocinas, se puede determinar que la actividad lítica presente demuestra un efecto inhibitorio por parte de las PGH producidas en los sobrenadantes de *P. acidilactici* ATCC 8042.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se evaluaron los sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 en medio MRS m, en la fase logarítmica de crecimiento, en términos de concentración de proteínas, pruebas de actividad inhibitoria *in vitro*, perfil electroforético y zimogramas de actividad para identificar el efecto inhibitorio frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, obteniéndose las siguientes conclusiones:

1. Se logró la identificación de ambas cepas de trabajo, *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 mediante técnicas microbiológicas y moleculares.
2. El sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 tuvo actividad antagonista contra *L. monocytogenes* mediante pruebas cuantitativas de dilución en caldo
3. La técnica de dilución en caldo permitió determinar que la Concentración Mínima Inhibitoria de los sobrenadantes de 6 horas fue de 0.043 mg y 8 horas de cultivo 0.045 mg sobre 3 log UFC/mL de *L. monocytogenes* ATCC 15313.
4. Se evidenció una inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* ATCC 15313 en la cinética de muerte en caldo a todos los volúmenes utilizados de los sobrenadantes, obteniendo una reducción de 1 log UFC/mL con 0.043 y 0.045mg/proteína de sobrenadante concentrado (10X) de 6 y 8 horas, respectivamente, a las 24 horas de incubación y de 5 log UFC/mL adicionando 0.017, 0.258, 0.301 mg/proteína de 6 horas y 0.18, 0.27 y 0.31 mg/proteína de 8 horas. El control sin sobrenadante alcanzó 8 log UFC/mL.
5. La cuantificación de proteínas permitió determinar la diferencia de concentración entre la fases logarítmicas, media y tardía, lo que se evidenció en el perfil electroforético de la fase media logarítmica media, respecto de la tardía, con una

banda de alrededor de 33 kDa, ausente en el perfil del sobrenadante de 6 horas de cultivo (fase media logarítmica).

6. En las zimografías *in situ* sobre *L. monocytogenes* ATCC 15313 y sobre *M. lysodeikticus* ATCC 4698 fue posible demostrar actividad de PGH en los sobrenadantes de *P. acidilactici* en su fase logarítmica de crecimiento. Las bandas líticas encontradas fueron de 75 kDa en la fase media y entre 22 y 23 kDa en la media y tardía así como bandas líticas poco definidas de aproximadamente de 24 y 25 kDa.

Los resultados obtenidos en esta investigación, demostraron que los sobrenadantes concentrados (10X) de cultivo de fase media y tardía logarítmica de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 reduciendo el número de células viables en pruebas de actividad antimicrobiana. También se demostró el efecto lítico que poseen los sobrenadantes de la cepa ATCC 8042 sobre *L. monocytogenes* ATCC 15313 y *M. lysodeikticus* ATCC 9648 mediante zimografía *in situ*.

De este modo, se acepta la hipótesis ya que se demostró la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de cultivo sobre el microorganismo indicador.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. 2008. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry. 3^a Ed, Guildford, pp. 21-54.
- ALZAMORA, S. M. 1997. Preservación. Alimentos conservados por factores combinados. Temas en tecnologías de alimentos. J.M. Aguilera (Ed). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología (CYTED).IPN. México. pp 45-48.
- ANANOU, S., MAQUEDA, M., MARTINEZ, B. M. y VALDIVIA. E. 2007. Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods. Communicating Current Research and Educational Trends in Applied Microbiology. A. Mendez- Vilas (Ed). pp. 475-486.
- ATCC. American Type Culture Collection. 2015. Disponible en: <https://www.atcc.org/>
- AYMERICH, T., PICOUET, A. and MONFORT, J.M. 2008. Decontamination technologies for meat products. Meat Science. 78, 114-129.
- AXELSSON, L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology, en Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. S.Salminen, y A. Von Wright (Eds). New York: Marcel Dekker. pp 1-72
- BARRY, A.L. 1986. Procedure for testing antimicrobial agents in agar media: theoretical considerations. Antibiotics in laboratory medicine. 2^a ed .V. Lorian (Ed.) Williams & Wilkins. pp 1-7
- BHUNIA, A. K., JOHNSON, M. C. RAY, B. y KALCHAYANDID. 1991. Mode action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strain. Journal of Applied Microbiology. 70, 25-33
- BLANCO, L. C. M., SOTELO, D. I. y LLORENTE, B. A. 2016. In vitro Modelling of simultaneous interactions of *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus sakei*, and *Staphylococcus carnosus*. Food science and Biotechnology. 25: 341-348

- BOTINA, A. B., ZIMMERMAN, B. y VENEGAS, M. 2008. Caracterización preliminar de compuestos antilisteriales producidos por bacterias ácido lácticas nativas. Revista MVZ Córdoba. 13, 1476-1485.
- BRADFORD, M.N. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. Analytical biochemistry. 72, 248-254.
- BUBERT, A., HEIN, I., RAUCH, M., LEHNER, A., BYOUNG-SU, Y., WERNER, G., y WAGNER, M. 1999. Detection and Differentiation of *Listeria spp.* By a single reaction based on Multiplex PCR. Applied and Environmental Microbiology. 65, 6488-4692.
- BURBANO, E., SIERRA, S., TORRES, K., MECARDO, M., CARRASCAL, A. y POUTOU, R. 2006. A rapid DNA extraction and PCR validation for direct of *Listeria monocytogenes* in raw milk. MVZ Córdoba. 11, 715-724
- CABALLERO, G. N., ABRIOUEL, H., ENNAHAR, S. y GÁLVEZ, A. 2013. Comparative proteomic analysis of *Listeria monocytogenes* exposed to enterocin AS-48 in planktonic and sessile states. International Journal of Food Microbiology. 167, 202-207
- CALLEWAERT, L., WALMAGH, M., MIHIELS, C. W. y LAVIGNE, R. 2011. Food applications of bacterial cell wall hydrolases. Current opinion in Biotechnology. 22, 164-171.
- CASTELLANO, P., BELFIORE, C. y VIGNOLO, G. 2008. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. Meat Science. 79, 483-499
- CAPLICE, E. y FITZGERALD, G.F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology. 50, 131-149.
- CARPENTIER, B., CERF, O. 2011. Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment. International Journal of Food Microbiology. 145, 1-8

- CARR, F.J., CHILL, D. y MAIDA, N. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28, 281-370.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, CDC. 2009. Centro Nacional de enfermedades zoonóticas, transmitidas por vectores, y Enfermedades entéricas. Infecciones transmitidas por los alimentos.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, CDC. 2009. Biosafety in Microbial and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th edition. Section VIII. Bacterial Agents. pp 143-144.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2013. Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted commonly through Food- Foodborne Diseases active Surveillance Network
- CHEROUTRE, M., LEBERT, I., HEBRAUD, J. LABADIE, J. y LEBERT, A. 1988. Effects of pH or Aw stress on growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 42: 71-77
- CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, NCCLS, 2005. Manual of antimicrobial susceptibility testing. National Committee on Clinical Laboratory Standards. USA: American Society of Microbiology.
- CLSI, 2012. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard. 11^a ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. USA.
- Codex Alimentarius*. FAO/OMS. 2009 Principios generales de higiene de los alimentos. CAC/ RCP 1- 1969. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/012/a1552s/a1552s00.pdf>.
- Codex Alimentarius*, FAO/OMS. 2004. Documento de debate sobre el perfil de riesgos para *Escherichia coli* enterohemorrágica, incluida la identificación de los productos básicos de interés, entre ellos las semillas germinadas y la carne molida de res y puerco. Roma. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/CCFH/CCFH36/fh0410bs.pdf>

- COTTER, P. D., HILL, C. y ROSS, R. P. 2005. Bacteriocins developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 3, 777-786
- DUSSAULT, D., DANG VU, K. y LACROIX, M. 2015. Development of a model describing the inhibitory effect of selected preservatives on the growth of *Listeria monocytogenes* in a meat model system. *Food Microbiology*. 53,115-121
- DAVIDSON, P.M. and PARISH, M.E. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology*. 42, 148-155
- DEVLIEGHERE, F., VERMEIREN, L. y DEBEVERE, J. 2004. New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*. 14, 273-285.
- DOS SANTOS EDUARDO, A. J. 2007. Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos. Tesis en Doctorado. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.
- ESCOBAR, H. A, MARQUEZ, C. J., RESTREPO, F. C., PEREZ, C. L. J. 2014. Aplicación de tecnología de barreras para la conservación de mezclas de vegetales mínimamente procesados. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 67, 7237- 7245
- FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. 2014. Food Safety Action Plan: Reducing the Risk of *Listeria monocytogenes*. EUA
- FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION 1998. FDA. Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. Food and Drug Administration. EUA
- GAHAN, C.G.M. y HILL, C. 2005. Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Applied Microbiology*. 98, 1345-1353.
- GÁLVEZ, A., ABRIOUEL, H., BENOMAR, N. y LUCAS, R. 2010. Microbial antagonists of food-borne pathogens and biocontrol. *Current opinion in Biotechnology*. 21, 142-148
- GARCÍA, A. H. y VÁZQUEZ, D. R. 1988. Cuantificación de proteínas: una revisión. Instituto de Biotecnología (IBT) UNAM. México. 3, 77-88

- GIALAMAS, H., ZINOVIADOU, K. G., BILIADERIS, C.G. y KOUTSOUMANIS, K.P. 2010. Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International*. 43(10), 2402-2408.
- GRAM, L., RAVN, L., Rasch, M., BRUHN, J., CHRISTENSEN, A., y GIVSKOV, M. 2002. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 78, 79-97.
- HERNÁNDEZ, L. A. N., BAUTISTA, B. S., VELAZQUEZ, DV. M. G. y HERNÁNDEZ, R. A. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades post cosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fisiopatología*. 25: 66-74
- HOLZAPFEL, W.H., GEISEN, R. y SCHILLINGER, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*. 24, 343-362.
- HOLZAPFEL, W.H., HABERER, O., GEISEN, R., BJÖRKROTH, J. y SCHILLINGER, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73, 365-373.
- HOLZAPFEL, W.H., FRANZ, C. M., LUDWING, W., BACK, W. y DICKS, L. M. 2006. The Genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*. *The Prokaryotes*. 4, 229-266
- HOOVER, 1993. Bacteriocins with potential for use in foods, en Davidson, P. M. and Larry, B.A. (Eds) *Antimicrobial in foods*. 1ª ed. Marcel Dekker Inc. N.Y.
- HUGAS, M. 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation meat and meat products. *Meat Science*. 49, 139-150.
- HUMMEL, K. M., PENHEITER, A. R., GATHMAN, A. C. y LILLY, W. W. 1996. Anomalous estimation of protease molecular weights using gelatin-containing SDS-PAGE. *Analytical biochemistry*. 233, 140-142
- JANISIEWICZ, W., y KORSTEN, L. 2002. Biological control of Postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*. 40, 411-441

- JIANG, L., HE, L. y FOUNTOULAKIS, M. 2004. Comparison of protein methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Journal of Chromatography*. 1023, 317-320
- JOFRÉ, A., GARRIGA, M. y AYMERICH, T. 2008. Inhibition of *Salmonella sp.* *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cooked ham by combining antimicrobials, high hydrostatic pressure and refrigeration. *Meat science*. 78, 53-59.
- KAPETANAKOS, A. E., KARYOTIS, D. and SKANDAMIS, P. N. 2016. Control of *Listeria monocytogenes* by applying ethanol-based antimicrobial edible films on ham slices and microwave-reheated frankfurters. *Food Microbiology*. 54, 80-90.
- KUMARI, G. A., KUMARIYA, R., KUMAR, A., LATHER, P., KAPILA, S y SOOD, S. K. 2014. Industrial cheese whey utilization for enhanced production of purified pediocin PA-1. *Food Science Technology*. 59, 656-665.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685
- LECLERC, D. y ASSELIN, A. 1989. Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Canadian Journal of Microbiology*. 35, 749-753.
- LEISTNER, L. 1992. Food preservation by combined methods. *Food Research International*. 25, 151-158.
- LEISTNER, L. 1995. Stable and safe fermented sausages world- wide. Campbell- Platt, G. y Cook, P.E. *Fermented Meats*. Blackie academic and professional (Eds). U.K. pp 160-175.
- LEITE, J. A., TULINI, F. L., REIS-TEIXEIRA, F. B., RABINOVITCH, L., CHAVES, J. Q., GONSALES, R. N., CABRAL, H. y PEREIRA, E. C. 2016. Bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bacillus cereus*: Preliminary characterization and application of partially purified extract containing BLIS for inhibiting *Listeria monocytogenes* in pineapple pulp. *Food Science and Technology*. 72, 261-266

- LEROI, F., CORNET, J., CHEVALIER, F., CARDINAL. M., COEURET, G., CHAILLOU. S, and JOFFRAUD, J.J. 2015. Selection of bioprotective cultures for preventing cold-smoked salmon spoilage. *International Journal of Food Microbiology*. 213, 79-87.
- LEWIS, C.B. y MONTVILLE. 1991. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal Microbiological Methods*.13, 145-150.
- LLORENTE BOUSQUETS, A. 1998. Evaluación de la producción de bacteriocinas de *Pediococcus acidilactici* bajo diferentes condiciones de cultivo. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.
- LLORENTE, B.A., PÉREZ, M. S. y FARRÉS, A. 2008. Novel extracellular proteolytic activity in *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Canadian Journal of Microbiology*. 54, 694-699.
- LLORENTE BOUSQUETS, A. 2008. Caracterización de la actividad bacteriana de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México
- LOMONTE, V. B. 2009. Capítulo 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida. Técnicas de laboratorio en Inmunología clínica. (3ª Ed) Universidad de Costa Rica. pp 92-94
- LORTAL, S., VALENCE, F., BIZET, C., & MAUBOIS, J. L. 1997. Electrophoretic pattern of peptidoglycan hydrolases, a new tool for bacterial species identification: application to 10 Lactobacillus species. *Research in Microbiology*, 148, 461-474
- MAGNUSSON, J. 2003. Antifungal activity of lactic acid bacteria. Doctor's dissertation. pp. 8-20
- MANZANO, M., COCOLIN, L., FERRONI, P., CANTONI, C. and COMI, G. 1997. A simple and fast PCR Protocol to detect *Listeria monocytogenes* from meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 74, 25.30.
- MANZANO, M., COCOLIN, L., ASTORI, G., CANTONI, C. and COMI, G. 1998. A rapid method for the identification and partial serotyping of *Listeria monocytogenes* in food

- by PCR and restriction enzyme analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 42, 207-212.
- MARTÍN, B., PERICH, A., GÓMEZ, D., YANGÜELA, J., RODRÍGUEZ, A., CARRIGA, M. y AYMERICH, T. 2014. Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants. *Food Microbiology*. 44, 119-127.
- MARTINEZ TREJO, M. C. 2011. Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana del sobrenadante de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis en Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.
- MARAGKOUidakis, P.A., MOUNTZOURIS, K.C., PSYRRAS, D., CREMONESE, S., FISCHER, J., CANTOR, M.D. y TSAKALIDOU, E. 2009. Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*. 130, 219-226.
- MESSENS, W. y DE VUYST, L. 2002. Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*. 72, 31-43.
- MILILLO, R. S., STORY, R. S., PAK, D., O'BRYAN, C. A., GRANDALL, P. G. y RICKE, S. 2013. Antimicrobial properties of three lactic acid bacterial cultures and their cell free supernatants against *Listeria monocytogenes*. *Journal of environmental science and health*. 48, 63-68.
- MILLER, K.W., RAY, P., STEINMETZ, T., HANEKAMP, T. y RAY, B. 2005. Gene organization and sequences of pediocin AcH/PA-1 production operons in *Pediococcus* and *Lactobacillus* plasmids. *Letters in Applied Microbiology*. 40, 56-62.
- MORA, D., FORTINA, M.G., PARINI, C. and MANACHINI, P.L. 1997. Identification of *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* based on 16S rRNA and *ldhD* gen- targeted multiplex PCR analysis. *FEMS Microbiology Letters*. 151, 231-236.

- MORA, D. MUSACCHIO, F., FORTINA, M.G., SENINI, L. and MANACHINI, P.L. 2003. Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. *Journal of Applied of Mircobiology*. 94, 561-570
- MUNGUÍA VILLAVICENCIO, P.M. 2015. Evaluación de la actividad antagónica de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en la expresión de algunos factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.
- MUÑOZ, A. I., VARGAS, M., OTERO, L., DÍAZ, G., y GUZMÁN, V. 2011. Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, DC, 2002-2008. *Biomédica*, 31(3), 428-439.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>
- NIETO, L. J. C., REGUERA, U. J. I., PELÁEZ, M. M. C. y DE LA TORRE, A. H. 2006. Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* on Spanis raw meat. *Meat science*. 72, 57-61.
- NMX-F-102-NORMEX-2010. Alimentos-determinación de acidez titulable en alimentos- método de ensayo (prueba) Foods-determination acidity titrable-test method (Esta norma cancela la NMX-F-102-S-1978)
- NOM-155-SCFI-2003. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado- Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
- NUCERA, D., LOMONACO, S., BIANCHI, D.M., DECASTELLI, L., GRASSI, M.A., BOTTERO, M.T. y CIVERA, T. 2010. A five year surveillance report on PFGE types of *Listeria monocytogenes* isolated in Italy from food and food related enviroments. *International Journal of Food Microbiology*. 140, 271-276.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN, FAO. 2000. Alimentos Para las ciudades. Alimentos frescos. Roma.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN, FAO. 2000. Identificación de peligros, caracterización de peligros, y evaluación de exposición de *Campylobacter spp.* en pollos para asar. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/008/ae521s/ae521s06.htm>

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN, FAO. 2002. Sistemas de calidad e inocuidad de los alimentos. Manual de capacitación sobre higiene de los alimentos y sobre el sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC). Dirección de Alimentación y Nutrición. Roma.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN, FAO. 2009. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Roma.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN, ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, FAO /OMS. 1997. Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición. Capítulo 6. Evolución del consumo de alimentos en América Latina. Chile.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN, ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, FAO /OMS. 1998. Requisitos generales (Higiene de los alimentos, suplemento al volumen 1b. Ámbito de aplicación, utilización y definiciones).

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, FAO/OMS. 2004. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el

consumo: resumen interpretativo. Capítulo 4. Serie de evaluación de riesgos microbiológicos No. 4.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN, FAO/OMS. 2003 .Garantía de la Inocuidad y Calidad de los alimentos: Directrices para el fortalecimiento de los sistemas nacionales de control de los alimentos. Anexo 3. Consideraciones sobre la inocuidad de los alimentos y la protección del consumidor.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS. 1995. Fermentation: assessment and research. Report of a joint FAO/who Workshop on fermentation as a household technology to improve food safety.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS. 2007. Debate sobre la seguridad sanitaria internacional con ocasión del Día Mundial de la Salud. CHAN, M.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS. 2015. Inocuidad de los alimentos. El mundo en evolución y la inocuidad de los alimentos. Nota descriptiva N°399.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD; ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, OMS/PAHO. 2015. Alimentos y bebidas ultraprocesados en América Latina: tendencias, efecto sobre la obesidad e implicaciones para las políticas públicas. Departamento de Enfermedades no Transmisibles y Salud Mental.

PARISH, M. y DAVIDSON, P. 1993. Chap 17 Methods for evaluation. Antimicrobial in Foods. 1ª ed. Ed. Davison, P.M. and Larry, B.A. Marcel Dekker Inc.

PELLICER, K., DEL HOYO, G., BROCARD, M. S., ALIVERTI, V., ALIVERTI, F. y COPEL, J. 2009. Efecto del ácido clorhídrico y ácido láctico sobre el desarrollo de treinta cepas de *Listeria spp.* aisladas de alimentos. Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias. 50, 19-22

PIDDOCK, L. 1990. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance of sensitivity in bacteria. Journal of Applied Bacteriology. 68, 307-318.

- RAJASHEKARA, G., HAVERLY, E., HALVORSON, D.A., FERRIS, K.E. y NAGARAJA, K.V. 2000. Multidrog-resistant Salmonella Typhimurium DT104 in poultry. Journal Food Protection, 63,155-161.
- RIVERA QUIROZ, J. 2005. Evaluación del efecto de bioconservación en salamis al adicionas *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 como cultivo iniciador. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.
- RODRIGUEZ, C. E., RODRIGUEZ, C., DEL MAR, G.M. y ARIAS, M.L. 2010. Evaluación microbiológica de alimentos listos para consumo procesados por pequeñas industrias costarricenses. Archivos latinoamericanos de nutrición. 60, 2-5
- RODRIGUEZ, S.E.N., 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Ra Ximhai. Universidad Autónoma Indígena de México. México. 7, 153-170
- ROSS, R.P., MORGAN, S. and HILL, C. 2002. Preservation and fermentation past, present and future. International Journal of Food Microbiology. 79, 3-16
- SHOCKMAN, G.D. and HOLTJE, J.V. 1994. Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases. New comprehensive biochemistry. 27, 131-166
- 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. pp 26-40.
- SIM, J.; HOOD, D.; FINNIE, L.; WILSON, M.; GRAHAM, C.; BRETT, C.; HUDSON, J. 2002. Series of incidents of *Listeria monocytogenes* non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats. Letters in Applied Microbiology. 35, 409-413.
- SUGAI, M., KOMATSUZAWA, H. TOMITA, S., AKIYAMA, T., MIYAKE, Y. and SUGINAKA, H. 1991. Detection of a staphylococcal endo-3-Nacetylglucosaminidase using polyacrylamide gels. Journal Microbiological Methods. 13, 11-16.

- STEEN, A. 2005. Functional characterization and cell wall interactions of peptidoglycan. *Journal of Bacteriology*.187, 114-124.
- TOMPKIN, R.B. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in food-processing environments. *Journal of Food Protection*.69, 93-105.
- VÄLIMAA, A.L., TIMISJÄRVI, A.T. y VIRTANEN, E. 2015. Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain. *Food control*. 55,103-114
- WESSEL, D., y FLÜGGE, U.I. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical biochemistry*. 138, 1141-1443
- WILSON, B. A. y SALYERS, A. A. 2011. Bacterial Pathogenesis. A molecular Approach. *Listeria monocytogenes*. 2^a ed. pp. 183-189. Obtenido de www.cabi.org
- WINKELSTRÖTER, L.K., TULINI, F.L. y DE MARTINIS, E.C.P. 2015. Identification of the bacteriocin produced by cheese isolate *Lactobacillus paraplantarum* FT259 and its potential influence on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Food Technology*. 64, 586-592
- YANG, X., HUANG, J., WU, Q., ZHANG, J., LIU, S., GUO, W., CAI, S. and YU, S. 2016. Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of Salmonella isolated from retail ready-to-eat foods in China. *Food control*. 60, 50-56.
- ZHANG, D. L., ROSS, T., BOWMAN, J. P. 2010. Physiological aspects of *Listeria monocytogenes* during inactivation accelerated by mild temperatures and otherwise non-growth permissive acidic and hyperosmotic conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 141, 177-185.
- ZHOU, G. H., XU, X.L. y LIU, Y. 2010. Preservation technologies for fresh meat- A review. *Meat Science*.86, 119-128.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de agua peptonada 0.1%

Para llevar a cabo las diluciones seriadas de muestras microbiológicas se utilizó agua peptonada al 0.1%, la cual se preparó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

En 1 L de agua destilada se disolvieron 1 g de peptona proteosa (Bioxon, BD) y 8.5 g de cloruro de sodio (NaCl) y se esterilizó la mezcla a 121° C durante 15 min, se probó la esterilidad a 30±2° C durante 24 h.

Anexo 2.

Cuadro 6. Micrométodo para la cuantificación de proteínas con el reactivo de Bradford

Tubo #	Azul de Coomassie (µL)	Agua destilada estéril (µL)	Stock BSA (µL)	µg/mL
0	200	800	0	0
1	200	650	150	1.875
2	200	600	200	2.5
3	200	500	300	3.75
4	200	400	400	5
5	200	300	500	6.25
6	200	200	600	7.5
7	200	100	700	8.75
8	200	0	800	10

Fuente: Adaptado de Bradford, 1976

Anexo 3. Preparación de soluciones para perfil electroforético de proteínas

Se prepararon las siguientes soluciones según las especificaciones del equipo MINI- Protean Tetra Cel® (BIO-RAD)

1. Acrilamida/Bis (30% T, 2.67 % C)

87.6 g acrilamida (29.2 g/ 100 mL)

2.4 g N'N-bis-metil-acrilamida (0.8 g/100 mL)

Aforar a 300 mL con agua destilada estéril. Filtrar y almacenar a 4°C en un frasco ámbar (30 días máximos)

2. 10% SDS (w/v)

Disolver 10 g en 90 mL de agua destilada con agitación suave y aforar a 100 mL con agua destilada estéril.

3. 1.5 M Tris- HCl, pH 8.8

27.23 g Tris base (18.15 g/100 mL)

80 mL de agua destilada estéril

Ajustar el pH a 8.8 con 6N HCl. Aforar a un volumen total a 150 mL con agua destilada estéril y almacenar a 4 °C.

4. 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

6 g Tris base

60 mL de agua destilada estéril

Ajustar el pH a 6.8 con 6N HCl. Aforar a un volumen total a 100 mL con agua destilada estéril y almacenar a 4°C

5. Solución de corrida 10X, pH 8.3

30.3 g Tris base

144.0 g Glicina

10.0 g SDS

Disolver y aforar a un volumen de 1000 mL con agua destilada estéril. No ajustar pH.

Almacenar a 4°C.

Uso: diluir 50 mL de 10X stock con 450 mL de agua destilada para corrida de electroforesis

6. 10% (w/v) APS

100 mg Persulfato de amonio

Disolver en 1 mL de agua destilada

Anexo 4. Preparación de la solución buffer fosfato (PBS) para un litro

27 g Cloruro de Sodio (NaCl)

0.2 g Cloruro de potasio (KCl)

1.15 g Fosfato disódico (Na_2HPO_4)

0.2 g Fosfato de potasio (KH_2PO_4)

1 L agua destilada estéril

Anexo 5. Curva patrón de Albúmina Sérica bovina para cuantificación de proteína

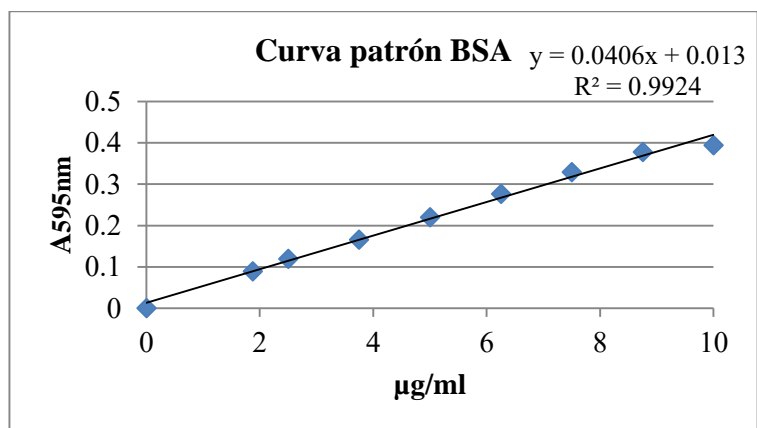


Figura 24. Curva patrón de Albúmina Sérica Bovina por el método de Bradford

Anexo 6. Determinación de Movilidad relativa de proteínas

La movilidad relativa es inversamente proporcional al logaritmo del PM. Trazando un gráfico con estándares de PM conocido, se obtiene una línea de referencia en la cual se puede interpolar muestras de PM desconocido. El Rf se calcula dividiendo la distancia (mm) recorrida por la banda en cuestión, entre la distancia recorrida por el MPM (Lomonte, 2009).

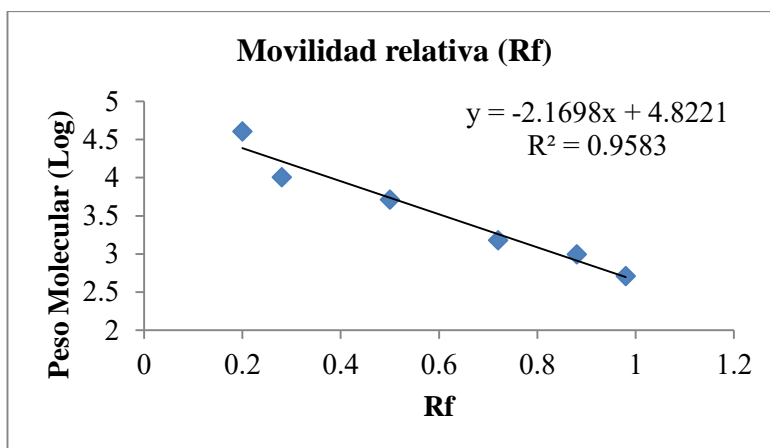


Figura 25. Curva para determinar la Masa molecular relativa por interpolación