



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**“Evaluación *in vitro* del potencial antagónico de *Ligilactobacillus murinus*
26B1 aislado de ratón frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p”**

TESIS

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

PRESENTA:

JORELY PALMA CLEMENTE

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. ADRIANA LLORENTE BOUSQUETS
(FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN)

MIEMBROS DEL CÓMITE TUTOR:

DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR
(FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN)

DRA. SILVINA GRACIELA FADDA AREDES
(CENTRO DE REFERENCIA PARA LACTOBACILOS-CONICET)

Cuautitlán, Estado de México, abril 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dedicatorias

A mis abuelitos **Guillermo Palma Beltrán** y **Juana Ozuna Hernández**, quienes me han amado, cuidado, educado e inculcado valores como el respeto, honestidad, gratitud y humildad, gracias por siempre estar para mí, los amo inmensamente.

A **Julián Palma Ozuna**, gracias por ser un gran papá, por tener un gran corazón, por todos los sacrificios hechos para que pudiera culminar mis estudios.

A **Isis Clemente Mendoza** mi madre, gracias por darme la vida y por todos los consejos de aliento.

A mis padrinos **Apolinar Rodríguez Mendoza** y **Fermina Palma Ozuna** por brindarme su apoyo incondicional, su cariño y paciencia.

A **Mariangel Alonso Palma** mi pequeño gran amor, por tus tiernas palabras y abrazos que me motivan a dar siempre lo mejor de mí.

A **Hugo Enrique Castillo Gómez**, gracias por cuidarme, protegerme, amarme, por tu confianza y lealtad.

A mis hermanos **Marivit Palma**, **Viviana Palma**, **Héctor Palma**, **Julián Palma**, **Jorge Palma** y **Dylan Palma**, gracias porque por el simple hecho de ser mis hermanos dan alegría a mi vida.

A toda mi **familia** por ser mi fortaleza en este viaje llamado vida.

Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por brindarme una vez más la oportunidad de crecer profesionalmente.

A la **Dra. Adriana Llorente Bousquets**, siempre le estaré eternamente agradecida por todo lo que ha hecho por mí, la admiro tanto. Gracias por su apoyo incondicional brindado durante mi crecimiento profesional, por abrirme las puertas y creer en mí. Gracias por todos los consejos de motivación, la quiero mucho.

Al **Dr. Carlos Gerardo García Tovar**, gracias por su apoyo profesional y por el tiempo invertido, consejos y guía que fueron de gran importancia para culminar esta etapa. Le expreso mi profunda admiración y respeto a su persona.

A la **Dra. Silvina Fadda Aredes**, le agradezco por aceptar ser parte de mi Comité Tutor a pesar de la distancia, gracias por todo el apoyo brindado durante la realización de este proyecto, por abrirme las puertas de su casa y de su familia durante mi estancia en San Miguel de Tucumán, Argentina.

A la **Dra. Isabel Gracia Mora**, a el **Dr. Enrique Jesús Delgado Suárez** y a el **Dr. Carlos Ignacio Soto Zaráte**, gracias por el tiempo invertido en la revisión, comentarios y aportaciones a mi tesis.

Al **M.C. Crisóforo Mercado Marquéz** le agradezco su apoyo en la obtención de las cepas lácticas, gracias por esa actitud que siempre crea un ambiente de trabajo armónico.

Al **Dr. Francisco Montiel Sosa**, sus clases de Bioquímica son las mejores, gracias por todas sus enseñanzas y consejos.

A la **Dra. Raquel López Arellano**, a la **Dra. Marcela Autrán Martínez**, a la **Dra. Gabriela Barcenas Morales** y al **M.C. Francisco Rodolfo González Díaz**, gracias por compartir conmigo sus conocimientos durante mi estancia en el posgrado, los cuales fueron de gran ayuda en la realización del presente proyecto.

A **Ivonne Sandoval Mosqueda** por todos los momentos que hemos pasado juntas durante la experimentación en el laboratorio y por motivarme a ser cada día mejor como persona y profesionista, eres una gran mujer amiga te admiro mucho y te quiero.

A mi amiga **Vanessa Salinas Biviano**, fue un privilegio haberte conocido amiga, gracias por todos los momentos bonitos que compartimos durante el posgrado, por tus consejos y apoyo.

A mis amigas **Anel Casas Sánchez**, **Leslie Guillen Mojica**, **Lorena Mendoza Luna**, **Grecia Paola de la O Abarca** gracias por su valiosa amistad, porque a pesar de la distancia siempre me han demostrado su amistad sincera, su cariño y lealtad...las quiero mucho.

Mis agradecimientos por el apoyo financiero para llevar a cabo el proyecto de investigación al:

Programa de **Posgrado de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la UNAM. 2019-1 al 2020-2.**

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de Maestría otorgada durante el semestre 2019-1 y hasta el 2020-2.

Proyecto “Evaluación *in vitro* del potencial antagónico de cepas de *Lactobacillus* aisladas de ratón”, **PAPIIT-DGAPA** con **clave IN230820**. Por la beca Maestría/Obtención de grado otorgada durante 8 meses.

Proyecto “Estudio de los eventos celulares y moleculares involucrados durante el desarrollo de procesos infecciosos en medicina veterinaria”, **FES Cuautitlán UNAM PIAPI 2050**.

Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por la beca de movilidad otorgada para la realización de la estancia de investigación (6 semanas) en el CERELA-CONICET, San Miguel de Tucumán, Argentina, 2019 y al **Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA) CONICET** por abrirme las puertas para realizarla.

El presente proyecto fue realizado en el Laboratorio 7 de Bioconservación, de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la FES-Cuautitlán Campo 4.

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la acción antagonica de la cepa de *Ligilactobacillus murinus* 26B1 aislada del tracto intestinal de ratón, mediante técnicas cualitativas, semicuantitativas y cuantitativas. Los resultados de la caracterización bioquímica de la cepa de *L. murinus* indicaron que fue capaz de fermentar glucosa, fructosa, manosa, sorbitol, maltosa, sacarosa y rafinosa, mientras que no fermentó glicerol, eritrol, dulcitol ni inositol (galerías API®50CH). Para evaluar su potencial antagonico se eligió utilizar *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p como microorganismo sensible y para identificar la actividad se construyeron las cinéticas de crecimiento de ambas cepas. Mediante la técnica cualitativa de *Spot on the lawn*, se obtuvieron halos de inhibición de *S. aureus* de hasta 9 mm sólo cuando se desafió con células viables de *L. murinus*. De este modo se caracterizaron los sobrenadantes de cultivo de las distintas fases de crecimiento de *L. murinus* en fase logarítmica temprana y tardía en su contenido de proteínas con el reactivo de Bradford (1.49 ± 0.010 a 2.19 ± 0.026 mg/mL, respectivamente). Al aplicar la técnica de difusión en agar se obtuvieron halos de inhibición de 12.23 ± 0.025 mm, con los sobrenadantes en fase logarítmica temprana y CIM de 0.186 mg/mL. En la logarítmica tardía, los halos fueron de 12.84 ± 0.037 mm y CIM de 0.199 mg/mL. Por otro lado, mediante cinéticas de inhibición en caldo, con los sobrenadantes en fase logarítmica temprana y tardía se obtuvieron CIM de 0.07 mg/mL y 0.08 mg/mL con reducciones de *S. aureus* de 2.49 y 3.31 log UFC/mL, respectivamente. Para evaluar el potencial lítico se realizaron zimogramas de actividad *in situ* en SDS-PAGE copolimerizados con células liofilizadas de *S. aureus* ATCC 6538p y como control, geles con *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 9648. En los geles copolimerizados con *S. aureus* se identificaron tres bandas de lisis, con masas moleculares relativas de 109 ± 0.86 , 92 ± 1.21 y 23 ± 2.14 kDa, y en los geles control con *M. lysodeikticus* se identificó una banda lítica de alrededor de 109 ± 1.72 kDa. Estos resultados fueron contrastados y corroborados con los perfiles electroforéticos obtenidos anteriormente mediante SDS-PAGE. Debido a la relación de patogenicidad de *S. aureus* ATCC 6538p con la producción de exopolisacáridos, se evaluó su capacidad de producir biopelículas en microplacas de poliestireno a diferentes temperaturas (4, 25 y 35°C), en donde fue débilmente productora de biopelículas a 4°C y fuerte productora a 25 y 35°C. En el caso de *L. murinus* esta cepa fue débilmente productora de biopelículas a 4 y 25°C y moderada a 35°C. Las conclusiones más sobresalientes de este trabajo demuestran que la cepa *L. murinus* 26B1 aislada del modelo murino, produce sustancias de naturaleza proteica en los sobrenadantes en fase logarítmica temprana y tardía, con acción antimicrobiana frente a *S. aureus* ATCC 6538. *S. aureus* (patógeno ubicuo y emergente) es capaz de producir biopelículas en condiciones adversas. De aquí la importancia de encontrar nuevas estrategias para el control de patógenos de interés sanitario como *S. aureus*, lo que coloca a *L. murinus* 26B1 aislado de tracto intestinal de ratón, como un candidato por su potencial antagonico, para su uso en nuevas estrategias de bioconservación.

Abstract

In the present paper, the antagonistic action of the *Ligilactobacillus murinus* 26B1 strain isolated from the mouse intestinal tract was evaluated using qualitative, semi-quantitative and quantitative techniques. The results of the biochemical characterization of the *L. murinus* strain indicated that it was capable of fermenting glucose, fructose, mannose, sorbitol, maltose, sucrose and raffinose, while it did not ferment glycerol, erythrole, dulcitol or inositol (API[®]50CH galleries). To evaluate its antagonistic potential, it was chosen to use *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p as a sensitive microorganism and to identify the activity, the growth kinetics of both strains were constructed. By means of the qualitative technique of *Spot on the lawn*, inhibition halos of *S. aureus* of up to 9 mm were obtained only when challenged with viable cells of *L. murinus*. In this way, the culture supernatants of the different growth phases of *L. murinus* in early and late logarithmic phase were characterized in their protein content with the Bradford reagent (1.49±0.010 to 2.19±0.026 mg/mL, respectively). When applying the agar diffusion technique, inhibition halos of 12.23±0.025 mm were obtained, with the supernatants in early logarithmic phase and MIC of 0.186 mg/mL. In the late logarithmic, the halos were 12.84±0.037 mm and MIC of 0.199 mg/mL. On the other hand, by means of inhibition kinetics in broth, with the supernatants in the early and late logarithmic phase, MIC of 0.07 mg/mL and 0.08 mg/mL were obtained with reductions of *S. aureus* of 2.49 and 3.31 log CFU/mL, respectively. To evaluate the lytic potential, *in situ* activity zymograms were performed on SDS-PAGE copolymerized with lyophilized cells of *S. aureus* ATCC 6538p and, as a control, gels with *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 9648. In the gels copolymerized with *S. aureus*, three bands of lysis, with relative molecular masses of 109±0.86, 92±1.21 and 23±2.14 kDa, and in the control gels with *M. lysodeikticus* a lytic band of around 109±1.72 kDa was identified. These results were contrasted and corroborated with the electrophoretic profiles previously obtained by SDS-PAGE. Due to the pathogenicity relationship of *S. aureus* ATCC 6538p with the production of exopolysaccharides, its ability to produce biofilms was evaluated in polystyrene microplates at different temperatures (4, 25 and 35°C), where it was weakly a producer of biofilms at 4°C and a strong producer at 25 and 35°C. In the case of *L. murinus*, this strain was a weak producer of biofilms at 4 and 25°C and moderately at 35°C. The most outstanding conclusions of this work showed that the *L. murinus* 26B1 strain isolated from the murine model, produces substances of a protein nature in the supernatants in early and late logarithmic phase, with antimicrobial action against *S. aureus* ATCC 6538. *S. aureus* (ubiquitous and emerging pathogen) is capable of producing biofilms in adverse conditions. Hence the importance of finding new strategies for the control of pathogens of sanitary interest such as *S. aureus*, which places *L. murinus* 26B1 isolated from the mouse intestinal tract, as a candidate for its antagonistic potential, for its use in new biopreservation strategies.

CONTENIDO

Resumen	4
Abstract.....	2
Índice de cuadros	5
Índice de figuras	7
Abreviaturas y símbolos	8
Introducción.....	9
CAPÍTULO 1: REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	12
1.1. Importancia sanitaria de <i>S. aureus</i>	13
1.1.1. Afecciones producidas de <i>S. aureus</i>	13
1.1.2. Epidemiología de <i>S. aureus</i>	14
1.1.3. Mecanismos de virulencia de <i>S. aureus</i>	15
1.1.3.1. Polisacáridos capsulares	16
1.1.3.2. Proteínas de unión a fibronectina	16
1.1.3.3. Proteínas de unión a fibrinógeno (<i>clumping factor</i>).....	16
1.1.3.4. Formación de biopelículas.....	18
1.1.3.4.1. Métodos para la detección y cuantificación de biopelículas	19
1.1.3.5. Multirresistencia a antibióticos.....	20
1.2. Antagonismo bacteriano.....	21
1.3. Bacterias ácido lácticas (BAL).....	21
1.3.1. Productos metabólicos de BAL	24
1.3.1.1. Ácidos orgánicos	24
1.3.1.1.1. Ácido láctico.....	24
1.3.1.1.2. Ácido acético y propiónico.....	25
1.3.1.2. Dióxido de carbono	25
1.3.1.3. Peróxido de hidrógeno.....	25
1.3.1.4. Reuterina.....	26
1.3.1.5. Diacetilo	26
1.3.1.6. Producción de exopolisacáridos	26
1.3.1.7. Bacteriocinas	27
1.3.1.7.1. Clasificación de bacteriocinas	28
1.3.1.7.2. Mecanismo de acción de las bacteriocinas.....	28
1.3.1.8. Enzimas bacterianas	30
1.4. BAL como estrategia de Bioconservación	32

1.5. Pruebas para la detección de actividad antibacteriana.....	32
1.5.1. Pruebas discriminativas de punto final.....	32
1.5.1.1. Difusión en agar	33
1.5.1.2. Método de dilución en agar	33
1.5.1.3. Método de dilución en caldo	33
1.5.2. Pruebas descriptivas	34
1.5.2.1. Pruebas turbidimétricas	34
1.5.2.2. Curvas de inhibición o muerte.....	34
1.6. Antecedentes de la línea de trabajo	35
1.6.1. Aislamiento de BAL del tracto intestinal de ratón	35
1.6.2. Caracterización molecular	36
OBJETIVOS.....	38
Objetivo General.....	38
Objetivos Particulares.....	38
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
2.1. Conservación de las cepas de <i>L. murinus</i> 26B1 y <i>S. aureus</i> ATCC 6538p.....	40
2.2. Perfil de fermentación de carbohidratos de <i>L. murinus</i> 26B1	41
2.3. Construcción de la cinética de crecimiento de <i>L. murinus</i> 26B1 y <i>S. aureus</i> ATCC 6538p.....	42
2.4. Obtención de los sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1	42
2.5. Ensayo de inhibición en placa de <i>L. murinus</i> 26B1 frente a <i>S. aureus</i> ATCC 6538p..	43
2.6. Caracterización de los sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1.....	44
2.6.1. Cuantificación de proteínas de los sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1 mediante el microensayo de Bradford.....	44
2.6.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de cultivo de <i>L. murinus</i> 26B1 concentrados 10X (por liofilización) mediante dilución en agar.....	44
2.6.3. Cinética de inhibición de <i>S. aureus</i> ATCC 6538p en caldo BHI con proteínas de sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1	45
2.6.4. Determinación del perfil electroforético de los sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1(10X) mediante SDS-PAGE.....	46
2.6.5. Actividad lítica de los sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1 mediante zimografía de actividad <i>in situ</i>	47
2.7. Determinación de la capacidad de <i>L. murinus</i> 26B1 y <i>S. aureus</i> ATCC 6538p para producir biopelículas	48
Análisis estadístico de resultados	49
CAPÍTULO 3: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN RESULTADOS	50
3.1. Construcción de la cinética de crecimiento de <i>L. murinus</i> 26B1 y <i>S. aureus</i> ATCC 6538p.....	51
3.2. Perfil de fermentación de carbohidratos de <i>L. murinus</i> 26B1	56

3.3. Evaluación del potencial antagonico de <i>L. murinus</i> 26B1 mediante ensayos de inhibición en agar.....	57
3.4. Caracterización de los sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1.....	59
3.4.1. Cuantificación del contenido proteico de los sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1 (10X) mediante el microensayo de Bradford (1976).....	59
3.4.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de cultivo de <i>L. murinus</i> 26B1 concentrados 10X.....	60
3.4.3. Cinética de inhibición de <i>S. aureus</i> ATCC 6538p en caldo BHI con proteínas de sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1.....	62
3.4.4. Perfil electroforético de los sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1.....	67
3.4.5. Actividad lítica de los sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1 mediante zimografía <i>in situ</i>	71
3.5. Capacidad de <i>L. murinus</i> 26B1 y <i>S. aureus</i> ATCC 6538p para producir biopelículas	75
CONCLUSIONES.....	82
RECOMENDACIONES.....	84
REFERENCIAS.....	85
ANEXOS.....	103

Índice de cuadros

Cuadro 1. Enfermedades causadas por <i>S. aureus</i>	14
Cuadro 2. Métodos para la cuantificación de biopelículas.....	20
Cuadro 3. Clasificación de bacteriocinas.....	29
Cuadro 4. Resultados del porcentaje de similitud de los productos amplificados por PCR.	37
Cuadro 5. Resumen estadístico para log UFC/mL de los diferentes cultivos (h) de <i>L. murinus</i> 26B1.....	53
Cuadro 6. Resultados del ANOVA para log UFC/mL de los diferentes cultivos (h) de <i>L. murinus</i> 26B1.....	53
Cuadro 7. Resumen estadístico para DO _{λ600 nm} de los diferentes cultivos (h) de <i>L. murinus</i> 26B1.....	53
Cuadro 8. Resultados del ANOVA para DO _{λ600 nm} de los diferentes cultivos (h) de <i>L. murinus</i> 26B1.....	53
Cuadro 9. Resumen estadístico para log UFC/mL de los diferentes cultivos (h) de <i>S. aureus</i> ATCC 6538p.....	55
Cuadro 10. Resultados del ANOVA para log UFC/mL de los diferentes cultivos (h) de <i>S. aureus</i> ATCC 6538p.....	55
Cuadro 11. Resumen estadístico para DO _{λ600 nm} de los diferentes cultivos (h) de <i>S. aureus</i> ATCC 6538p.....	55
Cuadro 12. Resultados del ANOVA para DO _{λ600 nm} de los diferentes cultivos (h) de <i>S. aureus</i> ATCC 6538p.....	56
Cuadro 13. Actividad inhibitoria de <i>L. murinus</i> 26B1 sobre <i>S. aureus</i> ATCC 6538p.....	58

Cuadro 14. Contenido proteico en los sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1 (10X) neutralizados y filtrados.....	59
Cuadro 15. Resumen estadístico para la concentración de proteínas contenidas en los sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1	60
Cuadro 16. Resultados del ANOVA para la concentración de proteínas contenidas en los sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1	60
Cuadro 17. Resumen estadístico para los halos de inhibición (mm) de <i>S. aureus</i> ATCC 6538p producidos por los sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1 (10X).....	61
Cuadro 18. Resultados del ANOVA para los halos de inhibición (mm) de <i>S. aureus</i> ATCC 6538p producidos por los sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1	61
Cuadro 19. Resultados del ANOVA para log UFC/mL de <i>S. aureus</i> ATCC 6538p en presencia de proteínas de sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1 en fase logarítmica temprana	64
Cuadro 20. Resultados del ANOVA para log UFC/mL de <i>S. aureus</i> ATCC 6538p en presencia de proteínas de sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1 en fase logarítmica tardía	66
Cuadro 21. Masa molecular relativa de las bandas en los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1 mediante SDS-PAGE (12% T, 3.3% C)....	69
Cuadro 22. Resumen estadístico para las masas moleculares relativas de las proteínas contenidas en los sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1	70
Cuadro 23. Resultados del ANOVA para las masas moleculares relativas de las proteínas contenidas en los sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1	71
Cuadro 24. Proteínas de sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1 con actividad lítica sobre <i>S. aureus</i> ATCC 6538p en fase logarítmica (2 h).....	74
Cuadro 25. Resultados del ANOVA para la producción de biopelículas de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	77
Cuadro 26. Resultados del ANOVA para la producción de biopelículas de <i>S. aureus</i> ATCC 6538p	78
Cuadro 27. Resultados del ANOVA para la producción de biopelículas de <i>L. murinus</i>	80
Cuadro 28. Capacidad para producir biopelículas de <i>L. murinus</i> 26B1 y <i>S. aureus</i> ATCC 6538p luego de 72 h	80
Cuadro 29. Cebadores utilizados para la identificación de las cepas de BAL obtenidas ...	104
Cuadro 30. Sustratos contenidos en la galería API®50CH (bioMérieux, México)	108

Índice de figuras

Figura 1. Estructura del peptidoglicano de la pared celular de <i>S. aureus</i>	17
Figura 2. Modelo de desarrollo de biopelícula de <i>S. aureus</i>	18
Figura 3. Estructura del peptidoglicano y especificidad de las PGH por sustrato.....	30
Figura 4. Aislamiento de BAL del tracto intestinal de ratón.....	35
Figura 5. Galerías para la interpretación de los resultados del perfil de fermentación (API®50CH)	41
Figura 6. Colonias de <i>L. murinus</i> 26B1.....	51
Figura 7. Colonias de <i>S. aureus</i> ATCC 6538p.....	51
Figura 8. Cinética de crecimiento de <i>L. murinus</i> 26B1, log UFC/mL y DO _{λ600 nm}	52
Figura 9. Cinética de crecimiento de <i>S. aureus</i> , log UFC/mL y DO _{λ600 nm}	54
Figura 10. Resultados del perfil de fermentación de carbohidratos de <i>L. murinus</i> 26B1 a) a las 24 h y b) a las 48 h, Sistema API®50CH	57
Figura 11. Ensayo de inhibición en placa de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1 en fase logarítmica frente a <i>S. aureus</i> ATCC 6538p	58
Figura 12. Método microdilución en caldo	62
Figura 13. Curva de inhibición de <i>S. aureus</i> ATCC 6538p frente a proteínas contenidas en los sobrenadantes 10X de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1 en fase logarítmica temprana	64
Figura 14. Curva de inhibición de <i>S. aureus</i> ATCC 6538p frente a proteínas contenidas en los sobrenadantes 10X de cultivos de <i>L. murinus</i> 26B1 en fase logarítmica tardía	66
Figura 15. Perfil electroforético de los sobrenadantes de <i>L. murinus</i> 26B1.....	68
Figura 16. Actividad lítica de las proteínas contenidas en los sobrenadantes de cultivo de <i>L. murinus</i> 26B1 frente a <i>M. lysodeikticus</i> ATCC 4698.....	72
Figura 17. Actividad lítica de las proteínas contenidas en los sobrenadantes de cultivo de <i>L. murinus</i> 26B1 frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538p.....	72
Figura 18. Ensayo <i>in vitro</i> para la detección de biopelículas en placa de poliestireno a 4, 25 y 35°C durante 72 h.....	75
Figura 19. Formación de biopelículas de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 en poliestireno.....	76
Figura 20. Formación de biopelículas de <i>S. aureus</i> ATCC 6538p en poliestireno	78
Figura 21. Formación de biopelículas de <i>L. murinus</i> 26B1 en poliestireno.....	79
Figura 22. Curva estándar de Albúmina Sérica de Bovino	109

Abreviaturas y símbolos

A: Absorbancia

$\lambda_{600 \text{ nm}}$: Longitud de onda de 600 nanómetros

$\lambda_{595 \text{ nm}}$: Longitud de onda de 595 nanómetros

ATCC: *American Type Culture Collection*

BAL: Bacterias Ácido Lácticas

BSA: Bovine Serum Albumine (Albúmina de suero bovino)

°C: grado Celsius

CBM: Concentración Bactericida Mínima

ECDC: *European Center for Diseases Control and Prevention*

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio)

DO: Densidad Óptica

DNAe: ADN extracelular

EPS: Exopolisacáridos

g: Gramos

h: Horas

HCl: Ácido clorhídrico

H₂O_d: Agua destilada

mA: Miliamperios

mBar: Milibar

mM: Milimol

MPM: Marcadores de Peso Molecular

MSCRAMM: Componentes de la matriz extracelular responsables de la adhesión microbiana a los tejidos del huésped

NaOH: hidróxido de sodio

PBS: Amortiguador salino de fosfatos por sus siglas en inglés (*Phosphate Buffered Saline*)

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

pH: Potencial de hidrogeniones

PSM: Proteínas modulinas solubles en fenol

QS: *quorum sensing* (percepción de quórum)

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico por sus siglas en inglés (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

UFC/mL: Unidades Formadoras de Colonia por mililitro

WHO: Organización Mundial de la Salud/OMS por sus siglas en inglés (*World Health Organization*)

µg: microgramos

µL: microlitros

Introducción

Staphylococcus aureus es uno de los principales agentes causales de enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) e intoxicación alimentaria aguda, debido a la ingestión de alimentos contaminados. Son patógenos ubicuos y emergentes, capaces de colonizar superficies de áreas de procesamiento de alimentos, su capacidad para producir exopolisacáridos favorece la formación de biopelículas, lo que les permite sobrevivir tras la aplicación de procedimientos de limpieza y desinfección. Además, *S. aureus* continúa siendo un problema en la infección nosocomial (infección intrahospitalaria), debido a que ha aumentado su perfil multirresistente, esto junto con sus factores de virulencia conducen a una alta morbilidad y mortalidad (Martín *et al.*, 2000; Maira *et al.*, 2002; Cantón y Ruíz, 2013; Shen *et al.*, 2017).

En México, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) reportó que, en el año 2015, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *S. aureus* ocuparon los principales lugares como agentes etiológicos causantes del 18.8, 12.4, 9.5 y 7% respectivamente, de las infecciones asociadas a los casos de atención de la salud. Por otro lado, según el estudio de prevalencia publicado por el Centro Europeo para el Control y la Prevención de Enfermedades (ECDC por sus siglas en inglés), *E. coli* (15.9%) es el patógeno más importante en la infección nosocomial, siendo el segundo y tercero *S. aureus* (12.3%) y *Enterococcus spp.* (9.6%), respectivamente. Estos últimos destacan también por su perfil multirresistente (Plachouras *et al.*, 2018).

S. aureus se ha estudiado ampliamente debido a su capacidad de presentar genes de resistencia a los antibióticos principalmente a meticilina (SARM) y con sensibilidad intermedia a la vancomicina y linezolid entre los más importantes (Cantón y Ruíz, 2013; Londoño *et al.*, 2016; Roy *et al.*, 2018). Esto agudiza la problemática generada por este microorganismo, identificándolo como patógeno emergente, por lo cual han surgido nuevos retos en su control. Entre los mecanismos de patogenicidad y virulencia, se encuentra la expresión de una gran variedad de proteínas, las cuales pertenecen a las moléculas de la matriz adhesiva presentes en la superficie de la bacteria, cuya función es la colonización e invasión celular del hospedero. Este conjunto de mecanismos de patogenicidad y virulencia,

le permiten a la bacteria persistir en el huésped y en el ambiente, sobreviviendo a factores adversos, al sistema inmune y a los antimicrobianos (Garzón *et al.*, 2019).

En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrolle la enfermedad. Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas bacterianos para controlar el desarrollo de patógenos, tal es el caso de las bacterias ácido lácticas (BAL), ya que son capaces de inhibir su crecimiento, entre los mecanismos de acción que utilizan las BAL se encuentra la competencia por espacio (Nesser *et al.*, 2000; Fujiwara *et al.*, 2001; Mukai *et al.*, 2002) o por nutrientes (Rolfe, 1991), interacciones directas con el patógeno (lisis enzimática y producción de bacteriocinas) (O'Shea *et al.*, 2012) e inducción de resistencia (Janisiewicz y Korsten, 2002; Hernández, 2007). Los antagonistas se caracterizan por poseer varios modos de acción, lo cual reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno.

Cabe mencionar que las BAL ocupan una gran variedad de nichos, desde sedimentos marinos (Elayaraja *et al.*, 2014), frutas (Kleynmans *et al.*, 1989; Vitali *et al.*, 2012; De Albuquerque *et al.*, 2018), vegetales (Darsanaki *et al.*, 2012; Vitali *et al.*, 2012) hasta el tracto gastrointestinal de humanos (Drago *et al.*, 1997; Verdenelli *et al.*, 2009) y animales (Jin *et al.*, 1998; Isani *et al.*, 2018).

En las últimas décadas se ha explorado el potencial antimicrobiano de las BAL sobre el control y/o erradicación de patógenos de interés sanitario, debido a su capacidad de producir diversos metabolitos como los ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, dióxido de carbono (CO₂), enzimas bacterianas líticas y bacteriocinas (Siamansouri *et al.*, 2013). Algunas de las ventajas que se han considerado para la aplicación y uso de agentes antimicrobianos son su no toxicidad para las células eucariotas, además de su espectro de inhibición frente a bacterias *Gram* positivas, motivo por el cual han sido consideradas “Generalmente como seguras” (estatus *GRAS*) por la *Food and Drug Administration* (FDA) de los EE. UU. Por lo anterior el uso de BAL no sólo se enfoca como bioconservador de alimentos, sino también como probióticos en medicina humana y veterinaria, ya que se conoce ampliamente su función, como microbiota benéfica del huésped, promoviendo un balance adecuado que permite asegurar una barrera protectora contra infecciones (López *et al.*, 2008; Beristain *et al.*, 2012). De aquí la importancia de la evaluación del espectro

antimicrobiano de BAL aisladas de distintos nichos y la identificación de sus herramientas metabólicas para su uso como nuevas estrategias de bioconservación (Leroy *et al.*, 2004) o como probiótico (Hotel *et al.*, 2001).

El efecto antagónico de diferentes cepas de *Lactobacillus* ha sido señalado por diversos autores. Perelmuter *et al.*, (2008), aislaron e identificaron cepas de *Lactobacillus spp.* a partir de heces de un perro sano, y caracterizaron su potencial como probióticos con el fin de evaluar su posible uso para perros. Por otro lado, Hojjati *et al.*, (2020), aislaron *Levilactobacillus brevis* a partir de queso tradicional iraní y evaluaron la actividad antagónica de los sobrenadantes libres de células de cultivos de *L. brevis*, sin neutralizar y neutralizados, frente a *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* PTCC 1707, *Salmonella typhimurium* PTCC 1609 y *S. aureus* ATCC 25923 y obtuvieron mayores halos de inhibición (mm) en los sobrenadantes sin neutralizar, esto por el efecto de los ácidos orgánicos producidos. Mientras que Tashakor *et al.*, (2017), aislaron la cepa de *Lactobacillus sakei* a partir de carne de res cruda para evaluar su efecto inhibidor contra bacterias alterantes y patógenos transmitidos por los alimentos, incluida *Listeria monocytogenes*. Demostraron que el ácido poligalacturónico, el nitrato de amonio y el hidrogenofosfato disódico mejoraron la actividad antagónica.

De acuerdo con la literatura, se ha demostrado que las BAL tienen un efecto antagonista significativo, por lo que su posible uso como agentes biológicos para el control de SARM multirresistente se debe seguir estudiando, para lograr que sus metabolitos antimicrobianos reduzcan la presión de colonización y, por tanto, su transmisión.

En la presente investigación se trabajó con una cepa de *L. murinus* 26B1 aislada del contenido intestinal del yeyuno de ratón, previamente caracterizada molecularmente por el grupo de trabajo del Proyecto PAPIIT con clave IN230820 “Evaluación *in vitro* del potencial antagónico de cepas de *Lactobacillus* aisladas de ratón” en el Laboratorio 7 de la UIM, FESC Campo 4.

CAPÍTULO 1: REVISIÓN DE LA LITERATURA

1.1. Importancia sanitaria de *S. aureus*

S. aureus es un coco Gram positivo que se agrupa en racimos, no móvil, que no forma esporas, β -hemolítico, catalasa y coagulasa positivo. Esta bacteria forma parte de la microbiota normal de los seres humanos, coloniza >20% de la población de manera asintomática, encontrándose principalmente en la piel, en la zona nasofaríngea, pliegues inguinales y axilas. Sin embargo, puede producir enfermedades y volverse sintomático cuando se rompen las barreras epiteliales (Lowy, 1998). Este patógeno se caracteriza por generar infecciones en piel y tejidos blandos (músculos, tendones, tejidos grasos, vasos sanguíneos) e invasión en dispositivos médicos. Es el agente aislado con mayor frecuencia en casos de toxi-infecciones alimentarias, por lo que es relevante en las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Su presencia en los alimentos se asocia directamente a una inadecuada manipulación o al empleo de materias primas contaminadas (Garzón *et al.*, 2019).

La extraordinaria capacidad de *S. aureus* para adquirir resistencia a los antibióticos es motivo de gran preocupación (Chambers *et al.*, 2009). Puede producir enfermedad por toxinas o superantígenos, invadir cualquier órgano o tejido y originar supuración, necrosis tisular, trombosis vascular y bacteremia. Puede crecer en el citoplasma celular, formar biopelículas y originar bacteremia persistente o infección crónica (Llinares *et al.*, 2013).

Staphylococcus aureus ATCC 6538p (FDA 209) es utilizada como cepa de referencia por la FDA, es una cepa para el control de calidad en laboratorios de microbiología, recomendada por ATCC para pruebas de inhibición, pruebas con agentes antimicrobianos, entre otras (Turgay y Erbilir, 2006; Li *et al.*, 2011; Makarova *et al.*, 2017; Ceresa *et al.*, 2020;).

1.1.1. Afecciones producidas de *S. aureus*

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) se encuentran entre los principales problemas de salud pública mundial y es así como miles de millones de personas alrededor del mundo sufren enfermedades por este motivo. Este agente produce diversas enterotoxinas (A, B, C₁, C₂, C₃, D, E, G, H e I) causantes de toxi-infecciones alimentarias (Halpin y Marth, 1989) y que son fácilmente identificables con antisueros específicos (Dinges *et al.*, 2000; Cervantes *et al.*, 2014). La producción de estas toxinas depende principalmente de la naturaleza del alimento, de los procesos a los cuales fue sometido (crudo, cocido, fermentado, etc.) y de su prolongada exposición a temperaturas de abuso (Halpin y Marth, 1989; Bennett,

1992). Se calculan unas 20 muertes por cada millón de habitantes, como consecuencia de las ETA (Nuñez *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2018).

Además, *S. aureus* es capaz de provocar infecciones nosocomiales, otro problema en salud pública, tanto por el incremento en su incidencia, como por el incremento en la morbi-mortalidad. Particularmente las infecciones nosocomiales ocasionadas por cepas de *S. aureus* tienen gran relevancia debido a la variedad de padecimientos causados por este microorganismo, como son: osteomielitis, endocarditis invasora, artritis séptica, septicemia, infecciones a nivel del sistema nervioso central, sistema respiratorio y vías urinarias, entre otras (cuadro 1).

Cuadro 1. Enfermedades causadas por *S. aureus*

Invasión directa	Superficial	Piodermas, incluyendo impétigo y paroniquia
		Infecciones de piel y tejidos blandos, forúnculos, linfagitis, etc.
	Profundas	Piomiositis
		Artritis séptica
		Osteomielitis
Diseminación por vía sanguínea	Bacteriemia con o sin choque o falla multiorgánica	
	Formación de abscesos metastásicos (cerebro, pulmón, hígado, bazo, riñón, etc.)	
Enfermedades mediadas por toxinas	Síndrome de piel escaldada (ETA y ETB)	
	Intoxicación alimentaria (A, B, C, D, E, G, H, I)	
	Síndrome del choque tóxico (TSST-1)	

Fuente: Nuñez *et al.*, 2009; Cervantes *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2018

1.1.2. Epidemiología de *S. aureus*

Staphylococcus aureus es uno de los microorganismos aislados con más frecuencia tanto a nivel nosocomial como comunitario. En México, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) notificó que los porcentajes de mortalidad entre pacientes infectados con *S. aureus* varían entre 5 y 70%. Esta misma reportó que en el periodo de 1997-2003, *S. aureus* ocupó el tercer lugar en morbilidad y el cuarto lugar en mortalidad. En un estudio de la Red Nacional de Resistencia Bacteriana en México, en el que participaron 11 centros en toda la República, se analizaron 641 aislados de *S. aureus* de junio a diciembre del 2004, encontrando 41.3% de resistencia a meticilina en los aislados nosocomiales y

32.4% en los aislados de la comunidad (Sifuentes *et al.*, 2006). Las infecciones por este microorganismo generan una importante morbimortalidad y un enorme coste médico asociado.

En el informe de 2018 del Banco Mundial sobre la carga económica de las enfermedades de transmisión alimentaria, se reportó que el costo de la pérdida total de productividad asociada con ese tipo de enfermedades en los países de ingresos bajos y medios se estimaba en 95 200 millones USD anuales, y que el costo anual del tratamiento de estas enfermedades se estima en 15 000 millones USD (WHO, 2018).

La resistencia de *S. aureus* a penicilina es un hecho desde que se empezó a utilizar de forma masiva en los años cuarenta. Poco después aparecían las primeras cepas resistentes a meticilina (SARM), inicialmente en el ámbito hospitalario. En los últimos años, además, el tratamiento de estas infecciones se ha complicado debido al incremento progresivo del aislamiento de cepas multirresistentes. La mortalidad de la bacteremia por *S. aureus* oscila entre el 30 y el 60%, dependiendo del perfil de resistencias y del tipo de paciente. (Carmona *et al.*, 2018). Además, es la cepa más frecuentemente aislada de casos de mastitis bovina en países latinoamericanos como México y Argentina, así como en otros países de gran desarrollo lechero (Zecconi *et al.*, 2006).

1.1.3. Mecanismos de virulencia de *S. aureus*

Los factores de virulencia de *S. aureus* se expresan preferentemente en la fase logarítmica de crecimiento. Se ha propuesto que la expresión de estos factores, cumplen con la función de organizar el proceso de infección (Lowy, 1998). Inicialmente, las adhesinas de superficie reconocen las estructuras del huésped facilitando la colonización, seguido de la multiplicación del microorganismo y la secreción de toxinas (α , β , γ y δ hemolisinas, leucotoxinas, enterotoxinas) y enzimas (serín proteasas, cisteína proteasas, lipasas). Sin embargo, para lograr la persistencia intracelular, *S. aureus* debe evitar la respuesta inmune e inflamatoria del huésped, para lo cual regula negativamente la expresión de los factores de virulencia. Esta red regulatoria puede ser la clave en la patogénesis de la infección por *S. aureus* que conduce a la cronicidad de la enfermedad y que, al mismo tiempo, permite la adaptación del microorganismo a los cambios del microambiente durante el curso de la infección y a su supervivencia y persistencia intracelular (Tuchscher *et al.*, 2010).

1.1.3.1. Polisacáridos capsulares

Staphylococcus aureus produce polisacáridos capsulares (capsular polysaccharides “CPs”), los cuales han sido detectados en estudios *in vitro* en condiciones definidas de cultivo e *in vivo* durante infecciones intramamarias bovinas experimentales agudas y crónicas (Hensen *et al.*, 2000). Se ha demostrado que los CPs confieren resistencia a la fagocitosis por neutrófilos polimorfonucleares, y esta es considerada la principal línea de defensa de la glándula mamaria frente a patógenos invasores (Paape *et al.*, 2002). Los serotipos CP5 y CP8 han sido aislados de infecciones humanas y bovinas a nivel mundial (O’Riordan y Lee, 2004). Ambos serotipos están compuestos por los mismos tres azúcares (ManNAcA, 1-FucNac y d-FucNac), y comparten 12 de los 16 genes involucrados en su expresión (Tuchscher *et al.*, 2010). Su síntesis ocurre *in vitro* principalmente durante la fase de crecimiento exponencial y está influenciada por diversas señales ambientales, como la concentración de sales y el pH (Lee y Lee, 2006).

1.1.3.2. Proteínas de unión a fibronectina

La capacidad de *S. aureus* de internalizarse en células epiteliales y fagocíticas no profesionales, como células endoteliales y fibroblastos, se considera uno de los atributos cruciales de la patogénesis de *S. aureus*. A pesar de la presencia de numerosas adhesinas en el microorganismo, la patogénesis está relacionada esencialmente con la expresión de proteínas de superficie de unión a fibronectina (*fibronectin binding proteins* “FnBPs”) (Fowler *et al.*, 2000). Las proteínas FnBP-A y FnBP-B (codificadas por los genes *fnbA* y *fnbB*, localizados en tándem en el cromosoma) se encuentran ancladas a la membrana de la pared celular de *S. aureus*. En un estudio realizado con una mutante isogénica de *S. aureus* deficiente en ambas FnBPs se observó una disminución del 40% en la capacidad de esta cepa de adherirse a las células epiteliales, comparada con la cepa no modificada (Dziewanowska *et al.*, 1999).

1.1.3.3. Proteínas de unión a fibrinógeno (*clumping factor*)

Otro componente de *S. aureus* propuesto como factor importante de virulencia es el receptor de fibrinógeno de superficie celular, denominado factor de agregación (*clumping factor* “Clf”). El Clf se encuentra presente en la mayoría de las cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones en humanos y bovinos (Klein *et al.*, 2012; Ote *et al.*, 2011), y debe su nombre a que su interacción con el fibrinógeno plasmático conduce a una aglomeración instantánea de

las células bacterianas. Se han descrito dos factores de agregación, *ClfA* y *ClfB*. El *ClfA* es una proteína compuesta por 933 aminoácidos, contiene el dominio de unión al fibrinógeno. El *ClfB* también se encuentra asociado a la pared celular de *S. aureus* y posee una organización estructural similar a la del *ClfA*, posee el dominio de anclaje a membrana. El *ClfB* se une a las cadenas α y β del fibrinógeno, mientras que el *ClfA* solo reacciona con la cadena γ . De acuerdo con Ní Eidhin *et al.*, (1998), el *ClfB* se expresa solo durante la fase temprana de crecimiento exponencial y que luego es degradado en la superficie por proteasas bacterianas, mientras que el *ClfA* está presente en todo el ciclo de crecimiento (Hartford *et al.*, 1997).

Según Schindler y Schuhardt (1964), *S. aureus* está encapsulado por una capa gruesa de peptidoglucano (figura 1), que le confiere fuerza y rigidez a la pared celular, permitiendo su crecimiento y división, esto le permite mantener su forma celular y lo protege contra la lisis osmótica.

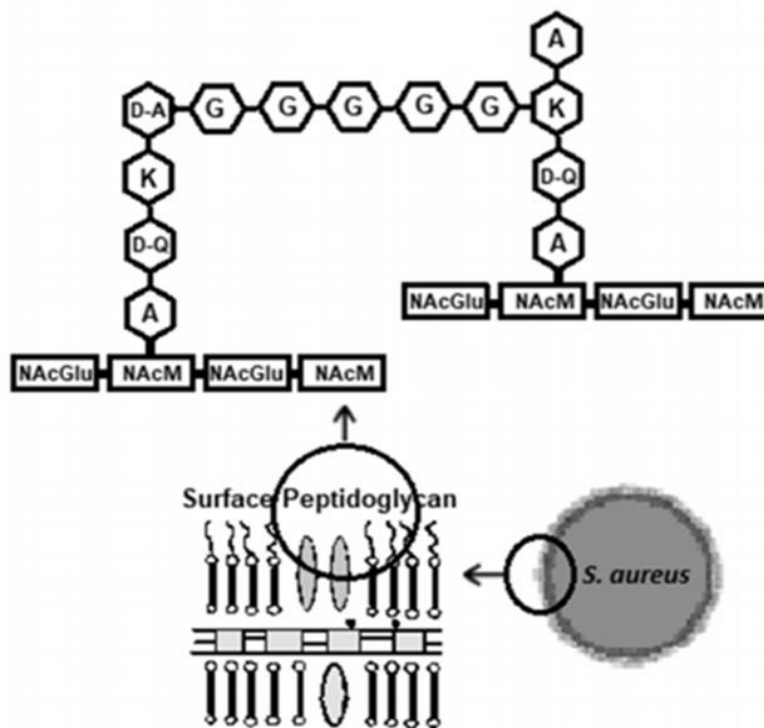


Figura 1. Estructura del peptidoglucano de la pared celular de *S. aureus*

N-Acetilglucosamina (NAcGlu); N-acetilmurámico (NAcM); L-alanina (A); D-glutamina (D-Q); L-lisina (K); D-alanina (D-A); L-glicina (G).

Fuente: Schindler y Schuhardt (1964), en Cardoso *et al.*, 2019

1.1.3.4. Formación de biopelículas

La biopelícula fue observada por primera vez en 1683 por el microbiólogo Van Leeuwenhoek (Bardell, 1983) quien la describió en la placa dental, esta se forma mediante conglomerados de células adheridas a una superficie, formando una matriz extracelular conformada principalmente por exopolisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos esto hace a la bacteria mil veces más resistente que las bacterias que viven en forma planctónica.

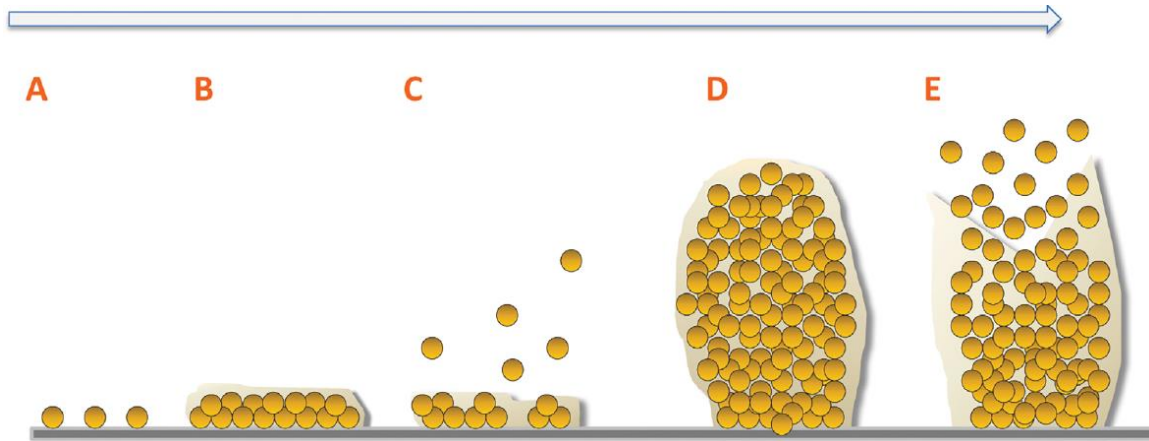


Figura 2. Modelo de desarrollo de biopelícula de *S. aureus*

El desarrollo de la biopelícula de *S. aureus* se describe en cinco etapas (figura 1): (A) fijación, (B) multiplicación, (C) éxodo, (D) maduración y (E) separación.

Fuente: Extraído de Barraud *et al.*, (2015)

La explicación al modelo desarrollado por Barraud en 2015 (figura 2), presenta cada una de las etapas que ocurren durante la formación de biopelículas por *S. aureus*. A) La *fijación* es la primera etapa de formación de la biopelícula, en la cual las células de *S. aureus* se unen a superficies abióticas o bióticas a través de interacciones hidrófobas o componentes de la matriz extracelular responsables de la adhesión microbiana a los tejidos del huésped (MSCRAMM), respectivamente, las condiciones ambientales como la temperatura, osmolaridad, pH, presencia de hierro y oxígeno, son importantes para generar una adecuada unión entre las células y la superficie que desean colonizar. Para que se dé la adhesión de estos microorganismos intervienen las proteínas de superficie, polisacárido/adhesinas capsulares (PS/A), la autolisina y fibrillas poliméricas extracelulares (figura 2A). Durante la *multiplicación*, la biopelícula se convierte en una "alfombra" confluyente de células compuesta de un DNA complementario (DNAc) y una matriz proteica, en esta etapa las bacterias pierden sus flagelos para empezar a formar la biopelícula. Esta etapa se caracteriza

por una división celular rápida que forma agregaciones sólidas compuestas de proteínas que incluyen modulinas solubles en fenol (PSM) y DNA extracelular (DNAe) (figura 2B). Al alcanzar la confluencia, se produce un período de *éxodo* masivo de células en el que se libera una subpoblación de células de la biopelícula (figura 2C). Posteriormente se llega a la etapa de *maduración*, donde hay crecimiento, las células se dividen, se diseminan por el lugar colonizado y forman una matriz extracelular (Nazar, 2007). Se ha comprobado que estas etapas se llevan a cabo por medio de un mecanismo intercelular denominado *quorum sensing* (QS) que permite que haya un proceso de señalización, lo que da lugar a que la biopelícula actúe como una comunidad en lugar de un grupo de células independientes (Harper *et al.*, 2014). El QS en *S. aureus* está mediado por el locus Agr. El sistema Agr está constituido por RNAII y RNAIII. La importancia del sistema Agr en el QS radica en que éste regula los factores de virulencia de la bacteria (figura 2D). La última etapa de formación de la biopelícula es la *separación*, que se genera cuando el ambiente se encuentra sobresaturado o escasean los nutrientes y debido a esto por medio de señales químicas comienza el desprendimiento de las bacterias para colonizar nuevas superficies (Nazar, 2007) (figura 2E). La importancia de la biopelícula radica en la producción y degradación de materia orgánica, la degradación de contaminantes ambientales y la infección. En cuanto al papel que tienen estas estructuras en las enfermedades y considerando que las bacterias formadoras de biopelícula presentan una sensibilidad reducida a los tratamientos convencionales, se ha reportado que más del 60% de todas las infecciones microbianas son causadas por biopelículas (Mendoza, 2004). Las células que conforman una biopelícula son más resistentes al estrés ambiental, incluido agentes antimicrobianos, limpieza y desinfección, desecación, etc., que las células planctónicas (O'Toole *et al.*, 2000). Esta estrategia de supervivencia favorece la persistencia de patógenos microbianos en industrias alimentarias y contaminaciones cruzadas recurrentes (Martinez *et al.*, 2016).

1.1.3.4.1. Métodos para la detección y cuantificación de biopelículas

En general, todas las superficies pueden albergar biopelículas incluyendo plásticos, vidrio, metal, madera, superficies de los alimentos, etc. (Donlan, 2002). Las propiedades de la superficie son cruciales en la adhesión bacteriana. Existen muchos métodos para llevar a cabo la identificación y cuantificación de biopelículas (Wilson *et al.*, 2017). A continuación, se mencionan algunos métodos para su cuantificación (Cuadro 2).

Cuadro 2. Métodos para la cuantificación de biopelículas

Métodos	Descripción
Determinación de la masa seca	Se coloca la muestra en un horno a una temperatura constante hasta que se elimina el agua y se alcanza un peso invariable
Carbón orgánico total	Se mide la cantidad de carbono de una muestra que ya está relacionada con la presencia de compuestos orgánicos o compuestos de carbono derivados de seres vivos (proteínas, lípidos, urea, etc.)
Determinación de la proteína total	Se extrae y se mide el contenido total de proteína, proporcional al crecimiento total de biofilm. El contenido en proteínas se correlaciona con el número de células presente en el biofilm
Tinción de cristal violeta	Consiste en teñir las biopelículas con cristal violeta, recuperar el colorante unido y medir su absorbancia mediante espectrofotometría
Ensayos metabólicos (por ejemplo, sales de tetrazolio)	La base de estos ensayos es la conversión de un sustrato específico, por actividad metabólica celular, en un producto coloreado, que se puede medir por espectrofotometría. Las sales de tetrazolio permiten cuantificar y visualizar la viabilidad celular y medir la actividad metabólica
Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)	Permite la medición no destructiva de la acumulación de biopelículas en función del tiempo. El dispositivo capta la adhesión de bacterias al cristal de cuarzo ya que provoca una vibración de dichas superficies

Fuente: Extraído de Wilson *et al.*, (2017)

1.1.3.5. Multirresistencia a antibióticos

La resistencia bacteriana de *S. aureus* se encuentra mediada por diferentes mecanismos, dos de los más importantes son la producción de β -lactamasas y la modificación al sitio blanco. Las β -lactamasas son enzimas producidas por algunas bacterias, actúan hidrolizando la unión peptídica endocíclica del anillo β -lactámico; se han descrito más de 200 diferentes β -lactamasas, algunas son específicas contra un antibiótico en particular, y otras son de espectro extendido. Actualmente las cepas de *S. aureus* poseen alto grado de resistencia a los antibióticos debido al intercambio horizontal de genes que son transportados por plásmidos, transposones y/o secuencias de inserción (segmentos de DNA que puede moverse en una posición cromosómica a otra del mismo o diferente cromosoma).

El elemento central de la resistencia a la meticilina en *S. aureus* es la adquisición del gen *mecA*, localizado en el casete cromosomal estafilocócico *mec* (SCC*mec*). *mecA* codifica para

una proteína de unión a la penicilina de 78 kDa (PBP2a) la cual presenta una baja afinidad para la meticilina y para el resto de los β -lactámicos, lo que permite que PBP2a continúe sintetizando el peptidoglicano para la formación de la pared celular (Hiramatsu *et al.*, 2001).

1.2. Antagonismo bacteriano

El antagonismo bacteriano 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 (Janisiewicz y Korsten, 2002; Hernández *et al.*, 2007).

Las BAL producen sustancias que inhiben el crecimiento de otros microorganismos durante su crecimiento, utilizándose esta característica para la destrucción de bacterias no deseadas o patógenas en la elaboración de alimentos. Muchos de estos metabolitos no están aún caracterizados y con frecuencia, los productos activos son metabolitos excretados por la bacteria como el ácido láctico o derivados del metabolismo del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno. La utilización de los carbohidratos disponibles en el alimento y la reducción del pH a causa de los ácidos orgánicos producidos, son el principal mecanismo de antagonismo microbiano de las bacterias lácticas (Leveau y Bouix, 2000).

Las BAL son empleadas en la fabricación y conservación de alimentos, y, a pesar de su importancia económica, no siempre han recibido la atención necesaria por parte de los microbiólogos ni del sector industrial. El desarrollo de la industria agroalimentaria y en particular la utilización de materias primas nuevas, así como la necesidad de crear nuevos productos explica el interés creciente hacia este grupo de bacterias (Leveau y Bouix, 2000).

1.3. Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL no constituyen un grupo con significado taxonómico propio, sino que agrupa a especies que tienen en común la producción de ácido láctico a partir de azúcares (Vos *et al.*, 2011). Según Axelsson (1998) son bacterias Gram positivas con una composición de bases G+C de ADN inferior al 50%, no formadoras de esporas, catalasa negativa, no poseedoras de citocromos, anaerobias facultativas, tolerantes a ácido, no necesitan oxígeno para crecer, son tolerantes a la presencia de CO₂, nitritos, humo y concentraciones de sal relativamente altas. El grupo de bacterias lácticas asociadas con los alimentos incluyen cocos de géneros:

Lactococcus, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y bacilos de los géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium*. Dentro de las bacterias lácticas, el grupo *Lactobacillus* es el más importante y heterogéneo, incluyendo especies con propiedades bioquímicas y fisiológicas muy diferentes. El género *Lactobacillus* comprende 261 especies que son extremadamente diversas a nivel fenotípico, ecológico y genotípico. Zheng *et al.*, 2020 reclasificaron el género *Lactobacillus*, que incluyen organismos adaptados al huésped y que se han denominado *Lactobacillus delbrueckii*, *Paralactobacillus*; así como 23 nuevos géneros: *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Lactilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* y *Lentilactobacillus* (<http://lactotax.embl.de/wuyts/lactotax/>).

Estas bacterias residen en una variedad de hábitats que van desde plantas, frutos hasta múltiples nichos de mamíferos; su capacidad para crecer en una multitud de entornos se percibe como un signo de la diversidad metabólica (Gaspar *et al.*, 2013). El metabolismo de las BAL permite disminuir el contenido de carbohidratos presentes en su entorno, así como también el pH debido a la rápida producción de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico. Este proceso de acidificación es uno de los efectos más deseables de su crecimiento ya que permite inhibir el crecimiento de muchos microorganismos incluyendo los patógenos de interés sanitario (Leroy y De Vuyst, 2004).

Las BAL fermentan una amplia gama de azúcares para obtener su energía por fosforilación a nivel de sustrato. De acuerdo con la manera en que fermentan a los carbohidratos, se clasifican en:

Homofermentativas: emplean la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) produciendo ácido láctico como único producto final de la fermentación, conocida como fermentación homoláctica (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amilovorius*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasserii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus leichmanii* y

Ligilactobacillus salivarius). Cuando el flujo glicolítico es bajo pueden cambiar su metabolismo hacia la fermentación ácido-mixta y producir, además de lactato, acetato, dióxido de carbono (CO₂) y etanol en muy bajas concentraciones.

Heterofermentativas: emplean la vía heteroláctica también conocida como la vía de las pentosas fosfato o de las fosfoacetolasa (PK) produciendo cantidades equimoleculares de ácido láctico, CO₂ y etanol o acetato. Este tipo de BAL pueden dividirse en: a) BAL heterofermentativas facultativas que fermentan las hexosas por la vía EMP y las pentosas por la vía PK (*Lactocaseibacillus casei*, *L. curvatus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactiplantibacillus pentosus* y *L. sakei*) y b) BAL heterofermentativas estrictas que degradan tanto las hexosas como las pentosas por la vía PK (*L. brevis*, *L. buchneri*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Limosilactobacillus reuteri* y *Weissella viridescens*) (Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2017).

Investigadores han aislado especies de *Lactobacillus* de los intestinos de varios mamíferos, incluidos roedores, perros, gatos, rumiantes, caballos, primates y humanos. Savage *et al.*, (1968) reportaron que la microbiota normal de ratones lactantes se estableció en las diferentes áreas del intestino según una secuencia de tiempo definida. Los primeros tipos de bacterias que se pudieron cultivar del intestino fueron los *Lactobacillus* y los *Streptococcus*. Durante el primer día después del nacimiento, estas bacterias colonizaron todo el tracto digestivo y formaron capas en el epitelio del estómago y del esófago. Los tipos bacterianos que aparecieron a continuación fueron coliformes y *Enterococcus*. Aproximadamente desde el día 9 hasta el día 18 después del nacimiento, estas bacterias podrían cultivarse en cantidades extremadamente altas en el ciego y el colon.

Nardí *et al.*, (2004), purificaron y caracterizaron compuestos antibacterianos producidos por la cepa *L. murinus* L1, los cuales fueron capaces de inhibir varias bacterias patógenas deteriorantes de alimentos (*Bacillus cereus*, *Shigella sonnei* y *Salmonella entérica*). Por lo que recomiendan a esta cepa para ser utilizada como agente de control biotecnológico de bacterias patógenas de interés en la industria alimentaria.

1.3.1. Productos metabólicos de BAL

Los principales mecanismos por lo cual las BAL ejercen su potencial inhibitorio están relacionados con los productos generados de su metabolismo y/o crecimiento en ciertas condiciones ambientales. A continuación, se describen algunos de ellos:

1.3.1.1. Ácidos orgánicos

La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos y del pH es complementaria, siendo la fracción no disociada de los ácidos orgánicos la que posee una mayor actividad inhibidora debido a su naturaleza lipofílica, ya que pueden atravesar la membrana celular y disociarse en el citoplasma. Estas moléculas pueden ejercer dos efectos: interferir en las funciones celulares, como puede ser la translocación de sustrato y la fosforilación oxidativa, por otro lado, la disociación de los ácidos orgánicos provoca el incremento de protones en el interior celular. Cuando la concentración de protones excede la capacidad tampón del citoplasma se transportan hacia el exterior mediante bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Cuando estas reservas se agotan, la bomba de protones se detiene y se produce el descenso del pH interno, lo cual causa a su vez desnaturalización de las proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo así con la viabilidad (Urrego *et al.*, 2005). Como se mencionó antes, la producción de ácidos orgánicos define este grupo de microorganismos y es la principal característica por la cual son elegidos y utilizados en la industria alimentaria.

1.3.1.1.1. Ácido láctico

Es el metabolito que producen en mayor cantidad las BAL. La forma no disociada ($pK_a=3.857$) es la forma tóxica de la molécula, ya que ésta difunde a través de la membrana celular por ser liposoluble y una vez dentro dependiendo del pH intracelular, puede disociarse en mayor o menor medida liberando iones de H^+ que acidifican el citoplasma. Cuando la concentración de protones excede la capacidad tampón del citoplasma se transportan hacia el exterior mediante bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de las células procarióticas. Cuando estas reservas se agotan, la bomba de protones se detiene y se provoca el descenso del pH interno, lo cual causa a su vez desnaturalización de las proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo así con la viabilidad, causando con ello la muerte de las bacterias susceptibles (Alakomi *et al.*, 2000).

1.3.1.1.2. Ácido acético y propiónico

Son producidos por BAL heterofermentativas. De la misma manera que el ácido láctico, ambos interaccionan con la membrana celular al neutralizar el potencial electroquímico. Sin embargo, estos ácidos tienen un efecto antibacteriano más fuerte, lo que puede explicarse en parte por su alto valor de pKa. El ácido propiónico tiene un valor de pKa de 4.87 y el acético de 4.75 (Magnusson *et al.*, 2003; Ouwehand *et al.*, 2004).

1.3.1.2. Dióxido de carbono

Es un producto final de la fermentación heteroláctica y en ocasiones se obtiene por descarboxilación de aminoácidos. La actividad inhibitoria atribuida al dióxido de carbono se debe a que la formación de este compuesto puede crear un ambiente anaeróbico evitando el crecimiento de microorganismos, reduce el pH y puede ayudar a destruir la integridad de la pared celular. No se tiene mucha información acerca de su mecanismo de acción, pero se sugiere que inhibe las descarboxilaciones enzimáticas y su acumulación en la bicapa lipídica causa una disfunción en la permeabilidad. Se ha mostrado la actividad antimicrobiana del diacetilo a nivel de 200 µg/mL para levaduras y bacterias Gram negativas y a 300 µg/mL para bacterias Gram positivas no lácticas (Axelsson, 1998; Ouwehand *et al.*, 2004).

1.3.1.3. Peróxido de hidrógeno

En presencia de oxígeno, la mayoría de las BAL debido a que son catalasa negativa, son capaces de generar peróxido de hidrógeno (H₂O₂), no se acumula significativamente porque es descompuesto por la acción de peroxidasas, flavoproteínas y pseudocatalasas. Su propiedad antimicrobiana se atribuye a su efecto altamente oxidante, mediante la peroxidación de los lípidos de la membrana celular, lo cual genera cambios irreversibles en ella (Magnusson *et al.*, 2003). Collin y Aramaki (1980), estudiaron la producción de peróxido de hidrógeno por cuatro cepas de *L. acidophilus* a 37 y 4°C. Mediante espectrofotometría determinaron que dos de las cepas fueron capaces de producir concentraciones de H₂O₂ en cultivo de ≤10 µg/mL y las otras 2 cepas concentraciones de ≤2 µg/mL, en agitación constante. Además, demostraron que las cepas que produjeron mayor cantidad de H₂O₂ tuvieron efecto antagónico frente a *Pseudomonas fragi*, adicionaron 42 unidades/mL de catalasa en los controles negativos.

1.3.1.4. Reuterina

La reuterina o hidroxipropionaldehído, es una sustancia de bajo peso molecular y altamente soluble. Esta sustancia a diferencia de las bacteriocinas y el peróxido, solo se produce por *Limosilactobacillus reuteri*, que se encuentra principalmente en el tracto gastrointestinal de personas y animales. Su actividad antimicrobiana es extraordinariamente amplia, tiene actividad antibacterial (*Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Listeria*), antifúngica (*Candida*), antiprotozoaria (*Trypanosoma*) y antiviral. La reuterina se forma durante la utilización anaerobia del glicerol e inhibe la actividad de la enzima ribonucleótido reductasa involucrada en la síntesis del DNA, lo que determina su amplio espectro antimicrobiano (Magnusson *et al.*, 2003).

1.3.1.5. Diacetilo

La formación de compuestos como el diacetilo, es atribuida al catabolismo del ácido cítrico, en el que participan las bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*). Así, el ácido cítrico es descompuesto en una primera reacción por el enzima citratoliasa a ácidos acético y oxal-acético, y éste último tras una descarboxilación, en la que participa el enzima oxalacetato descarboxilasa, se convierte en pirúvico y CO₂ (Fleming *et al.*, 1985). Este piruvato es el punto de partida de otras rutas metabólicas que llevan a la formación de acetaldehído, acetoína y diacetilo. Especies particularmente importantes en la industria por su capacidad para producir estos compuestos a partir del citrato son *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* y *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*. Su efecto antimicrobiano es más efectivo a pH menores de 7, inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas, levaduras y mohos (Ouwehand *et al.*, 2004).

1.3.1.6. Producción de exopolisacáridos

Los exopolisacáridos (EPS) son polímeros de carbohidratos de cadena larga que son liberados por una amplia gama de microorganismos, incluidos hongos y bacterias (Donot *et al.*, 2012). Los EPS están presentes fuera de la pared celular, y exhiben una gran diversidad, no solo en su composición de azúcar, sino también en su enlace, ramificación y sustitución (Chapot *et al.*, 2014). Los EPS pueden estar asociados con la protección celular contra condiciones ambientales desfavorables, como la desecación, la presencia de oxígeno o compuestos tóxicos, bajas temperaturas, altas presiones osmóticas y ataque de bacteriófagos, y pueden contribuir a la absorción de iones metálicos, formación de biopelículas y los

mecanismos de adhesión celular (Caggianiello *et al.*, 2016; Sánchez *et al.*, 2006). Por otro lado, Liu *et al.*, (2017) reportaron que los exopolisacáridos producidos por *L. plantarum* inhibieron la formación de biopelículas de *P. aeruginosa*, *Escherichia*, *Salmonella* y *Staphylococcus*. Por otro lado, hay algunos estudios que han reportado que los EPS son degradados por las BAL. Pham *et al.*, 2000 informaron que los EPS producidos por *Lactocaseibacillus rhamnosus* fueron degradados por las enzimas de esta cepa y que se liberaron algunos azúcares reductores.

Son clasificados en homopolisacáridos o heteropolisacáridos en función de la composición de las unidades repetidas que los conforman. Los homopolisacáridos pueden ser clasificados en α -glucanos, β -glucanos o fructanos. Son producidos por enzimas que tienen la capacidad de transferir residuos de carbohidratos de una molécula donadora hacia una aceptora y se les ha denominado glicosiltransferasas, estas incluyen a las glucansacarasas y fructansacarasas, estas enzimas utilizan glucosa o fructosa, respectivamente. La mayoría de los EPS producidos por las BAL son heteropolisacáridos que presentan una estructura de tres a ocho unidades repetidas compuestas cada una de uno o dos monosacáridos, por lo regular ramnosa, fructosa, galactosa o glucosa (Ryan, *et al.*, 2015). La masa molecular de estas macromoléculas varía entre 104 y 107 Da (López-Soto, 2017).

Dertli *et al.*, (2013) aislaron y purificaron exopolisacáridos de *L. johnsonii* FI9785, que previamente se ha demostrado que actúa como un agente de exclusión competitivo para controlar *Clostridium perfringens* en aves de corral. El análisis estructural por espectroscopía de resonancia magnética nuclear reveló que *L. johnsonii* FI9785 puede producir dos tipos de exopolisacáridos, uno de ellos es un dextrano ramificado. Los EPS son importantes para el género *Lactobacillus* por sus supuestos roles en la colonización, adhesión, resistencia al estrés, interacciones huésped-bacteria y también inmunomodulación, que son propiedades importantes relacionadas con sus funciones probióticas.

1.3.1.7. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos sintetizados por bacterias que pueden matar a otras bacterias. Son antimicrobianos heterogéneos con mecanismos de acción, peso molecular y propiedades fisicoquímicas diferentes (Stoyanova *et al.*, 2012). Éstas pueden ser sintetizadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas; sin embargo, las producidas por las BAL (*Lactococcus*,

Lactobacillus, *Pediococcus*) han sido de gran interés por la industria alimentaria debido a que son consideradas seguras para su consumo y no son tóxicas para las células eucariotas (Nes *et al.*, 2007). La mayoría son efectivas contra microorganismos patógenos importantes involucrados en enfermedades transmitidas por alimentos, tales como: *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella spp.* (Wu *et al.*, 2004).

1.3.1.7.1. Clasificación de bacteriocinas

Las bacteriocinas que han sido definidas como “proteínas o complejos proteínicos con actividad bactericida, son secretados al medio extracelular por lo que son capaces de inducir los mismos riesgos para una bacteria patógena que los antibióticos. Se ha caracterizado el espectro antimicrobiano de algunas bacteriocinas sobre bacterias patógenas, las cuales rompen la pared celular de las bacterias Gram positivas y la membrana externa de las bacterias Gram negativas (Kumariya *et al.*, 2019; Balciunas *et al.*, 2013 y Dosta *et al.*, 2009). Las bacteriocinas representan un sustituto potencial de conservantes químicos, debido a que son producidas por BAL, las cuales son consideradas GRAS (generalmente reconocidas como seguras, por sus siglas en inglés). Estas pueden agruparse en cuatro clases (Cuadro 3).

1.3.1.7.2. Mecanismo de acción de las bacteriocinas

La formación de poros en la membrana citoplásmica de células sensibles parece ser un mecanismo de acción común, presentado por las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. La estructura de estos péptidos, α -hélice o β -laminar, formaría dos caras, una hidrofílica y otra hidrofóbica creando oligómeros que atravesarían la membrana formando poros, en los que el lado apolar de la molécula se situaría próxima a los lípidos de la membrana, y el lado polar miraría al centro del poro. Como consecuencia se observa, en general, una pérdida de iones K, ATP y, en algunos casos aminoácidos y moléculas pequeñas. La pérdida de estas sustancias origina a su vez una pérdida del potencial de membrana, consumo de las reservas energéticas celulares, descenso en la síntesis de ADN, ARN y proteínas, originando finalmente la muerte celular (Ojcius *et al.*, 1991). De acuerdo con su definición, las bacteriocinas se inactivan, al menos, por una enzima proteolítica, entre las que conviene citar las de origen pancreático (tripsina y alfa-quimiotripsina) y gástrico (pepsina) (Moreira *et al.*, 2002), característica que hace de estos metabolitos bacterianos, sustancias seguras para ser incluidas como bioconservantes de los alimentos, puesto que serían

inactivadas durante su paso por el tracto gastrointestinal sin ser absorbidos como compuestos activos.

Actualmente, la nisina y pediocina PA-1 tienen licencia para su uso como bioconservantes (Simha *et al.*, 2012). La nisina ha sido utilizada como “nisaplina”, la cual es una preparación con 2.5% de nisina, 7.5% de NaCl, leche seca sin grasa (12% proteínas y 6% de carbohidratos). Por otro lado, la pediocina PA-1 se utiliza en forma de “ALTA 2431”, la cual es producida por *Pediococcus acidilactici* durante la fermentación (Ennahar *et al.*, 2000).

Cuadro 3. Clasificación de bacteriocinas

Clase	Características	Ejemplo	Productor
I	Lantibióticos de bajo peso molecular (<5 kDa) y con modificaciones post-traduccionales	Nisina	<i>L. lactis</i> WNC20
II	Péptidos termoestables de bajo peso molecular (<10 kDa) sin modificaciones, cuya principal característica es la actividad antilisterial	Pediocina PA-1, sakacinas A y P, leucocina A.	<i>P. pentosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>L. sakei</i>
III	Péptidos de mayor tamaño (>30 kDa), termolábiles	Helveticina M, helveticina J y enterolisina A	<i>L. crispatus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>E. faecalis</i>
IV	Moléculas complejas con fracciones de lípidos y carbohidratos. Péptidos cíclicos	Lactocina S (glicoproteína)	<i>L. sakei</i> L45 <i>L. sakei</i> 148
V	No posee modificaciones post traduccionales	Enterocina AS-48	<i>E. faecalis</i>

Fuente: Kumariya *et al.*, 2019; Balciunas *et al.*, 2013 y Dosta *et al.*, 2009

1.3.1.8. Enzimas bacterianas

Las BAL sintetizan compuestos con la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismo patógenos. Las enzimas bacterianas de la pared celular, como las enzimas peptidoglicano hidrolasas, se clasifican dependiendo del tipo de enlace que hidrolizan: muramidasa, glucoamidasa, amidasa o endopeptidasa. Las enzimas peptidoglicano hidrolasas (PGH) hidrolizan el peptidoglicano, principal componente de la pared celular de bacterias. El peptidoglicano consiste en cadenas de residuos alternados de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc) unidos mediante enlaces β -1,4, que se entrecruzan por péptidos cortos formados por L- y D-aminoácidos. Las PGH se

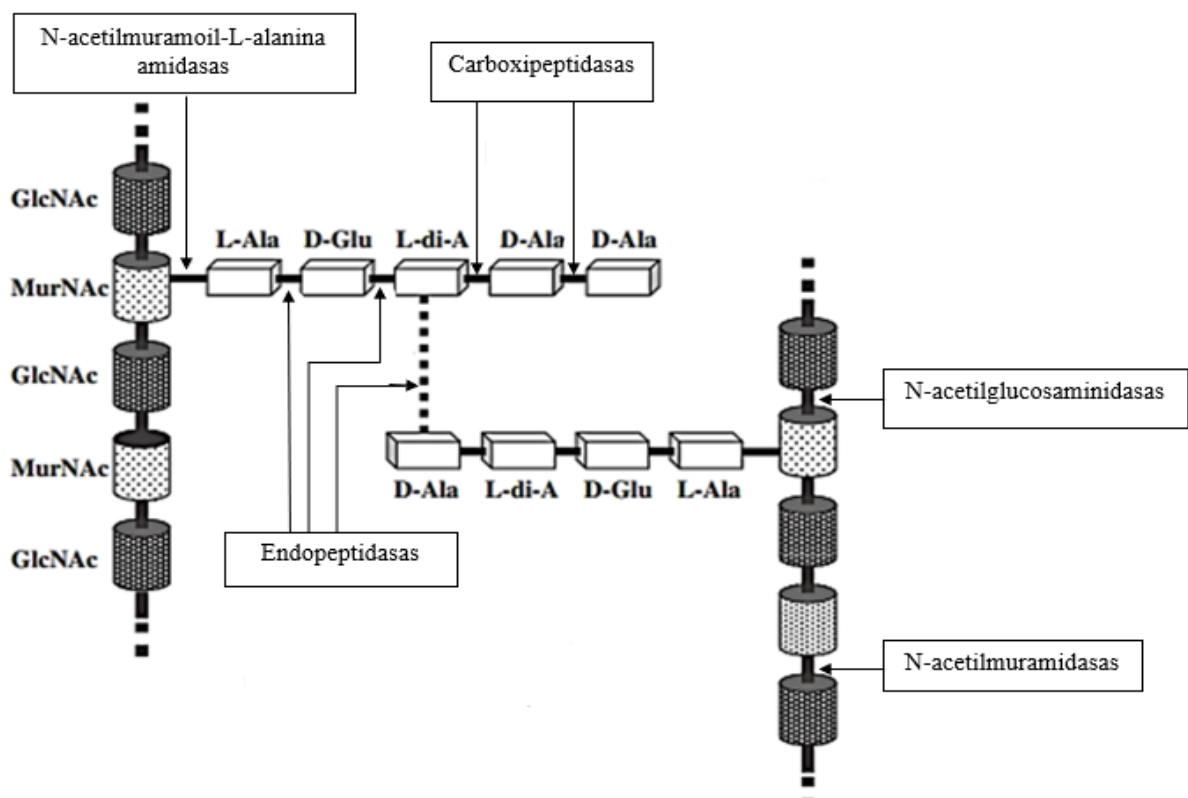


Figura 3. Estructura del peptidoglicano y especificidad de las PGH por sustrato

- Las N-acetilmuramoil-L-alanina amidasas rompen el enlace amida entre la cadena lateral del ácido láctico de MurNAc y la L-alanina del péptido corto.
- Las peptidasas son capaces de escindir péptidos cortos (carboxipeptidasas) o puentes cruzados de péptidos (endopeptidasas).
- Las N-acetilglucosaminidasas y las N-acetilmuramidasa hidrolizan los enlaces β -1,4 entre unidades de disacáridos de peptidoglicano.

Fuente: Layec *et al.*, 2008

han clasificado de acuerdo con el tipo de enlace que son capaces de romper en el peptidoglucano (Figura 3; Layec *et al.*, 2008).

Lortal *et al.*, (1997) demostraron la actividad lítica de diversas bacterias láctica en geles copolimerizados con *Micrococcus luteus*. *L. plantarum* presentó una banda con actividad lítica a 110 kDa, *L. acidophilus* a 27, 28, 30 y 41 kDa, mientras que *L. delbrueckii* exhibió una banda traslúcida muy intensificada a 29 kDa. Cabe mencionar que estos autores trabajaron con las células enteras (6 a 9 log UFC/mL), trataron sus muestras directamente con el buffer Laemmli para extraer las enzimas peptidoglicano hidrolasas.

Mora *et al.*, (2003) demostraron los perfiles de peptidoglicano hidrolasas de *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* y *L. lactis*, mediante la renaturalización de los geles de poli(acrilamida (SDS-PAGE) copolimerizados con *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698. Encontraron una banda en común con actividad lítica, que migraba aproximadamente 41.6 kDa, indicada como N-acetilmuramidasa (AcmA) característica de *L. lactis*. También identificaron la presencia de una banda con masa molecular relativa de 116 kDa. Evaluaron el efecto de distintas sustancias químicas como cloruro de calcio (0.5-15 mmol/L y cloruro de sodio (0.5-8%) en la solución de renaturalización (Tritón al 1%), concluyendo que altas concentraciones de cloruro de sodio afectaban la actividad lítica de las bandas, ya que éstas se veían tenues cuando se utilizaba cloruro de sodio al 8%. Además, observaron bandas de actividad entre 30-35 kDa cuando se utilizaba *L. monocytogenes* como sustrato.

Por otro parte, Layec *et al.*, (2008) demostraron las PGH pertenecientes a cada una de las cinco clases (N-acetilmuramoil-L-alanina amidasas, carboxipeptidasas, endopeptidasas, N-acetilglucosaminidasas y las N-acetilmuramidadas) dentro de los genomas de diferentes especies de *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Listeria*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. 23 cepas de *L. plantarum* fueron evaluadas, de las cuales 12 produjeron N-acetilmuramidadas, 1 N-acetilmuramoil-L-alanina amidasas, 2 N-acetilglucosaminidasas, 4 carboxipeptidasas y 4 endopeptidasas. Las enzimas N-acetilmuramidadas predominaron en todas las especies del género *Lactobacillus* probadas.

Para evaluar la presencia de proteasas o peptidasas Llorente *et al.*, (2008) cultivaron *P. acidilactici* ATCC 8042 en caldo MRS. Los sobrenadantes recolectados durante la fase

logarítmica mostraron actividad lítica sobre células de *M. lysodeikticus*; el uso de SDS-PAGE renaturalizados permitió la detección de una banda con actividad lítica de peptidoglicano hidrolasa que migraba aproximadamente 110 kDa.

Algunas enzimas peptidoglicano hidrolasas han sido utilizadas como agentes antibacterianos, por ejemplo, la lisostafina que es una endopeptidasa aislada de *Staphylococcus simulans*, que hidroliza los enlaces glicina-glicina específicos de la pared celular de *S. aureus*, tiene aplicaciones terapéuticas para tratar infecciones causadas por este microorganismo (Kumar, 2008).

1.4. BAL como estrategia de Bioconservación

La bioconservación se refiere a la extensión de la vida útil de los alimentos y el aumento de la seguridad microbiológica usando la microbiota natural o controlada y sus productos antibacterianos (Hugas, 1998; Lewus *et al.*, 1991). Diferentes estudios han aplicado la bioconservación mediante el uso de microbiota natural, como las BAL aisladas de productos lácteos, cárnicos, pescados y vegetales, utilizando las propiedades antibacterianas, atribuidas a los productos finales de su metabolismo como ácido láctico, acético, peróxido de hidrógeno, diacetaldehído, reuterina y bacteriocinas (Hugas, 1998). El uso generalizado de *Lactobacillus* en la industria alimentaria, su aparente papel en la salud gastrointestinal y su uso en la terapia probiótica han estimulado las investigaciones sobre su potencial antagónico.

1.5. Pruebas para la detección de actividad antibacteriana

Los métodos usados para evaluar el espectro antimicrobiano se dividen en i) pruebas discriminativas o *in vitro* que, incluyen cualquier prueba en que el compuesto no es aplicado directamente al producto bajo condiciones de uso, y ii) en pruebas de aplicación, en el que el antimicrobiano es aplicado directamente a un alimento. Las pruebas discriminativas pueden ser subdivididas en pruebas de punto final y descriptivas.

1.5.1. Pruebas discriminativas de punto final

Las pruebas de punto final son aquellas en las que un microorganismo es probado por un periodo arbitrario y los resultados reflejan el poder inhibitorio de un compuesto solo por un tiempo específico (pruebas de difusión en agar, dilución en agar y caldo), estos métodos pueden proporcionar solo información preliminar para determinar el uso potencial del compuesto de prueba (Llorente, 1998).

1.5.1.1. Difusión en agar

Es un método aceptado por la FDA-USDA y por la *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2005). En esta prueba, el compuesto antimicrobiano se adiciona (disco de papel, pozo o gota) a una placa de agar, el compuesto difunde a través del agar, el grado de inhibición es indicado por una zona de no crecimiento alrededor de la gota; la susceptibilidad de los microorganismos de prueba está relacionada con las zonas de inhibición (mm), lo que depende de la velocidad de difusión del compuesto y del crecimiento celular. Los resultados que se obtienen son cualitativos. El antimicrobiano evaluado no deberá ser altamente hidrofóbico, ya que no difundirá o lo hará muy poco y no se podrá detectar la inhibición (NCCLS, 2005).

1.5.1.2. 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 (Parish *et al.*, 1993).

1.5.1.3. Método de dilución en caldo

La prueba de dilución en caldo se usa generalmente cuando se desean datos cuantitativos para determinar cuándo un antimicrobiano es letal para el microorganismo de prueba. Esta prueba ofrece información sobre el crecimiento de un microorganismo en la presencia de un antimicrobiano conocido, para ello se diluye un antimicrobiano seriadamente y una sola concentración se adiciona a un tubo de cultivo con caldo no selectivo. Los tubos son inoculados con el microorganismo de prueba (Piddock, 1990; NCCLS, 2005) e incubados por 16-24 horas. La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante la concentración mínima inhibitoria (CIM), que es definida como la mínima concentración de antimicrobiano ($\mu\text{g/mL}$) que inhibe el crecimiento visible (ausencia de turbidez) de un microorganismo de prueba en un medio nutritivo después de un periodo de incubación específico y la concentración bactericida mínima (CBM), que se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina más del 99.9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (Barry, 1986).

1.5.2. 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 (Vigil *et al.*, 2005).

1.5.2.1. Pruebas turbidimétricas

Es una técnica clásica empleada en microbiología para medir el crecimiento celular, así como el efecto de un compuesto con actividad antimicrobiana sobre el crecimiento de un microorganismo indicador. Se mide la turbidez con respecto al tiempo con un espectrofotómetro, con la cual se puede observar el comportamiento de la bacteria en las diferentes fases de la curva, reflejándose esto en una supresión del nivel de crecimiento total, comparado con un control (Parish *et al.*, 1993).

1.5.2.2. Curvas de inhibición o muerte

La cuantificación *in vitro* de la actividad antimicrobiana se puede realizar mediante cinéticas de inhibición, las cuales consisten en utilizar medios bacteriológicos líquidos a los que se les inoculan cantidades conocidas del antimicrobiano y del microorganismo de prueba, y con base en muestreos periódicos se determina el porcentaje de muerte o sobrevivencia en UFC/mL (Parish *et al.*, 1993).

1.6. Antecedentes de la línea de trabajo

Las bacterias lácticas, presentes de forma natural en diversos nichos, son de gran interés debido a la capacidad de ciertas cepas para inhibir microorganismos patógenos y/o deteriorantes en alimentos. Y además debido al carácter *GRAS*, su aplicación podría constituir una estrategia real contra *S. aureus*. El Laboratorio 7 de bioconservación perteneciente a la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM-FESC-UNAM) se ha enfocado en el estudio de bacterias lácticas aplicando enfoques multidisciplinarios a fin de diseñar nuevas estrategias bioprotectoras con base científica sólida para inhibir efectivamente patógenos y contribuir con una solución para esta problemática.

1.6.1. Aislamiento de BAL del tracto intestinal de ratón

Se seleccionaron ratones de la cepa CD1 de tres semanas de edad y se les realizó eutanasia de acuerdo con lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio). El tracto intestinal de cada ratón se retiró por disección en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar NuairTM UN-126-400), separando el duodeno, yeyuno y colon, para obtener el contenido intestinal por medio de lavados con agua peptonada al 0.1% estéril, bajo condiciones de esterilidad (figura 4).



Figura 4. Aislamiento de BAL del tracto intestinal de ratón

El contenido intestinal recuperado fue inoculado en caldo MRS (1:10) incubando a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h en cámara de anaerobiosis (BD Gas PackTM). Posteriormente, se realizó sembrado por estría en agar MRS (Man, Rogosa, and Sharpe, BD, DifcoTM) incubando a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 h para cada muestra. Fueron seleccionadas las colonias redondas, blancas de 1-2 mm, se realizó tinción de Gram y resultaron Gram positivas. Estas cepas puras fueron cultivadas nuevamente en caldo MRS bajo las mismas condiciones y posteriormente cosechadas por centrifugación 5000 rpm, 10 min a 4°C (Centrifuge Centurion Scientific K2015), se

realizaron dos lavados con agua peptonada, tras lo cual las cepas fueron congeladas a $-80\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Thermo Scientific™ REVCO), liofilizadas (Labconco, Freezone 4.5) en caldo MRS (Man, Rogosa, and Sharpe, BD, Difco™) y leche descremada al 10% (p/v) para su conservación a largo plazo y almacenadas a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$.

1.6.2. Caracterización molecular

Las cepas aisladas fueron caracterizadas molecularmente por el proyecto dirigido por la Dra. Adriana Llorente (Proyecto PAPIIT con clave IN230820 “Evaluación *in vitro* del potencial antagónico de cepas de *Lactobacillus* aisladas de ratón”), en el laboratorio de Bioconservación 7, UIM-FESC campo 4, UNAM. Para realizar la caracterización molecular, se utilizó el DNA de las cepas aisladas y como blanco el DNA de las cepas *L. lactis* ATCC 0205V y *L. rhamnosus* ATCC 53103. El DNA cromosómico fue extraído por la técnica de fenol-cloroformo (Sambrook, 2001). Se empleó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para separar y determinar el tamaño de los productos amplificados, los amplicones obtenidos fueron limpiados con el Kit enzimático Exo-Sap IT, los cuales fueron secuenciados en el laboratorio UBIPRO. FES Iztacala, UNAM y finalmente se realizó el análisis de homología (BLAST). Las secuencias obtenidas de cada muestra se compararon con las secuencias moldes y con las secuencias de la base de datos en BLAST del NCBI (*Nacional Center for Technological Information*) previamente publicadas (cuadro 4). En base a lo expuesto, se eligió una de las cepas con mayor porcentaje de identidad (99.11%), indicada en el cuadro 4 como la cepa 11-26B1. El presente proyecto propone extender los estudios ya iniciados, evaluando la actividad inhibitoria de esta nueva cepa láctica que podría resultar altamente competitiva respecto a la inhibición de *S. aureus*. Entonces, a continuación, se plantea el objetivo general y los objetivos particulares de la presente tesis.

Cuadro 4. Resultados del porcentaje de similitud de los productos amplificados por PCR

Cepa	Nombre de BAL	% Identidad	Adhesión
1-15I1	<i>Ligilactobacillus murinus</i> strain NBRC 14221 16S ribosomal RNA, partial sequence	98.22	NR_112689.1
2-13C2	<i>Ligilactobacillus murinus</i> strain NBRC 14221 16S ribosomal RNA, partial sequence	98.20	NR_112689.1
3-11E3B	<i>Ligilactobacillus murinus</i> strain NBRC 14221 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.11	NR_112689.1
4-24F2B	<i>Ligilactobacillus murinus</i> strain NBRC 14221 16S ribosomal RNA, partial sequence	97.78	NR_112689.1
5-16A2	<i>Ligilactobacillus murinus</i> strain NBRC 14221 16S ribosomal RNA, partial sequence	97.35	NR_112689.1
6-23H1	<i>Ligilactobacillus murinus</i> strain NBRC 14221 16S ribosomal RNA, partial sequence	98.67	NR_112689.1
7-8D2	<i>Ligilactobacillus murinus</i> strain NBRC 14221 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.11	NR_112689.1
8-21E3	<i>Streptococcus vestibularis</i> ATCC 49124 16S ribosomal RNA, partial sequence	95.52	NR_042777.1
9-7G1	<i>Ligilactobacillus murinus</i> strain NBRC 14221 16S ribosomal RNA, partial sequence	98.65	NR_112689.1
10-17A2	<i>Ligilactobacillus murinus</i> strain NBRC 14221 16S ribosomal RNA, partial sequence	98.67	NR_112689.1
11-26B1	<i>Ligilactobacillus murinus</i> strain NBRC 14221 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.11	NR_112689.1
12-11E3A	<i>Ligilactobacillus murinus</i> strain NBRC 14221 16S ribosomal RNA, partial sequence	97.78	NR_112689.1
13-12E3	<i>Ligilactobacillus murinus</i> strain NBRC 14221 16S ribosomal RNA, partial sequence	98.23	NR_112689.1
14-24F2A	<i>Ligilactobacillus murinus</i> strain NBRC 14221 16S ribosomal RNA, partial sequence	98.67	NR_112689.1
15-22E3	<i>Ligilactobacillus murinus</i> strain NBRC 14221 16S ribosomal RNA, partial sequence	96.49	NR_112689.1
16-27H1	<i>Ligilactobacillus animalis</i> strain KCTC 3501 16S ribosomal RNA, partial sequence	93.81	NR_041610.1
17-1H2	<i>Ligilactobacillus murinus</i> strain NBRC 14221 16S ribosomal RNA, partial sequence	96.89%	NR_112689.1
18-2F2	<i>Ligilactobacillus murinus</i> strain NBRC 14221 16S ribosomal RNA, partial sequence	96.89%	NR_112689.1
<i>L. animalis</i>	<i>Ligilactobacillus animalis</i> strain KCTC 3501 16S ribosomal RNA, partial sequence	100.00%	NR_041610.1

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar *in vitro* la capacidad antagónica de *Ligilactobacillus murinus* 26B1 aislada del tracto intestinal de ratón frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p, mediante la aplicación de pruebas de inhibición bacteriana.

Objetivos Particulares

Objetivo Particular 1: Determinar las condiciones de crecimiento de *L. murinus* y *S. aureus* ATCC 6538p, mediante la construcción de sus cinéticas de crecimiento por espectrofotometría ($DO_{\lambda,600\text{ nm}}$) y cuenta en placa (UFC/mL), para establecer las fases de la cinética.

Objetivo Particular 2: Evaluar cualitativamente la actividad antimicrobiana de cultivos de *L. murinus* con diferentes tratamientos frente a *S. aureus* ATCC 6538p, mediante técnicas de difusión en agar para evidenciar el efecto antibacteriano a través de la formación de halos la inhibición del crecimiento del patógeno.

Objetivo Particular 3: Cuantificar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* frente a *S. aureus* ATCC 6538p mediante el método dilución en caldo BHI para obtener el CIM de los sobrenadantes, así como las curvas de inhibición o muerte por espectrofotometría (densidad óptica) y cuenta en placa (UFC/mL).

Objetivo Particular 4: Demostrar la actividad lítica que ejercen los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* frente a *S. aureus* ATCC 6538p mediante zimografías de actividad *in situ* para evidenciar la lisis celular del patógeno de prueba.

Objetivo Particular 5: Evaluar la capacidad de formación de biopelículas de *L. murinus* 26B1 y *S. aureus* ATCC 6538p, mediante la tinción con cristal violeta para realizar una clasificación según la intensidad de las biopelículas producidas a 4, 25 y 35°C.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Conservación de las cepas de *L. murinus* 26B1 y *S. aureus* ATCC 6538p

La cepa liofilizada de *L. murinus* y el pellet liofilizado comercial de *S. aureus* fueron manejados como lo describe Llorente *et al.*, (2008), con algunas modificaciones. La cepa de *L. murinus* fue reactivada en 30 mL de caldo MRS (De Man, Rogosa, and Sharpe, BD, Difco™) estéril, se incubó (Quincy Lab, Inc.) durante 24 h a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Para su conservación se realizó un pase del 2% del cultivo de 24 h a 500 mL de MRS (De Man, Rogosa, and Sharpe, BD, Difco™) estéril, se incubó overnight (16-18 h) en una incubadora a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Se corroboró la pureza del cultivo de 24 h, por siembra en placa de agar MRS (Man, Rogosa, and Sharpe, BD, Difco™) al 1.5%, las placas se incubaron invertidas durante 24 h a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ y posteriormente se les realizó tinción de Gram. A partir del cultivo overnight se sirvieron 40 mL en tubos Falcon y se cosecharon las células por centrifugación a 5,000 rpm durante 10 min a 4°C (Centrifuge Centurion Scientific K2015), los paquetes celulares fueron lavados dos veces con agua peptonada estéril al 0.1% y nuevamente centrifugados para obtener los paquetes celulares. Por último cada paquete celular fue resuspendido en 5 mL de MRS (Man, Rogosa, and Sharpe, BD, Difco™) estéril, del cual se tomaron alícuotas de 500 μL y se mezclaron con 500 μL de glicerol (50%/50%) en un tubo eppendorf, la mezcla se agitó con el vórtex y se almacenaron a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Por otro lado, *S. aureus* se reactivó en 30 mL de BHI (Brain Heart Infusion, BD, Difco™) estéril, se incubó (Quincy Lab, Inc.) durante 24 h a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Para su conservación se realizó un pase del 2% del cultivo de 24 h a 280 mL de BHI (Brain Heart Infusion, BD, Difco™) estéril y se incubó (Quincy Lab, Inc.) durante 6 h a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Se corroboró la pureza del cultivo de 24 h, por siembra en placa de agar BHI (Brain Heart Infusion, BD, Difco™) al 1.5%, las placas se incubaron invertidas durante 24 h a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ y posteriormente se les realizó tinción de Gram. A partir del cultivo de 6 h se sirvieron 40 mL en tubos Falcon y se cosecharon las células por centrifugación a 5,000 rpm durante 10 min a 4°C (Centrifuge Centurion Scientific K2015), los paquetes celulares fueron lavados dos veces con solución salina fisiológica al 0.9% y nuevamente centrifugados para obtener los paquetes celulares. Por último cada paquete celular fue resuspendido en 3 mL de BHI estéril, del cual se tomaron alícuotas de 800 μL y se mezclaron 200 μL de glicerol (80%/20%) y 10 perlas de vidrio estériles en un tubo eppendorf, la mezcla se agitó con el vórtex y se almacenaron a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

2.2. Perfil de fermentación de carbohidratos de *L. murinus* 26B1

La cepa de *L. murinus* fue identificada bioquímicamente por el sistema API®50CH (bioMérieux, México), con el que se determinó la capacidad de la cepa para fermentar carbohidratos en específico incorporado en un medio basal. La cepa se incubó en medio MRS durante 16h a $35\pm 2^\circ\text{C}$. Para el uso de las galerías API®50CH se trabajó en condiciones de esterilidad (campana Nuaire™ UN-126-400). Se colocaron 500 μL del cultivo *L. murinus* de 16 h en un tubo de cultivo con 2 mL de agua peptonada estéril y se homogenizó por agitación. Se colocó un determinado número de gotas (n) del tubo anterior a otro tubo de cultivo con 5 mL de agua peptonada al 0.1% estéril hasta obtener una turbidez similar al patrón 2 de Mc Farland (CDC-OMS, 2009). Posteriormente, se colocó del tubo de turbidez similar al patrón 2 de Mc Farland el doble de gotas (2n) a la ampollita que contiene el medio API®50CH, se homogenizó por sifoneo y se utilizó de manera inmediata. La suspensión bacteriana se repartió con ayuda de una pipeta estéril en los 50 microtubos de las galerías. Finalmente, se cubrieron con aceite mineral estéril para conservar un ambiente anaerobio. El orden de los carbohidratos en la galería se muestra en el anexo 5 (cuadro 32). Las galerías se incubaron (incubadora Quincy Lab, Inc, 12-140) a $35\pm 2^\circ\text{C}$, las lecturas se realizaron a las 24 y 48 h. Los resultados se interpretaron como “+” o “-” (figura 5) en términos del viraje que presentaron las cúpulas. Una vez obtenidos los resultados de las galerías, se interpretaron con la ayuda del programa informático de identificación API web™.

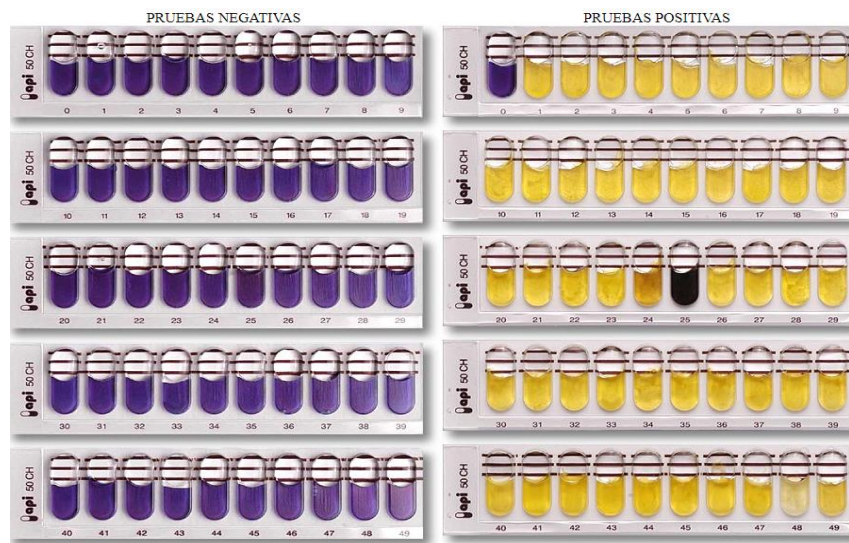


Figura 5. Galerías para la interpretación de los resultados del perfil de fermentación (API®50CH)

2.3. Construcción de la cinética de crecimiento de *L. murinus* 26B1 y *S. aureus* ATCC 6538p

La cepa de *L. murinus* liofilizada se reactivó en caldo MRS (Man, Rogosa, and Sharpe, BD, Difco™) estéril, se incubó overnight a $35\pm 2^\circ\text{C}$, se verificó la identidad y pureza mediante tinción de Gram (Gram Stain Kit, BD™). Una vez confirmada la pureza se realizó la cinética de crecimiento, para cada tiempo de muestreo 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h se midió la $\text{DO}_{\lambda 600 \text{ nm}}$ en un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf), utilizando el medio MRS como blanco, enseguida se realizaron diluciones decimales seriadas (1/10) en agua peptonada al 0.1% estéril, de cada dilución se sembraron 20 μL (por triplicado) sobre la superficie de placas con agar MRS al 1.5%, las placas se incubaron (Quincy Lab, Inc.) invertidas a $35\pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h, después de esto se hizo cuenta en placa para determinar las UFC/mL. La cepa de prueba *S. aureus* ATCC 6538p se reactivó en caldo BHI (Brain Heart Infusion, BD, Difco™) estéril, se incubó overnight a $35\pm 2^\circ\text{C}$. Se corroboró la pureza de la cepa mediante tinción de Gram (Gram Stain Kit, BD™) y se visualizó en el microscopio óptico Olympus (Mod. CX31 a 100X) para determinar su tinción y forma celular. En cada tiempo de muestreo 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 24 h se midió la $\text{DO}_{\lambda 600 \text{ nm}}$ en un espectrofotómetro (BioPhotometer, eppendorf), utilizando el medio BHI (Brain Heart Infusion, BD, Difco™) estéril como blanco, enseguida se realizaron diluciones decimales seriadas (1/10) en solución salina fisiológica al 0.9%, de cada dilución se sembraron 20 μL (por triplicado) sobre la superficie de placas con agar BHI al 1.5%, las placas se incubaron (Quincy Lab, Inc.) invertidas a $35\pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h, después de esto se hizo cuenta en placa para determinar las UFC/mL los cuales se transformaron al logaritmo base 10. El comportamiento de cada curva se definió mediante parámetros cinéticos como la tasa de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (t_d) y el número de generaciones (n) (ver ecuaciones en anexo 3).

2.4. Obtención de los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1

La preparación de los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* se hizo de acuerdo con Llorente (2008). Los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* en MRS de 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas de incubación se obtuvieron por centrifugación a 5,000 rpm durante 10 minutos a 4°C (Centrifuge Centurion Scientific K2015), el pH se neutralizó a 7 ± 0.02 con NaOH 6N y se esterilizó por medio de un sistema de filtración con tamaño de poro de 0.22 μm (Millipore Corp., Merck, USA); los sobrenadantes, se congelaron a $-80\pm 2^\circ\text{C}$ (Thermo Scientific™

REVCO) durante 24 h, por último se liofilizaron a $-50\pm 2^{\circ}\text{C}$ a una presión de 0.07 mBar (Labconco, Freezone 4.5), por 24 horas y se conservaron a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Los sobrenadantes libres de células se utilizaron para los ensayos de inhibición en placa, seguido de la caracterización en términos de contenido proteico, perfil electroforético y actividad *in situ* de las proteínas frente a *S. aureus* ATCC 6538p, esto con el fin de determinar en qué fase(s) ejercen su efecto antimicrobiano. El medio de crecimiento MRS no inoculado se utilizó como control negativo.

2.5. Ensayo de inhibición en placa de *L. murinus* 26B1 frente a *S. aureus* ATCC 6538p

Para determinar si la cepa de *L. murinus* ejerce un efecto antimicrobiano sobre *S. aureus* se realizó el ensayo de inhibición en placa, para lo cual, se prepararon los siguientes tratamientos a partir de cultivos de *L. murinus* de 4, 8, 12, 16 y 20 horas. **1)** Se evaluó la acción antagónica de las células viables de cultivos de *L. murinus*, para determinar si éstas ejercen un efecto antagónico sobre *S. aureus*, **2)** Así como la acción antagónica de las células viables de cultivos de *L. murinus* resuspendidas en solución salina (NaCl al 0.9%; $\text{DO}_{\lambda 600 \text{ nm}}$ 5), **3)** Se utilizaron las células de cultivos de *L. murinus* resuspendidas en agua destilada ($\text{DO}_{\lambda 600 \text{ nm}}$ 5), calentadas a 97°C por 15 min, para determinar si las células muertas por calor tienen un efecto inhibitorio sobre *S. aureus*, **4)** Las células de cultivos de *L. murinus* resuspendidas en solución salina estéril (NaCl al 0.9%; $\text{DO}_{\lambda 600 \text{ nm}}$ 5) tratadas con lisozima (Sigma Aldrich, Merck, 1 mg/mL), 2 horas a 37°C , fueron utilizadas para evidenciar si el protoplasto resultante de la pared celular destruida por la lisozima tiene un efecto antagónico, **5)** Los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* libres de células, se utilizaron para evaluar la acción antagónica del ácido láctico **6)** Mientras que los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* libres de células, neutralizados y calentados a 97°C por 5 min, fueron utilizados para evaluar la acción antagónica de bacteriocinas así como de otros compuestos solubles termoestables, **7)** el ácido láctico al 2% fue utilizado como control positivo. Cada uno de estos tratamientos fueron utilizados para evaluar cualitativamente su respectiva actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* ATCC 6538p, mediante el método de difusión en agar descrita por CLSI MO2- A11 (*Clinical and Laboratory Standard Institute* MO2-A11, 2012). Este se realizó en placas Petri, como capa base se utilizó agar MRS al 1.5% estéril, seguido de 5 μL de cada tratamiento, una vez que la gota del tratamiento se secó, se agregó la capa de agar suave BHI al 0.6% inoculado con *S. aureus* ATCC 6538p en fase logarítmica. El

efecto antibacteriano se evidenció a través de la formación de halos la inhibición del crecimiento del patógeno. Los resultados se expresaron según el tamaño del halo de inhibición en milímetros (mm).

2.6. Caracterización de los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1

2.6.1. Cuantificación de proteínas de los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 mediante el microensayo de Bradford

El contenido proteico de los sobrenadantes de cultivo de *L. murinus* 26B1, fue determinado por el microensayo de Bradford (1976) en microplacas de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos. Para ello, 15 mL de cada sobrenadante de cultivo de *L. murinus* 26B1 liofilizado fue resuspendido en 1.5 mL de agua destilada estéril (concentrado 10X), de los cuales se hicieron diluciones tales que permitieran obtener una absorbancia ($\lambda_{595\text{ nm}}$) dentro del intervalo de la curva patrón previamente construida. 10 μL de las muestras diluidas 1/10, fueron mezcladas con 200 μL del reactivo de Bradford, (Quick Start™, Bradford 1x, Dye Reagent, Bio-Rad). Posteriormente fueron incubadas por 10 minutos para finalmente ser leídas en el lector de placas (iMark™ Microplate Absorbance Reader, Bi-Rad) a $\lambda_{595\text{ nm}}$, utilizando como control negativo el medio MRS (De Man, Rogosa, and Sharpe, Difco™) concentrado 10X, el cual fue diluido de la misma manera que los sobrenadantes. Se realizó una curva estándar de albúmina sérica de bovino, de concentración 1mg/mL (BSA, Sigma Aldrich). La concentración de proteínas de los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 fue expresada en mg/mL y se obtuvo al interpolar los valores de absorbancia de la muestra, en la curva estándar. Para este ensayo se realizaron tres réplicas por duplicado cada una. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA simple con un nivel de confianza del 95.0% ($\alpha = 0.05$).

2.6.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de cultivo de *L. murinus* 26B1 concentrados 10X (por liofilización) mediante dilución en agar

Con el objetivo de evidenciar de manera semicuantitativa la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 en fase logarítmica, se evaluó la capacidad que tienen diferentes concentraciones de proteínas de los sobrenadantes de *L. murinus* 26B1 concentrados 10X en fase logarítmica temprana (0.372, 0.186, 0.093, 0.046, 0.023 y 0.011 mg/mL) y tardía (0.398, 0.199, 0.099, 0.049, 0.024 y 0.012 mg/mL) sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 6538p en agar BHI. Para obtener dichas concentraciones fue necesario hacer

diluciones dobles seriadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32) con agua destilada estéril. El control negativo, medio MRS concentrado 10X, fue tratado de la misma manera que las muestras problema para obtener concentraciones de proteínas de 0.298, 0.149, 0.074, 0.037, 0.018 y 0.009 mg/mL. En cajas Petri estériles (15 cm) se colocaron 6 penicilindros estériles equidistantes uno de otro, con el propósito de formar pozos y no de cortarlos. Después se agregó una capa base de agar Mueller Hinton (50 mL) (Pidcock, 1990; Llorente, 1998), una vez solidificada la base, se adicionaron 30 mL de una sobrecapa de agar suave (0.6%) inoculado con 1.5% (v/v) de *S. aureus* ATCC 6538p de un preinóculo en fase logarítmica (cultivo de 2 h en caldo BHI). Una vez solidificada la capa de agar suave, se retiraron los penicilindros para dejar descubiertos los pozos de la bicapa, en éstos se agregaron 200 µL de cada dilución de los sobrenadantes, así como de los controles, las placas se incubaron a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 1 h para permitir la difusión de las proteínas, después fueron incubadas a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Para establecer de manera semicuantitativa mediante la concentración inhibitoria mínima (CIM) la actividad antagónica de los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1, se registró la última dilución que producía un halo de inhibición del crecimiento visible de *S. aureus* en agar BHI a las 24 h de incubación a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Pidcock, 1990; Llorente 1998; NCCLS, 2005).

2.6.3. Cinética de inhibición de *S. aureus* ATCC 6538p en caldo BHI con proteínas de sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1

Se evaluó *in vitro* la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* frente a *S. aureus* ATCC 6538p en fase logarítmica mediante el método microdilución en caldo. Se construyó la curva de inhibición en caldo (CLSI MA45, 2016; Hoover, 1993) en microplacas de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos. Se combinaron 40, 80, 120 y 160 µL de sobrenadantes 10X de cultivo de *L. murinus* en fase logarítmica temprana, volúmenes que corresponden a una concentración de proteínas de 0.07, 0.14, 0.22 y 0.30 mg/mL, respectivamente. Iguales volúmenes de los sobrenadantes de cultivo en fase logarítmica tardía se colocaron en las microplacas, con una concentración de proteínas de 0.08, 0.16, 0.24 y 0.32 mg/mL, respectivamente. En cada uno de estos pocillos además se colocaron 160µL de un cultivo de *S. aureus* ATCC 6538p (2 h; fase exponencial). Como control negativo se utilizó el sobrenadante de MRS 10X. La absorbancia fue medida a las 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 24 horas en un espectrofotómetro (BioPhotometer, eppendorf) a una longitud de onda de 600

nm. Además, en cada tiempo de muestreo se realizaron diluciones decimales seriadas (10^0 a 10^6) en solución salina fisiológica, 20 μ L de cada dilución se sembró (por triplicado) en agar BHI al 1.5%, se incubaron (Quincy Lab, Inc.) invertidas durante 24 horas a $35\pm 2^\circ\text{C}$. Se realizó el recuento microbiano y se calculó las UFC/mL para construir la cinética de inhibición y con ello determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) del microorganismo de prueba.

2.6.4. Determinación del perfil electroforético de los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1(10X) mediante SDS-PAGE

Se determinó el perfil electroforético de las proteínas de los sobrenadantes de cultivos *L. murinus* de cada fase de crecimiento concentrados 10X, esto se realizó según Llorente (2008), siguiendo las especificaciones del equipo Mini-PROTEAN Tetra Cell™ de Bio-Rad. Para ello se realizó la precipitación de las proteínas de cada sobrenadante, por la técnica de Metanol-Cloroformo (Wessel *et al.*, 1984). Los pellets de proteínas precipitadas de los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* concentrados 10X fueron resuspendidas en agua destilada estéril, para después ser mezclada en una proporción 1:1 con el buffer de muestra de BioRad (20 μ L) (Dodecil sulfato de sodio, 2- β -Mercaptoetanol, azul de bromofenol Tris-HCl y glicerol), la mezcla se desnaturizó a 95°C (Eppendorf ThermoMixer®) por 5 min, 20 μ L (15 μ g de proteínas) de la muestra desnaturizada se colocó en cada carril. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida (gel separador al 12% y gel concentrador al 4%) bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE, Laemmli, 1970). Para la estimación de la masa molecular relativa se utilizaron dos tipos de marcadores, uno de alto peso molecular (Precision Plus, Protein™ Standards, All Blue, Bio-Rad) y uno de bajo peso molecular (Molecular Weight Standards Low Range™, BioRad). El gel se dejó correr por 150 min a 90 V y 20 mA. Al final de la electroforesis los geles se desmontaron y tiñeron en agitación orbital por 30 min con azul brillante Coomassie al 0.25% en 450 mL de metanol y 100 mL de ácido acético aforado a 1000 mL con agua destilada estéril. Transcurrido el tiempo de tinción, los geles se decoloraron con metanol-ácido acético-agua destilada estéril (200 mL, 150 mL, 650 mL). Para obtener el perfil electroforético, los geles fueron escaneados y analizados en un sistema Gel Logic 100 (Imaging System, KODAK) para confirmar la presencia de diferentes bandas de proteínas en las diferentes fases del cultivo.

2.6.5. Actividad lítica de los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 mediante zimografía de actividad *in situ*

Para fundamentar la actividad inhibitoria de los sobrenadantes de *L. murinus*, se realizaron electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) (gel separador al 12% y gel concentrador al 4%), co-polimerizados con 0.2% p/v de células liofilizadas de *M. lysodeikticus* ATCC 4698 como control (Mora *et al.*, 2003). En paralelo se realizaron electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) (gel separador al 12% y gel concentrador al 4%), copolimerizados con 0.2% p/v de células liofilizadas de *S. aureus* ATCC 6538p como cepa indicadora. Las células de *S. aureus* fueron cultivadas en caldo BHI (DifcoTM), incubadas (Quincy Lab, Inc.) a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 2 h para obtenerlas en fase logarítmica, las células se recolectaron por centrifugación, a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C (Centrifuge Centurion Scientific K2015), mismas que se lavaron dos veces con 5 mL de PBS y centrifugaron bajo las mismas condiciones para obtener los paquetes celulares. Los pellets se congelaron a $-80\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Thermo ScientificTM REVCO) por 24 h y liofilizaron a $-50\pm 2^{\circ}\text{C}$ a una presión de 0.07 mBar (Labconco, Freezone 4.5) por 24 h, por último, éstos se almacenaron a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Las zimografías de actividad *in situ* fueron realizadas con las proteínas precipitadas de los sobrenadantes 10X de cultivos de *L. murinus*, de cada fase de crecimiento, por la técnica Metanol-Cloroformo como se describió anteriormente. Se realizó electroforesis SDS-PAGE, por 180 min a 90 V y 20 mA, con los geles previamente co-polimerizados con las cepas indicadoras (*M. lysodeikticus* o *S. aureus* ATCC 6538p). Luego de la electroforesis los geles se lavaron con agua desionizada estéril en agitación por 30 min y posteriormente se incubaron en una solución amortiguadora de renaturalización (Tris-HCl 25 mM pH 8 con Tritón al 1%) durante 16 h. Se tñeron durante 1 h con azul de metileno (Sigma Aldrich) al 1% p/v en KOH al 0.1% p/v y se destñeron con agua destilada (Valence y Lortal, 1995). Los resultados se evidenciaron mediante la aparición de bandas no coloreadas en la posición de migración electroforética de las proteínas con actividad lítica. Para la estimación de la masa molecular relativa de las bandas con actividad lítica se utilizaron los dos tipos de marcadores, de alto y bajo peso molecular mencionados anteriormente (de acuerdo con Moya *et al.*, 2002).

2.7. Determinación de la capacidad de *L. murinus* 26B1 y *S. aureus* ATCC 6538p para producir biopelículas

Se evaluó la habilidad que tienen las cepas de *L. murinus* y *S. aureus* ATCC 6538p para formar biopelículas. Se utilizó la técnica descrita por Lebeer *et al.*, (2007), con algunas modificaciones. Como control positivo se utilizó *P. aeruginosa* ATCC 9720 y como control negativo MRS estéril. Para ello, 200 μ L de la suspensión bacteriana del cultivo de *Lactobacillus* de 12 horas en MRS, preparada a una $DO_{\lambda 600 \text{ nm}}$ de 0.2, se agregó a una microplaca de poliestireno de fondo plano con 96 pocillos (tres pocillos por cultivo), incubada estáticamente por 48 h a 4, 25 y 35°C. A las 24 horas y en cualquier condición el medio MRS fue reemplazado con medio fresco, las siguientes 24 h la bacteria planctónica fue removida y la placa conteniendo adherida la biopelícula de células fue lavada dos veces con PBS (NaCl 8.2 g/L; Na₂HPO₄ 1.1 g/L; K₂Cl 0.2 g/L y KH₂PO₄ 0.2 g/L). Se agregó 200 μ L de solución de cristal violeta al 0.1% en cada pozo. Después de teñir por 10 min a temperatura ambiente, se eliminó el exceso de colorante, se realizaron dos lavados con 200 μ L de agua destilada y se dejó secar por una 1 h en la incubadora (Quincy Lab, Inc.). Después el colorante unido a la célula adherida a la microplaca se extrajo con 200 μ L de alcohol etílico al 95%, y luego el contenido fue transferido a una nueva placa. Se midió la absorbancia ($\lambda_{595 \text{ nm}}$) de cada pozo utilizando un lector de microplaca (iMark™ Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad) (Merritt *et al.*, 2011). Como control negativo se utilizó el caldo MRS no inoculado. Se utilizaron las mismas condiciones para el caso de *S. aureus* excepto que la suspensión fue de un cultivo de 2 horas en BHI, preparado a una $DO_{\lambda 595 \text{ nm}}$ 0.2 (BioPhotometer, eppendorf®) y como control negativo caldo BHI (Difco™) sin inocular. Se realizaron 3 réplicas con 4 repeticiones cada cultivo, los resultados fueron promediados. En este estudio se usó la técnica estadística descrita por Stepanovic *et al.*, (2000) para la interpretación de los resultados. Se calculó la media de la absorbancia ($\lambda_{595 \text{ nm}}$) de los controles y la $DO_{\lambda 595 \text{ nm}}$ de cada cultivo bacteriano individualmente. El valor de corte por DO (DOc) se define como el valor de la media del blanco más tres desviaciones estándar por encima de la misma. La intensidad de la formación de biofilm se clasificó en las siguientes categorías:

- No productoras de biofilm ($A \leq DOc$);
- Débiles productoras de biofilm ($DOc < DO \leq 2xDOc$);
- Productoras moderadas de biofilm ($2xDOc < DO \leq 4xDOc$);
- Fuerte productora de biofilm ($4xDOc < DO$).

Análisis estadístico de resultados

Se utilizó el software STATGRAPHICS Centurion para calcular las medias, desviación estándar y coeficiente de variación de todas las variables estudiadas. Los resultados de log UFC/mL y densidades ópticas de los cultivos (horas) para establecer las diferentes fases de la cinética de crecimiento de *L. murinus* y *S. aureus* se procesaron mediante un ANOVA simple. El mismo procedimiento se utilizó para comparar los halos de inhibición (mm) promedio del crecimiento de *S. aureus* producidos por diferentes concentraciones de proteínas, contenidas en los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 y para el análisis de los resultados del contenido de proteínas en los sobrenadantes de diferentes tiempos de cultivo de *L. murinus* obtenidos en la cinética de crecimiento. Mediante ANOVA Multifactorial se determinaron el impacto que tiene el tiempo de muestreo y la concentración de proteínas contenidas en los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 en fase logarítmica temprana y tardía, sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 6538p en caldo BHI.

La cantidad de las proteínas secretadas en los sobrenadantes durante los diferentes tiempos de cultivo de *L. murinus* 26B1 y que fueron identificadas en los geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) se analizaron mediante el método Comparación de Varias Muestras. Por último, el ANOVA Multifactorial se utilizó para evaluar el efecto de tres diferentes temperaturas (4, 25 y 35°C) sobre la producción de biopelículas de cultivos de *P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. aureus* ATCC 6538p y *L. murinus* 26B1, con sus respectivos medios de cultivo como control negativo, se utilizó el ANOVA multifactorial.

Cuando se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$), se utilizó la prueba de rangos de Tukey para comparar todos los pares de medias y determinar cuáles son significativamente diferentes una de otra.

CAPÍTULO 3: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN RESULTADOS

3.1. Construcción de la cinética de crecimiento de *L. murinus* 26B1 y *S. aureus* ATCC 6538p

Las colonias de *L. murinus* cultivadas en agar MRS (De Man, Rogosa, and Sharpe, BD, Difco™) al 1.5% (figura 6a), se observaron a simple vista como colonias de 1-2 mm, redondas, bordes regulares, apariencia cremosa de color blanquecina. Las colonias sometidas a tinción de Gram, se visualizaron en el microscopio óptico Olympus (Mod. CX31 a 100X) observándose bastones Gram positivos, de 1 a 3 μm de diámetro (figura 6b).

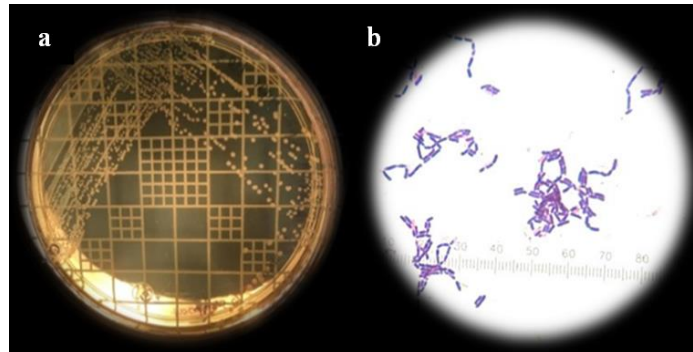


Figura 6. Colonias de *L. murinus* 26B1

a) Agar MRS al 1.5%, b) Tinción de Gram de las colonias de *L. murinus*

Las colonias de *S. aureus* ATCC 6538p cultivadas en agar BHI (figura 7a), se observaron a simple vista como colonias circulares, bordes lisos, apariencia cremosa de color amarillo característico de esta especie. Las colonias sometidas a tinción de Gram, se visualizaron en el microscopio óptico Olympus (Mod. CX31 a 100X) donde se observaron tétradas o pares de cocos Gram positivos, de 1 a 2 μm de diámetro (figura 7b).

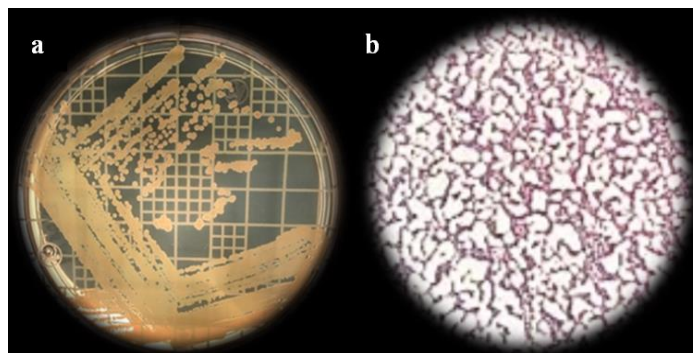


Figura 7. Colonias de *S. aureus* ATCC 6538p

a) Agar BHI al 1.5%, b) Tinción de Gram de las colonias de *S. aureus* ATCC 6538p

Una vez verificada la pureza de cada cepa, se realizó su respectiva cinética de crecimiento. Para *L. murinus* 26B1 se observó que la fase exponencial se inicia desde las primeras horas hasta las 4 h (5.73 log; $DO_{\lambda 600 \text{ nm}}$ de 2.082) y luego inicia la estacionaria, cuando se observan los logaritmos de UFC/mL (figura 8). Por otro lado, se pudo establecer que la fase exponencial se alcanzó desde el inicio del crecimiento hasta las 8 h (6.89 log UFC/mL; $DO_{\lambda 600 \text{ nm}}$ de 2.734), cuando se analiza la $DO_{\lambda 600 \text{ nm}}$. Los parámetros cinéticos fueron determinados, obteniendo una tasa de crecimiento específica de $\mu = 0.664 \text{ h}^{-1}$, tiempo de duplicación de $t_d = 1.042 \text{ h}$ y número de generaciones $n = 3$. Los resultados de los parámetros cinéticos de crecimiento fueron similares a los obtenidos por Üçok *et al.*, (2020), cuando determinó la cinética de crecimiento de *L. plantarum* L14, quienes obtuvieron los siguientes resultados, $\mu = 0.551 \text{ h}^{-1}$, $t_d = 1.26 \text{ h}$ y $n = 8$. Asimismo, se observó la relación inversamente proporcional entre la velocidad de crecimiento y los tiempos de generación, también descrita por Delignette-Muller (1998).

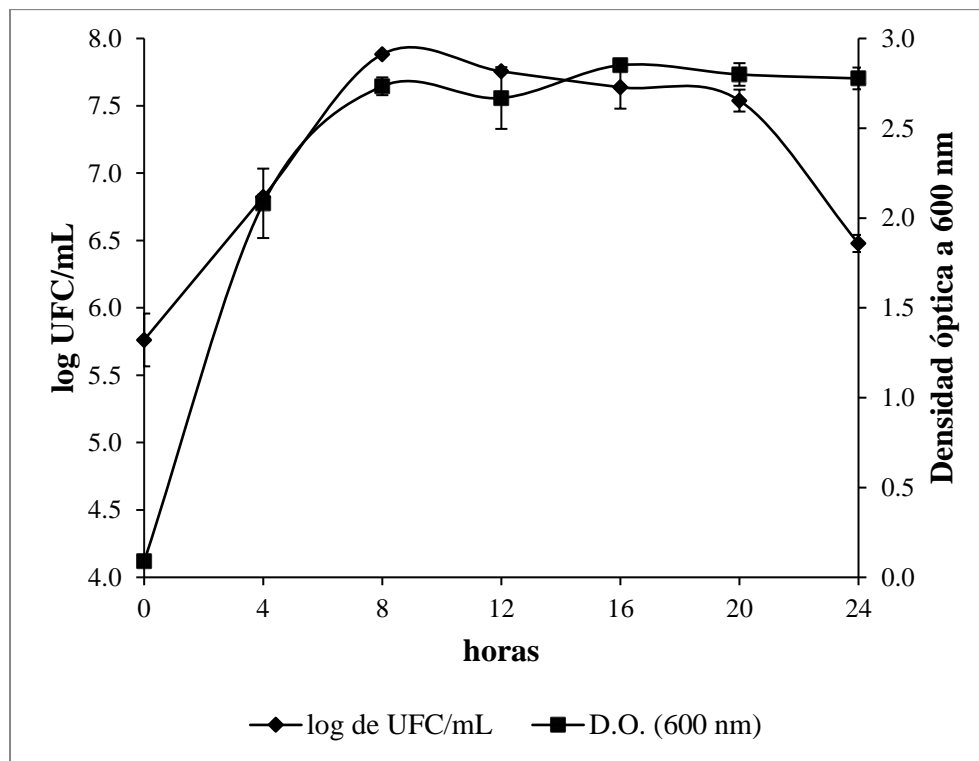


Figura 8. Cinética de crecimiento de *L. murinus* 26B1, log UFC/mL y $DO_{\lambda 600 \text{ nm}}$

Las medias de log UFC/mL (cuadro 5) y $DO_{\lambda 600 \text{ nm}}$ (cuadro 7) en los diferentes tiempos de cultivos de *L. murinus* fueron analizados mediante un ANOVA simple (cuadro 6 y 8, respectivamente).

Cuadro 5. Resumen estadístico para log UFC/mL de los diferentes cultivos (h) de *L. murinus* 26B1

Cultivos (horas)	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
0	5.74	0.196	0.41%
4	6.82	0.015	0.22%
8	7.88	0.006	0.07%
12	7.75	0.006	0.07%
16	7.62	0.159	0.08%
20	7.53	0.081	1.08%
24	6.47	0.064	0.98%

3 réplicas ($n=3$)

Cuadro 6. Resultados del ANOVA para log UFC/mL de los diferentes cultivos (h) de *L. murinus* 26B1

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor P
Entre grupos	11.47	6	1.912	179.43	0.0000
Intra grupos	0.15	14	0.011		
Total (Corr.)	11.62	20			

Cuadro 7. Resumen estadístico para $DO_{\lambda 600 \text{ nm}}$ de los diferentes cultivos (h) de *L. murinus* 26B1

Cultivos (horas)	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
0	0.079	0.002	2.531%
4	2.082	0.193	9.276%
8	2.734	0.049	1.802%
12	2.668	0.172	6.450%
16	2.851	0.025	0.894%
20	2.799	0.063	2.248%
24	2.777	0.060	2.173%

3 réplicas ($n=3$)

Cuadro 8. Resultados del ANOVA para $DO_{\lambda 600 \text{ nm}}$ de los diferentes cultivos (h) de *L. murinus* 26B1

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor P
Entre grupos	18.252	6	3.042	274.31	0.0000
Intra grupos	0.155	14	0.011		
Total (Corr.)	18.408	20			

Ya que el valor de P es menor que 0.05, en ambos análisis ANOVA, esto implica que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre las medias de log UFC/mL o las medias de $DO_{\lambda 600 \text{ nm}}$ de los diferentes tiempos de cultivos (h), con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuales medias son significativamente diferentes una de otras, se utilizó la prueba de rangos de Tukey. Con un nivel del 95.0% de confianza se indica que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre las medias de log UFC/mL o las medias de $DO_{\lambda 600 \text{ nm}}$ de los diferentes tiempos de cultivos (h) de *L. murinus* de 8, 12, 16, 20 y 24 horas.

Mientras que en la cinética de crecimiento de *S. aureus* ATCC 6538p, se observó que la fase exponencial comprende de las 2 h a las 5 h (7.55 a 8.65 log UFC/mL y $DO_{\lambda 600 \text{ nm}}$ 0.26 a 1.88, respectivamente). Los parámetros cinéticos fueron determinados, obteniendo una tasa de crecimiento de $\mu = 0.861 \text{ h}^{-1}$, un tiempo de duplicación de $t_d = 0.805 \text{ h}$ y número de generaciones $n = 6$; y la fase estacionaria de las 5 h en adelante, esto cuando se observan tanto log UFC/mL como $DO_{\lambda 600 \text{ nm}}$ (figura 9).

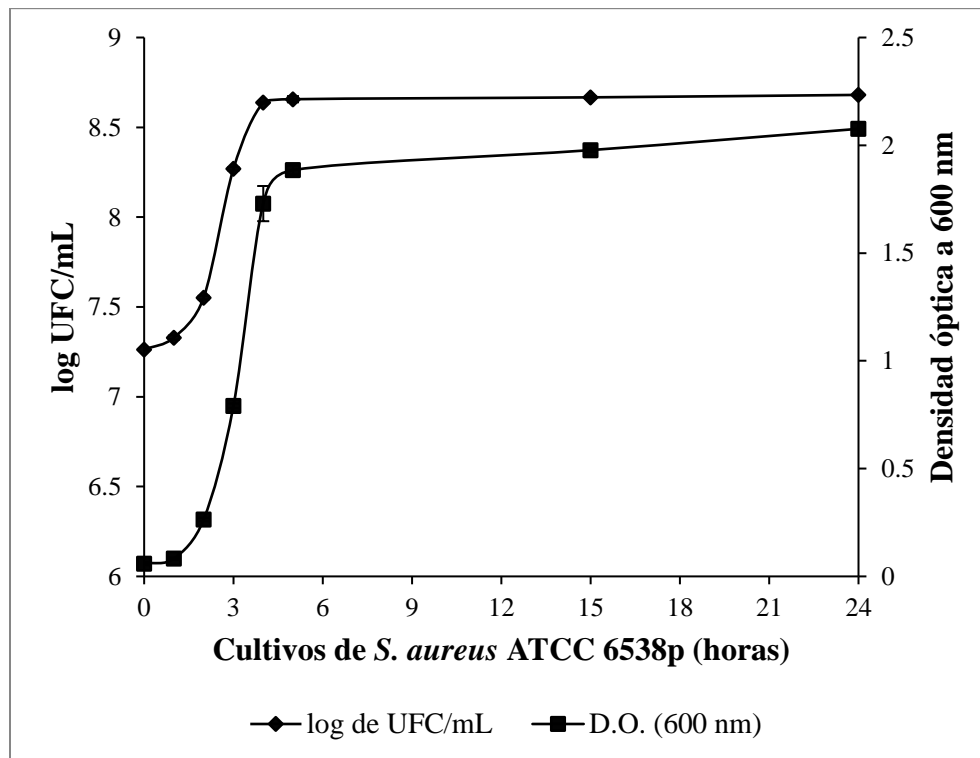


Figura 9. Cinética de crecimiento de *S. aureus*, log UFC/mL y $DO_{\lambda 600 \text{ nm}}$

Los resultados de la cinética de *S. aureus* ATCC 6538p fueron similares a los obtenidos por Llorente (1998); log UFC/mL (cuadro 9) y $DO_{\lambda 600 \text{ nm}}$ (cuadro 11) de los diferentes tiempos de cultivos (h) correspondientes a la cinética de *S. aureus* fueron analizados mediante ANOVA simple (cuadro 10 y 12, respectivamente).

Cuadro 9. Resumen estadístico para log UFC/mL de los diferentes cultivos (h) de *S. aureus* ATCC 6538p

Cultivos (horas)	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
0	7.26	0.006	0.08%
1	7.32	0.012	0.16%
2	7.55	0.010	0.13%
3	8.27	0.010	0.12%
4	8.63	0.006	0.07%
5	8.66	0.017	0.20%
15	8.66	0.006	0.07%
24	8.68	0.006	0.07%

3 réplicas ($n=3$)

Cuadro 10. Resultados del ANOVA para log UFC/mL de los diferentes cultivos (h) de *S. aureus* ATCC 6538p

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor P
Entre grupos	8.635	7	1.23362	12872.52	0.0000
Intra grupos	0.002	16	0.0000958		
Total (Corr.)	8.64	23			

Cuadro 11. Resumen estadístico para $DO_{\lambda 600 \text{ nm}}$ de los diferentes cultivos (h) de *S. aureus* ATCC 6538p

Cultivos (horas)	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
0	0.060	0.007	12.58%
1	0.083	0.005	6.08%
2	0.264	0.007	2.86%
3	0.791	0.011	1.39%
4	1.729	0.081	4.70%
5	1.885	0.021	1.10%
15	1.978	0.007	0.40%
24	2.076	0.027	1.33%

3 réplicas ($n=3$)

Cuadro 12. Resultados del ANOVA para $DO_{\lambda 600\text{ nm}}$ de los diferentes cultivos (h) de *S. aureus* ATCC 6538p

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor P
Entre grupos	16.939	7	2.419	2371.63	0.0000
Intra grupos	0.016	16	0.00102038		
Total (Corr.)	16.956	23			

Ya que el valor de P es menor que 0.05, en ambos ANOVA, esto implica que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre las medias de log UFC/mL o las medias de $DO_{\lambda 600\text{ nm}}$ de los diferentes tiempos de cultivos (h), con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes una de otras, se utilizó la prueba de rangos de Tukey. Con un nivel del 95.0% de confianza se indica que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las medias de log UFC/mL o las medias de $DO_{\lambda 600\text{ nm}}$ de los diferentes cultivos (h) de *S. aureus*, a excepción de 5, 15 y 24 horas, tiempos en los que no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) en las medias de log UFC/mL o $DO_{\lambda 600\text{ nm}}$.

Cabe mencionar que la importancia de obtener las cinéticas de crecimiento tanto de *L. murinus* 26B1 como de *S. aureus* ATCC 6538 (microorganismo indicador) radicó en la obtención de sus respectivas células viables y/o sobrenadantes de cultivos (solo para el caso de *L. murinus*) en fase logarítmica, fase en la cual diversos autores han determinado que las bacterias tienen mayor actividad metabólica y por consiguiente mayor producción de metabolitos con espectro antimicrobiano (ácidos orgánicos, proteínas, enzimas líticas, etc.) (Santos *et al.*, 2005; Waldir *et al.*, 2007; Álvarez y Sánchez, 2016).

3.2. Perfil de fermentación de carbohidratos de *L. murinus* 26B1

La caracterización microbiológica de la cepa aislada seleccionada incluyó la realización del perfil de fermentación de carbohidratos como prueba bioquímica, para obtener una presuntiva del género y especie, de la cepa en estudio. Los resultados obtenidos para la cepa *L. murinus* 26B1 son similares a los descritos por Galindo (2004) y Pulido *et al.*, (2007), quienes demostraron que *L. plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. brevis*, *L. pentosus* y *L. fermentum* fermentan glucosa, fructosa, manosa, sorbitol, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, sacarosa y rafinosa, mientras que no fermentan glicerol, eritrol, dulcitol,

inocitol. Mediante el perfil de fermentación de carbohidratos a las 24 h (figura 10a) la cepa estudiada se identificó como *L. lactis* spp. con un porcentaje de identidad del 83.6%, mientras que a la 48 h (figura 10b) señala un perfil correspondiente a *L. brevis* con un porcentaje de identidad del 27.3%. El análisis de fermentación de carbohidratos reveló la actividad metabólica de *L. murinus* 26B1, recalcando que su identificación de *Ligilactobacillus murinus* a nivel especie se realizó mediante PCR.

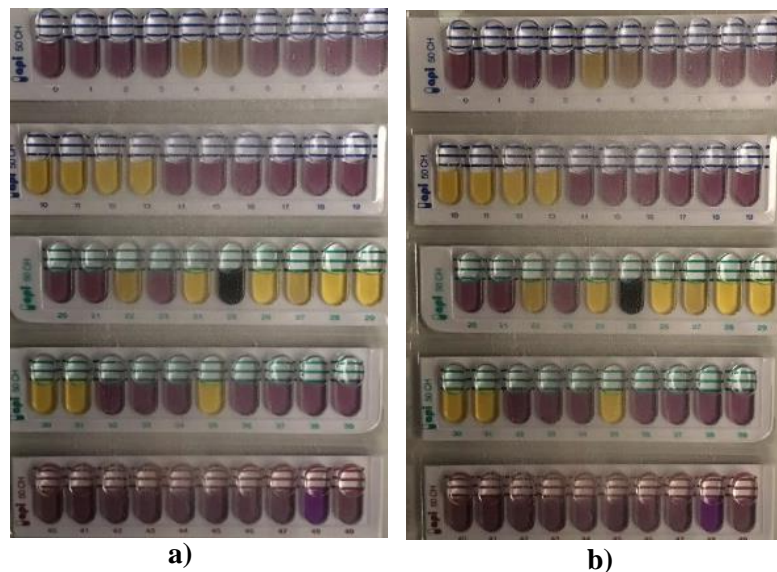


Figura 10. Resultados del perfil de fermentación de carbohidratos de *L. murinus* 26B1 a) a las 24 h y b) a las 48 h, Sistema API®50CH

3.3. Evaluación del potencial antagonístico de *L. murinus* 26B1 mediante ensayos de inhibición en agar

La actividad antimicrobiana de los diferentes tratamientos de las células y sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* concentrados 10X de 4, 8, 12, 16 y 20 horas, fue evidenciada a través de la formación de halos de inhibición del crecimiento de *S. aureus* ATCC 6538p (cuadro 13). Se observaron halos de inhibición de crecimiento alrededor de la gota de hasta 9 mm (figura 11) en aquellas condiciones en las que las células de la cepa de BAL en estudio permanecían viables sin ser dañadas (cuadro 13, figura 11, condiciones 1 y 2). Por el contrario, no se observó inhibición cuando se utilizaron células lisadas o sobrenadantes libres de células (no tratados o calentado y neutralizado).

Sánchez y Peña (2016), evaluaron la capacidad antagonística *in vitro* por difusión sobre capas de agar de cepas de *Lactobacillus* spp. frente a cepas indicadoras patógenas productores de mastitis bovina, obtuvieron halos de inhibición de 10.03 ± 0.02 hasta 31 ± 0.03 mm para el caso

de *S. aureus* ATCC 6538, 10.5 ± 0.02 hasta 37.6 ± 0.06 mm para el caso de *S. aureus* ATCC® 25923, 14.5 ± 0.05 hasta 30.8 ± 0.015 mm para el caso de *S. agalactiae*, 345 y 6.5 ± 0.02 hasta 50.5 ± 0.02 mm para el caso de *S. chromogenes*. Las 6 cepas de *Lactobacillus spp.* produjeron ácido láctico en concentraciones de 1.02 ± 0.07 a 2.5 ± 0.04 g/L. Resulta relevante que para la cepa *L. murinus* 26B1 el valor de inhibición está por encima de algunos valores de dicha referencia.

Cuadro 13. Actividad inhibitoria de *L. murinus* 26B1 sobre *S. aureus* ATCC 6538p

Tratamientos del cultivo de <i>L. murinus</i>	Hora de cultivo				
	4	8	12	16	20
1. Células viables	+	+	+	+	-
2. Células viables en solución salina	+	+	+	+	-
3. Células viables en H ₂ O _d y calentadas (97°C)	-	-	-	-	-
4. Células con pared dañada	-	-	-	-	-
5. Sobrenadante libre de células	-	-	-	-	-
6. Sobrenadante neutralizado, filtrado y calentado (97°C)	-	-	-	-	-
7. Ácido láctico 2%	-	-	-	-	-

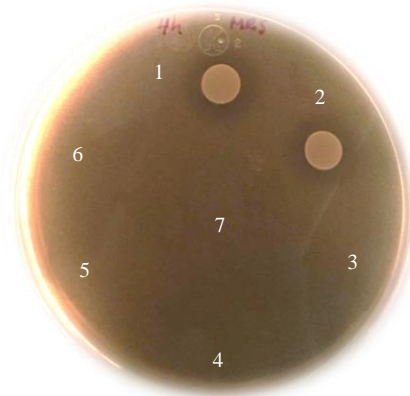


Figura 11. Ensayo de inhibición en placa de cultivos de *L. murinus* 26B1 en fase logarítmica frente a *S. aureus* ATCC 6538p

1) Células viables; 2) Células en solución salina fisiológica; 3) Células en agua destilada, calentada a 97°C por 15 min; 4) Células tratadas con lisozima (1 mg/mL); 5) Sobrenadante

libre de células 10X sin tratar; 6) Sobrenadante libre de células 10X neutralizado, filtrado y calentado a 97°C por 5 min; 7) Solución de ácido láctico al 2%.

3.4. Caracterización de los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1

3.4.1. Cuantificación del contenido proteico de los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 (10X) mediante el microensayo de Bradford (1976)

El contenido proteico de sobrenadante de cultivos de *L. murinus* 26B1 de 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas (10X) fue determinado. La curva estándar que se determinó en paralelo permitió establecer la ecuación de regresión: $y = 0.0691x + 0.0774$ ($r^2 = 0.9746$) donde x = concentración de BSA, y = absorbancia (figura 23, anexo 6). La concentración de proteínas de los diferentes sobrenadantes de *L. murinus* 26B1 está comprendida entre 1.49 ± 0.010 y 2.19 ± 0.026 mg/mL (cuadro 14).

Cuadro 14. Contenido proteico en los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 (10X) neutralizados y filtrados

Sobrenadantes de cultivos de <i>L. murinus</i> (10X)	Concentración proteínas (mg/mL)
MRS	1.49 ± 0.010
0 h	1.56 ± 0.012
4 h	1.86 ± 0.021
8 h	1.99 ± 0.002
12 h	2.00 ± 0.017
16 h	2.04 ± 0.035
20 h	2.14 ± 0.021
24 h	2.19 ± 0.026

El cuadro 15 resume los resultados que se obtuvieron cuando se compararon mediante un ANOVA simple, las concentraciones de proteínas contenidas en los sobrenadantes de los diferentes tiempos (h) de cultivos de *L. murinus* 26B1 (10X), correspondientes a la cinética de crecimiento. Ya que el valor de P es menor que 0.05 (cuadro 16), esto implica que el tiempo de cultivo de *L. murinus* 26B1 influye de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$) sobre la concentración de proteínas (mg/mL) que se obtiene. Para determinar cuales medias son significativamente diferentes una de otras, se utilizó la prueba de rangos de Tukey. Con un nivel del 95.0% de confianza se indica que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la concentración de proteínas contenidas en el

medio MRS y en los sobrenadantes de un tiempo de cultivo y otro, a excepción de los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* de 8, 12 y 16 horas ($p>0.05$), sobrenadantes que corresponden a la fase estacionaria de la cinética de crecimiento de *L. murinus* 26B1.

Cuadro 15. Resumen estadístico para la concentración de proteínas contenidas en los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1

Cultivos (horas)	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
MRS	1.49	0.010	0.671%
0	1.56	0.012	0.741%
4	1.86	0.021	1.121%
8	1.99	0.002	0.006%
12	2.00	0.017	0.866%
16	2.04	0.035	1.698%
20	2.14	0.021	0.974%
24	2.19	0.026	1.208%

3 réplicas ($n=3$)

Cuadro 16. Resultados del ANOVA para la concentración de proteínas contenidas en los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1

Fuente	Suma de Cuadrados	<i>gl</i>	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor P
Entre grupos	1.395	7	0.199	483.34	0.0000
Intra grupos	0.006	16	0.00041		
Total (Corr.)	1.402	23			

3.4.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de cultivo de *L. murinus* 26B1 concentrados 10X

Se eligió una técnica más sensible para explorar el efecto inhibitorio. La prueba de dilución en agar (Piddock, 1990; Llorente. 1998; NCCLS, 2005; Blanco *et al.*, 2016) permitió obtener la concentración inhibitoria mínima (CIM) de proteínas contenidas en sobrenadantes de cultivo de *L. murinus* 26B1 (neutralizados y concentrados por precipitación de proteínas con Metanol-Cloroformo) 10X en fase logarítmica temprana y tardía frente a *S. aureus* ATCC 6538p, el medio MRS estéril concentrado 10X fue utilizado como control negativo. Para proporcionar mayor sensibilidad a la técnica se formaron pozos con penicilindros de 6 mm de diámetro, en los cuales se agregaron 200 μ L del sobrenadante y de cada una de las diluciones dobles seriadas que contienen las diferentes concentraciones de proteínas (0.011 a 0.398 mg/mL) de los sobrenadantes, concentraciones mucho mayores a la utilizada en el método difusión en agar (0.007 a 0.01 mg/mL, contenidas en los 5 μ L de la gota sembrada) antes utilizado. Las diluciones permitieron observar que el halo de inhibición fue

disminuyendo en tamaño, al utilizar una dilución mayor hasta no presentar halo. De manera que la CIM resultante en fase logarítmica fue 0.186 mg/mL (zona de inhibición de 12.23±0.025 mm) y la correspondiente en fase tardía fue 0.199 mg/mL (zona de inhibición de 12.84±0.038 mm) (cuadro 17).

Cuadro 17. Resumen estadístico para los halos de inhibición (mm) de *S. aureus* ATCC 6538p producidos por los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 (10X)

Fila	Concentración de proteínas (mg/mL)	Halos de inhibición (mm)	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
Medio MRS estéril 10X	0.298	8.07	0.115	1.431%
Sobrenadantes fase log temprana 10X	0.372	12.81	0.006	0.045%
Sobrenadantes fase log temprana 10X-1:2	0.186	12.23	0.025	0.206%
Sobrenadantes fase log tardía 10X	0.398	13.81	0.026	0.192%
Sobrenadantes fase log tardía 10X-1:2	0.199	12.84	0.038	0.295%

3 réplicas ($n=3$)

Cuadro 18. Resultados del ANOVA para los halos de inhibición (mm) de *S. aureus* ATCC 6538p producidos por los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor P
Entre grupos	60.4794	4	15.1198	4685.90	0.0000
Intra grupos	0.0322667	10	0.00322667		
Total (Corr.)	60.5116	14			

En el cuadro 18 se observa que $p < 0.05$, lo que indica que hay diferencias significativas entre la media de los halos de inhibición (mm) entre un nivel de tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Al comparar las medias con la prueba de rangos de Tukey, se determinó que los halos de inhibición producidos por concentraciones de proteínas de 0.372 y 0.199 mg/mL, no son significativamente diferentes, en comparación con los demás.

Se observó que el control negativo, el medio MRS estéril 10X (0.298 mg de proteínas) generó un ligero efecto inhibitorio sobre *S. aureus* al formar zonas de inhibición de hasta 8.07±0.115

mm. Se ha reportado que algunas de las sustancias que componen a este medio (acetato de sodio, Tween 80 y el ascorbato de sodio) ejercen un efecto inhibitorio sobre bacterias patógenas como *P. aeruginosa* (Abbas *et al.*, 2012; Toutain-Kidd *et al.*, 2009).

3.4.3. Cinética de inhibición de *S. aureus* ATCC 6538p en caldo BHI con proteínas de sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1

Cabe mencionar que adicionalmente se utilizó la técnica de cinética de inhibición, para evaluar la susceptibilidad de *S. aureus* ATCC 6538p frente a las proteínas contenidas en los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 en fase logarítmica temprana y tardía. Se utilizaron concentraciones conocidas de proteínas para obtener así la CIM de los sobrenadantes en dichas fases y la inhibición en log UFC/mL de *S. aureus*. Se desafiaron 40, 80, 120 y 160 μ L de sobrenadante de *L. murinus* 26B1 concentrado 10X de cultivos en fase logarítmica temprana, equivalentes a 0.07, 0.14, 0.22 y 0.30 mg de proteínas y del sobrenadante de cultivo en fase logarítmica tardía, equivalentes a 0.08, 0.16, 0.24 y 0.32 mg de proteínas, contenidas en dichos volúmenes, respectivamente (figura 12), con 4 log UFC/mL de *S. aureus*. Por cuenta en placa se cuantificaron las células viables a las 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 24 horas; los resultados obtenidos fueron graficados para su análisis. Mediante el procedimiento ANOVA Multifactorial se determinó el impacto que tiene el tiempo de muestreo y la concentración de proteínas contenidas en los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 en fase logarítmica temprana y tardía, sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 6538p en caldo BHI.

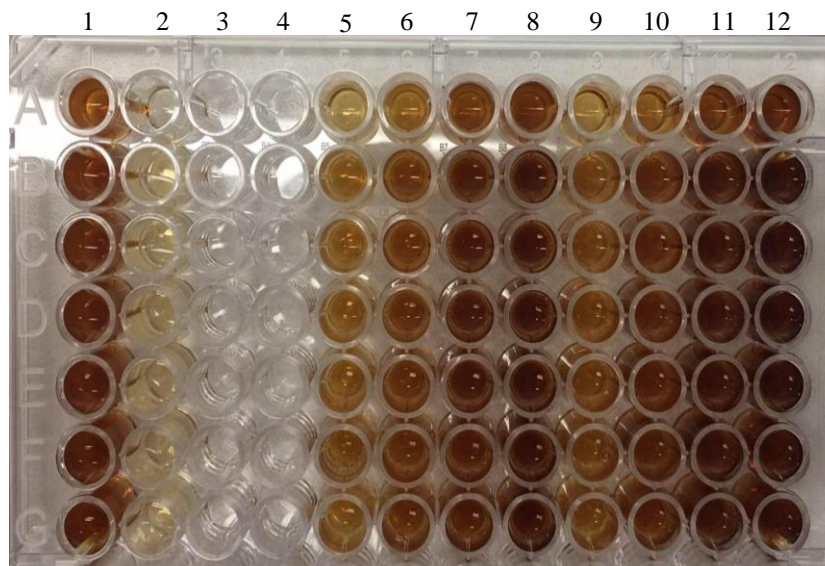


Figura 12. Método microdilución en caldo

1(A-G): Control negativo (medio MRS estéril 10X más *S. aureus* en fase logarítmica (cultivo de 2 h); 2(A-G): Control positivo (células viables de *S. aureus* ATCC 6538p en BHI); 5, 6, 7, 8 (A-G): 0.07, 0.14, 0.22 y 0.30 mg de proteínas de sobrenadantes de cultivos 10X en fase logarítmica temprana, más *S. aureus* en fase logarítmica (cultivo de 2 h), respectivamente; 9, 10, 11, 12 (A-G): 0.08, 0.16, 0.24 y 0.32 mg de proteínas de sobrenadantes de cultivos 10X en fase logarítmica tardía, más *S. aureus* en fase logarítmica (cultivo de 2 h), respectivamente.

En la figura 13 se observa que *S. aureus* ATCC 6538p en BHI tuvo un crecimiento a las 24 h de 11.79 log UFC/mL. Mientras que al desafiarlo con el medio MRS 10X (control negativo), *S. aureus* presentó un crecimiento de hasta 11.39 log UFC/mL a las 24 h. Cabe mencionar que al adicionar sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 de 4 h (fase logarítmica temprana) hubo una disminución de 2.49, 3.00 y 3.86 log UFC/mL en el crecimiento de *S. aureus* ATCC 6538p cuando se adicionó 0.07, 0.14 y 0.22 mg/mL (respectivamente) de proteínas de sobrenadantes de cultivos 10X en fase logarítmica temprana (4 h). Mientras que al adicionar 0.30 mg/mL de proteínas se observa una inhibición de 4.81 log UFC/mL en el crecimiento del microorganismo indicador a las 24 h de incubación a 35°C.

En el cuadro 19 se observa que los 3 valores de P son menores que 0.05, lo que prueba que los factores evaluados (tiempo de muestreo y mezcla) tienen un efecto estadísticamente significativo sobre los logaritmos de UFC/mL. Al comparar log UFC/mL promedios obtenidos en los diferentes tiempos de muestreo y al utilizar las diferentes concentraciones de proteínas de sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 en fase logarítmica temprana, incluso en la interacción de los diferentes niveles de cada factor se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95.0% de confianza. Al comparar las medias con la prueba de rangos de Tukey, se determinó que no hay diferencias significativas entre log de UFC/mL promedio de *S. aureus* con y sin el medio MRS, entre concentraciones de proteínas de 0.14 y 0.22 mg/mL y entre concentraciones de proteínas de 0.22 y 0.30 mg/mL.

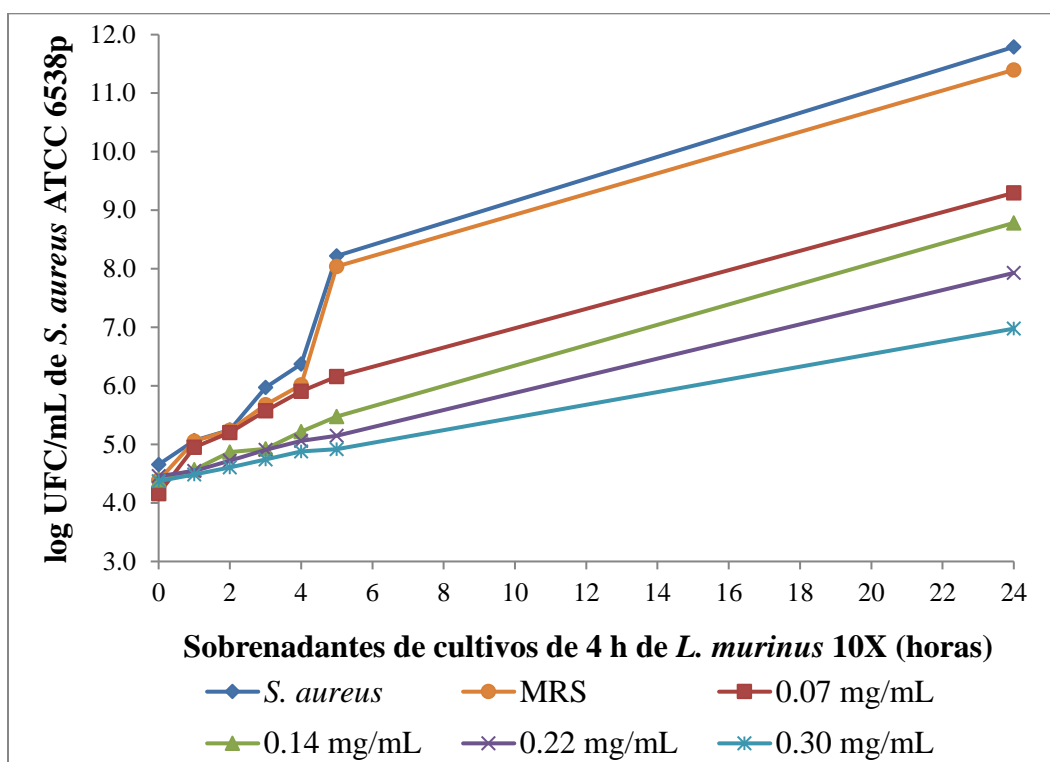


Figura 13. Curva de inhibición de *S. aureus* ATCC 6538p frente a proteínas contenidas en los sobrenadantes 10X de cultivos de *L. murinus* 26B1 en fase logarítmica temprana

Células viables: *S. aureus* ATCC 6538p en BHI; Control negativo: MRS 10X más *S. aureus*; proteínas de sobrenadantes de cultivos en fase logarítmica temprana (0.07, 0.14, 0.22 y 0.30 mg/mL).

Cuadro 19. Resultados del ANOVA para log UFC/mL de *S. aureus* ATCC 6538p en presencia de proteínas de sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 en fase logarítmica temprana

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tiempo de muestreo	54.9306	5	10.9861	51.60	0.0000
B: Mezcla	302.587	6	50.4312	236.88	0.0000
INTERACCIONES					
AB	45.2121	30	1.50707	7.08	0.0000
RESIDUOS	17.8833	84	0.212896		
TOTAL (Corr.)	420.613	125			

Factor A: Tiempo de muestreo. Niveles: 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 24 horas.

Factor B: Mezclas. Niveles: MRS, 0.07, 0.14, 0.22 y 0.30 mg de proteínas + *S. aureus*.

En la figura 14 se observa que *S. aureus* ATCC 6538p en BHI tuvo un crecimiento a las 24 h de 12.05 logaritmos de UFC/mL. Mientras que al desafiarlo con el medio MRS 10X (control negativo), *S. aureus* presentó un crecimiento de hasta 11.75 logaritmos de UFC/mL a las 24 h. Cabe mencionar que al adicionar sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 de 8 h (fase logarítmica tardía) se observó un efecto inhibitorio de 3.31, 3.58 y 4.94 log UFC/mL en el crecimiento de *S. aureus* ATCC 6538p cuando se adicionó 0.08, 0.16 y 0.24 mg/mL (respectivamente) de proteínas de sobrenadantes de cultivos 10X en fase logarítmica tardía. Mientras que al adicionar 0.32 mg/mL de proteínas de dicho cultivo, se observa una inhibición de 5.77 logaritmos en el crecimiento del microorganismo indicador a las 24 h de incubación a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Además, se registró un efecto bacteriostático del sobrenadante de cultivo de *L. murinus* 26B1 en fase logarítmica tardía (0.32 mg) durante las primeras 5 h de incubación a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, ya que la concentración del inóculo inicial (4 log UFC/mL) de *S. aureus* se mantuvo, alcanzando un crecimiento de 6.27 logaritmos de UFC/mL a las 24 h.

En el cuadro 20 se observa que los 3 valores de P son menores que 0.05, lo que prueba que los factores evaluados tienen un efecto estadísticamente significativo sobre los logaritmos de UFC/mL.

Se observó un comportamiento diferente en el crecimiento de *S. aureus* ATCC 6538p en BHI cuando se desafía con sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* en fase logarítmica temprana y tardía (figura 13 y 14), estos sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 presentaron perfiles electroforéticos diferentes, lo que explica que esta inhibición puede deberse a distintas proteínas secretadas en las diferentes fases de crecimiento. La CIM en este ensayo es definida como la concentración más baja de proteínas contenidas en los sobrenadantes de cultivo de *L. murinus* 26B1 en fase logarítmica temprana y tardía, que redujo significativamente log UFC/mL de *S. aureus* ATCC 6538p en caldo BHI a las 24 horas de incubación a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. De acuerdo con los resultados de las cinéticas de inhibición, con los sobrenadantes de en fase logarítmica temprana y tardía se obtuvieron CIM de 0.07 y 0.08 mg/mL con reducción de 2.49 y 3.31 log UFC/mL de *S. aureus*, respectivamente, a las 24 h de incubación a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$.

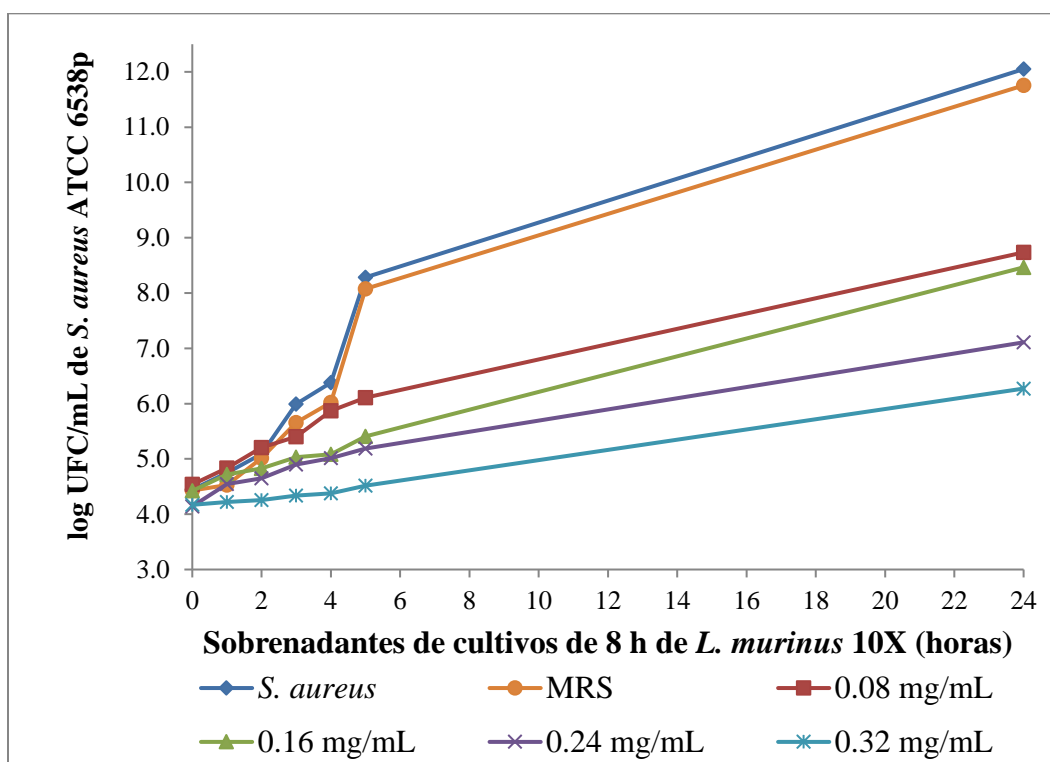


Figura 14. Curva de inhibición de *S. aureus* ATCC 6538p frente a proteínas contenidas en los sobrenadantes 10X de cultivos de *L. murinus* 26B1 en fase logarítmica tardía

Células viables: *S. aureus* ATCC 6538p en BHI; Control negativo: MRS 10X más *S. aureus*; Proteínas de sobrenadantes de cultivos en fase logarítmica tardía (0.08, 0.16, 0.24 y 0.32 mg/mL).

Cuadro 20. Resultados del ANOVA para log UFC/mL de *S. aureus* ATCC 6538p en presencia de proteínas de sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 en fase logarítmica tardía

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tiempo de muestreo	281.218	6	46.8697	310.22	0.0000
B: Mezcla	70.346	5	14.0692	93.12	0.0000
INTERACCIONES					
AB	67.1717	30	2.23906	14.82	0.0000
RESIDUOS	12.6914	84	0.151088		
TOTAL (Corr.)	431.427	125			

Factor A: Tiempo de muestreo. Niveles: 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 24 horas.

Factor B: Mezclas. Niveles: MRS, 0.08, 0.16, 0.24 y 0.32 mg de proteínas + *S. aureus*.

Al comparar los logaritmos de UFC/mL promedios obtenidos en los diferentes tiempos de muestreo y al utilizar las diferentes concentraciones de proteínas de sobrenadantes de cultivos

de *L. murinus* 26B1 en fase logarítmica tardía, incluso en la interacción de los diferentes niveles de cada factor se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95.0% de confianza. Al comparar las medias con la prueba de rangos de Tukey, se determinó que no hay diferencias significativas ($p>0.05$) entre los logaritmos de UFC/mL promedio de *S. aureus* (células viables) y éste en presencia con el medio MRS, en cambio cada uno de estos tratamientos en comparación con los demás presentan diferencias significativas ($p<0.05$).

Chen *et al.*, (2020), investigaron la capacidad antimicrobiana de sobrenadantes de cultivos de *Lactobacillus spp.* contra *Enterobacterias*, mediante el método de microdilución en caldo. Compararon el porcentaje de inhibición con los logaritmos de UFC/mL del cultivo original de cada cepa de *Enterobacterias*. Utilizaron diferentes concentraciones de sobrenadantes de cultivos de *Lactobacillus spp.* (3.13, 6.25, 12.5, 25, 50%, %v/v diluido con medio MRS estéril). Determinaron que los sobrenadantes al 12.5, 25 y 50%, eran capaces de inhibir el crecimiento de las *Enterobacterias* en un 45 a 100%. Por otro lado, en el presente estudio se determinó que los sobrenadantes en fase logarítmica temprana o tardía, logran reducir en un 21 a 47.9% el crecimiento de *S. aureus* a las 24 h de incubación a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Por lo anterior se sugiere la utilidad potencial de la cepa de *L. murinus* para inhibir *S. aureus* ATCC 6538p.

3.4.4. Perfil electroforético de los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1

Tras evidenciar el efecto antagónico de los sobrenadantes de cultivo de *L. murinus* 26B1 en fase logarítmica frente a *S. aureus*, se continuo con el estudio del potencial lítico de la cepa láctica. Para ello, se caracterizó el perfil electroforético de sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 para evidenciar la producción y cantidad de proteínas en todas las etapas del crecimiento. Los geles escaneados (figura 15) hicieron posible la visualización de las bandas correspondientes a las proteínas contenidas en el sobrenadante de *L. murinus* 26B1. En el cuadro 21, se observa que, en los sobrenadantes de 4 a 24 horas hay diferentes bandas en comparación con el cultivo de 0 horas y el medio MRS (control negativo), las cuales se producen en concentraciones distintas durante las distintas fases del crecimiento evaluado, por lo que la producción de estas proteínas tiene una relación proporcional al tiempo de incubación de cada cultivo de *L. murinus*.

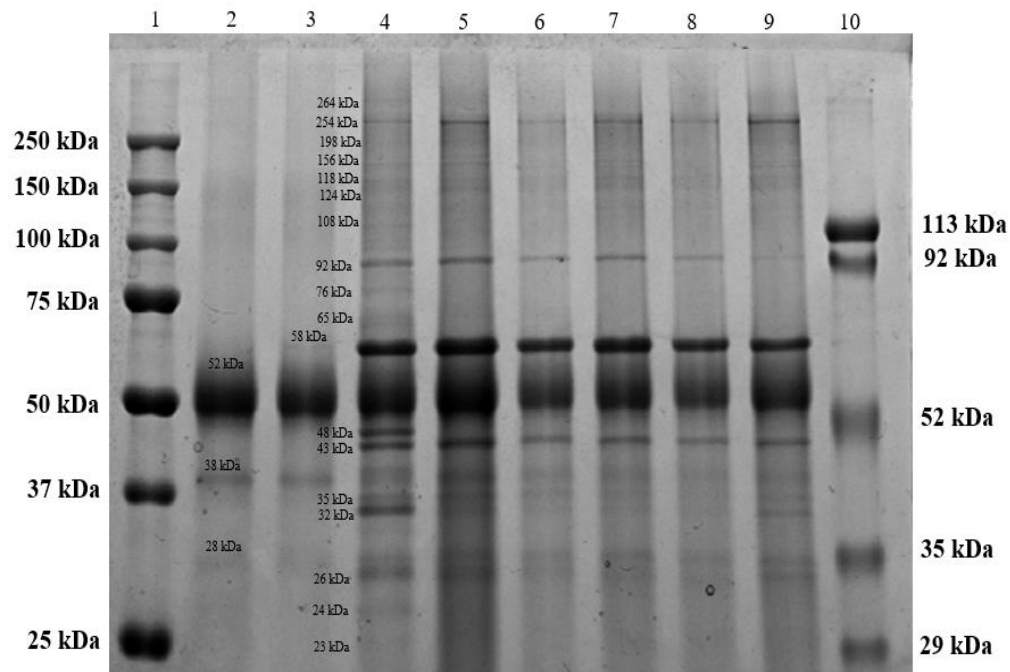


Figura 15. Perfil electroforético de los sobrenadantes de *L. murinus* 26B1 SDS-PAGE (12% T, 3.3% C) 1 mm, tinción azul de Coomassie

Carriles del gel: 1) MPM: Precision Plus, ProteinTM Standards, All Blue, Bio-Rad. 2) Medio MRS (10X). 3) Sobrenadante de cultivo de *L. murinus* de 0 h 10X. 4) Sobrenadante de cultivo de *L. murinus* de 4 h 10X (fase logarítmica temprana). 5) Sobrenadante de cultivo de *L. murinus* de 8 h 10X (fase logarítmica tardía). 6) Sobrenadante de cultivo de *L. murinus* de 12 h 10X. 7) Sobrenadante de cultivo de *L. murinus* de 16 h 10X. 8) Sobrenadante de cultivo de *L. murinus* de 20 h 10X. 9) Sobrenadante de cultivo de *L. murinus* de 24 h 10X. 10) MPM: SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range, Bio-Rad.

En el medio MRS estéril 10X y sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 de 0 horas, se observaron 3 y 4 bandas, respectivamente. Mientras que en los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 de 4 h (fase logarítmica temprana) se observó un perfil electroforético con 21 bandas proteicas, de las cuales 6 bandas fueron exclusivas de este cultivo a las 4 h de crecimiento. Por otro lado, en los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 de 8 h (fase logarítmica tardía) a 24 horas se observaron 15 bandas en común. Las bandas corresponden a péptidos de masas moleculares relativas entre 23 y 264 kDa (cuadro 21).

Cuadro 21. Masa molecular relativa de las bandas en los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 mediante SDS-PAGE (12% T, 3.3% C)

Masa Molecular (kDa)	Sobrenadantes del cultivo de <i>L. murinus</i>							
	MRS	0 h	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h
264±1.75			+					
254±0.46			+	+	+	+	+	+
198±0.56			+	+	+	+	+	+
156±1.46			+					
124±0.25			+	+	+	+	+	+
118±0.17			+					
108±0.43			+	+	+	+	+	+
92±0.53		+	+	+	+	+	+	+
76±0.30			+					
65±0.61			+					
58±0.80			+	+	+	+	+	+
52±0.58	+	+	+	+	+	+	+	+
48±0.30			+					
43±0.82			+	+	+	+	+	+
38±0.39	+	+	+	+	+	+	+	+
35±0.97			+	+	+	+	+	+
32±0.51			+	+	+	+	+	+
28±0.64	+	+	+	+	+	+	+	+
26±0.65			+	+	+	+	+	+
24±0.57			+	+	+	+	+	+
23±1.36			+	+	+	+	+	+

+: presencia de proteínas en el perfil electroforético; Medio MRS (10X); Masas moleculares relativas expresadas por los promedios (kDa); ± la desviación estándar; 3 réplicas ($n=3$)

El cuadro 22 resume los resultados que se encontraron cuando se compararon las masas moleculares relativos promedio de las diferentes proteínas contenidas en los sobrenadantes de cultivo de *L. murinus* 26B1, correspondientes a la cinética de crecimiento mediante el método Comparación de Varias Muestras.

Cuadro 22. Resumen estadístico para las masas moleculares relativas de las proteínas contenidas en los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1

Fila	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
Proteína 1	264.73	1.750	0.661%
Proteína 2	255.14	0.461	0.180%
Proteína 3	198.07	0.566	0.286%
Proteína 4	156.28	1.466	0.938%
Proteína 5	124.89	0.256	0.205%
Proteína 6	118.89	0.179	0.150%
Proteína 7	108.41	0.436	0.402%
Proteína 8	92.61	0.530	0.572%
Proteína 9	76.60	0.300	0.391%
Proteína 10	65.97	0.618	0.937%
Proteína 11	58.09	0.800	1.378%
Proteína 12	52.71	0.585	1.109%
Proteína 13	48.35	0.302	0.625%
Proteína 14	43.05	0.819	1.904%
Proteína 15	38.03	0.392	1.030%
Proteína 16	35.41	0.975	2.754%
Proteína 17	32.74	0.517	1.579%
Proteína 18	28.64	0.643	2.247%
Proteína 19	26.67	0.650	2.437%
Proteína 20	24.07	0.572	2.374%
Proteína 21	23.66	1.363	6.016%

3 réplicas ($n=3$)

Puesto que el valor de P es menor a 0.05 (cuadro 23), esto implica que existen diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) entre la cantidad de proteínas secretadas en los diferentes tiempos de cultivos de *L. murinus* 26B1. Mediante la prueba de rangos de Tukey se determinó que la cantidad de proteínas secretadas durante el cultivo de *L. murinus* 26B1 en fase logarítmica temprana (4 h) 10X (21 proteínas encontradas), fue significativamente diferente con respecto del medio MRS 10X (3 proteínas encontradas) y el cultivo de *L. murinus* 26B1 en fase logarítmica tardía (8 h) 10X (15 proteínas encontradas), así mismo cuando se analizaron respecto a las proteínas secretadas en la fase estacionaria (12 a 24 horas 10X; 15 proteínas encontradas), en estos últimos cultivos la cantidad de proteínas secretadas no fue significativamente diferente.

Cuadro 23. Resultados del ANOVA para las masas moleculares relativas de las proteínas contenidas en los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor P
Entre grupos	326934	20	16346.7	26566.19	0.0000
Intra grupos	25.8434	42	0.615319		
Total (Corr.)	326959	62			

Después de analizar los perfiles proteicos se determinó que los sobrenadantes de cultivo de *L. murinus* en fase logarítmica temprana y tardía presentan diferentes tipos de perfiles electroforéticos (figura 15). Estos resultados difieren de los obtenidos por Munguía (2015), quien analizó que los perfiles electroforéticos de sobrenadantes de *P. acidilactici* ATCC 8042 en cada fase de crecimiento, el identificó 8 bandas proteicas a las 4 h, 17 bandas a las 8 h y hasta 37 bandas proteicas durante la fase estacionaria (12, 16 y 24 h). Generalmente, el contenido proteico está constituido por proteínas secretadas al medio, así como proteínas intracelulares liberadas luego de la lisis bacteriana. Existe evidencia que la producción de péptidos en BAL, a menudo está regulada por la temperatura y la cantidad limitante de glucosa, nitrógeno y vitaminas presentes en el medio de cultivo (Todorov *et al.*, 2013). En este trabajo a las 4 horas (fase logarítmica temprana) se tuvo la mayor cantidad de proteínas secretadas por *L. murinus* 26B1 (figura 15), así como reportan otros autores para distintas cepas de BAL (Santos *et al.*, 2005; Waldir *et al.*, 2007; Álvarez y Sánchez, 2016).

3.4.5. Actividad lítica de los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 mediante zimografía *in situ*

Los sistemas enzimáticos son comunes en las BAL, entre los que resaltan aquéllos con actividad bacteriolítica. En este sentido, Llorente *et al.*, (2008) evaluaron la presencia de enzimas con actividad lítica en *P. acidilactici* ATCC 8042. Los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados durante la fase logarítmica y mostraron actividad lítica en geles copolimerizados con células de *M. lysodeikticus* ATCC 4698 (SDS-PAGE), que al ser renaturalizado permitió la detección de una banda con actividad lítica que migraba aproximadamente a 110 kDa. Por tal motivo, en el presente estudio, las células de *M. lysodeikticus* fueron utilizadas como sustrato (control positivo). 30 µg/µL de proteínas fueron cargadas en cada carril del gel co-polimerizado y sometidas a SDS-PAGE. Una vez que las proteínas resueltas en el gel fueron renaturalizadas (Tritón al 1%), la actividad antibacteriana de las proteínas con actividad lítica sobre *S. aureus* ATCC 6538p se observó mediante bandas

traslúcidas. Se observó la actividad lítica de una proteína de masa molecular relativa de 109.51 ± 1.72 kDa contenida en los sobrenadantes de diferentes tiempos de cultivo de *L. murinus* 26B1 de 0 a 24 horas 10X (figura 16).

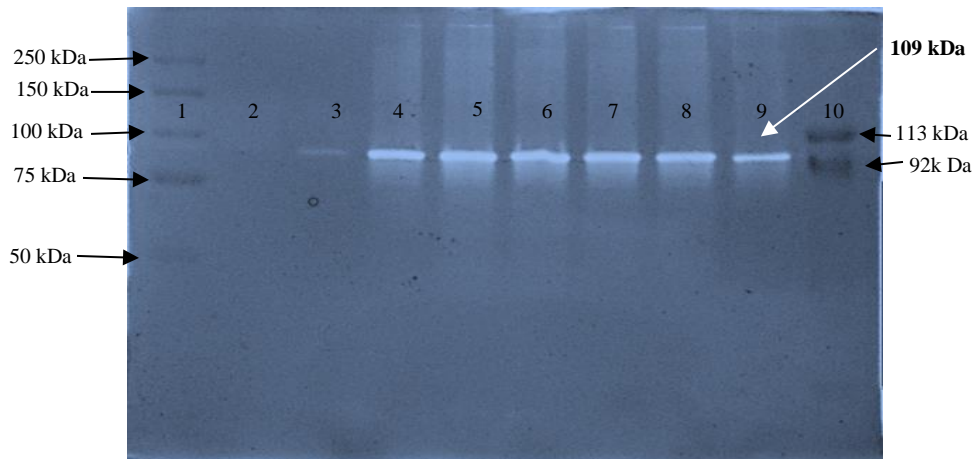


Figura 16. Actividad lítica de las proteínas contenidas en los sobrenadantes de cultivo de *L. murinus* 26B1 frente a *M. lysodeikticus* ATCC 4698

SDS-PAGE (12% T, 3.3% C) copolimerizados al 0.02% con *M. lysodeikticus*, 1 mm, tinción azul de metileno

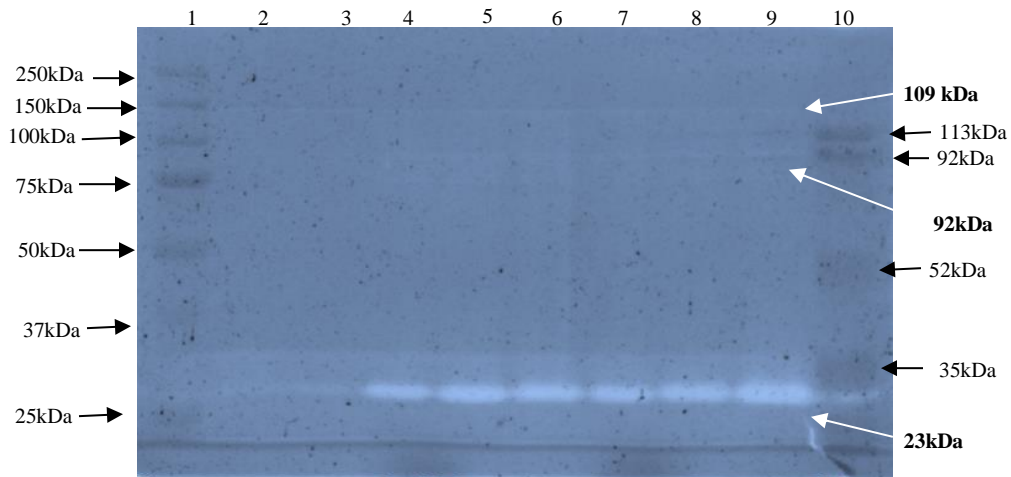


Figura 17. Actividad lítica de las proteínas contenidas en los sobrenadantes de cultivo de *L. murinus* 26B1 frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p

SDS-PAGE (12% T, 3.3% C) copolimerizados al 0.02% con *S. aureus* ATCC 6538p, 1 mm, tinción azul de metileno

En los carriles del gel 16 y 17 se colocaron las siguientes muestras 1) MPM: Precision Plus, Protein™ Standards, All Blue, Bio-Rad. 2) Control negativo Medio MRS (10X). 3)

Sobrenadante de cultivo de *L. murinus* de 0 h 10X. 4) Sobrenadante de cultivo de *L. murinus* de 4 h (fase logarítmica temprana) 10X. 5) Sobrenadante de cultivo de *L. murinus* de 8 h (fase logarítmica tardía) 10X. 6) Sobrenadante de cultivo de *L. murinus* de 12 h 10X. 7) Sobrenadante de cultivo de *L. murinus* de 16 h 10X. 8) Sobrenadante de cultivo de *L. murinus* de 20 h 10X. 9) Sobrenadante de cultivo de *L. murinus* de 24 h 10X. 10) MPM: SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range, Bio-Rad.

Fue necesario emplear la técnica de zimografía *in situ* en geles de Bis/Acrilamida co-polimerizados, para confirmar o rectificar que los resultados de la actividad inhibitoria de los sobrenadantes de cultivo de *L. murinus* 26B1 concentrados 10X frente a *S. aureus* ATCC 6538p, en los ensayos anteriores, se debe a compuestos de naturaleza proteica.

En la figura 17 se observa que el medio MRS no contiene sustancias con actividad lítica frente a *S. aureus*. Se puede observar que las proteínas secretadas en los sobrenadantes de cultivo de *L. murinus* 26B1 de 4 a 24 horas, corresponden a péptidos con masas moleculares relativas de 23.05 ± 2.14 , 92.84 ± 1.21 y 109.01 ± 0.86 kDa, con actividad lítica sobre *S. aureus* ATCC 6538p (bandas traslúcidas).

Al empatar los zimogramas (geles co-polimerizados; figura 17) con los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 (figura 15) de 0 a 24 horas, se pudo definir que las zonas de lisis corresponden a las bandas proteicas de 108 ± 0.43 , 92 ± 0.53 y 23 ± 1.36 kDa (figura 15; cuadro 21), aproximadamente. Además, se observó que las bandas traslúcidas generadas por la actividad lítica que ejercían los péptidos de 23 ± 1.36 kDa sobre *S. aureus*, se intensificaban a mayor tiempo de incubación en la solución renaturalizante (Tritón al 1%).

Las proteínas de 108 ± 0.43 kDa identificadas en los geles SDS-PAGE, co-polimerizados y renaturalizados de este trabajo se acerca a lo reportado por Lortal *et al.*, (1997) y Mora *et al.*, (2003) quienes demostraron patrones de actividad lítica de Peptidoglicano Hidrolasa (PGH) (106 kDa). Llorente *et al.*, (2008) trabajaron con sobrenadantes de cultivos de *P. acidilactici* ATCC 8042 en fase logarítmica y demostraron la actividad lítica de PGH extracelular con una masa molecular relativa de 110 kDa.

En el presente trabajo, se observó la actividad lítica de dos nuevas proteínas de masa molecular relativa de 92 ± 0.53 y 23 ± 1.36 kDa, aproximadamente, las bandas de 23 kDa en el

perfil electroforético (figura 15) de los geles teñidos con Coomassie se observan muy tenues porque solo se identifican en baja concentración liberada al medio. Sin embargo, su actividad lítica se corrobora en los zimogramas *in situ* donde se evidencia su presencia en el sobrenadante de cultivo y se logra ver de forma más clara la actividad lítica (cuadro 24).

Cuadro 24. Proteínas de sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 con actividad lítica sobre *S. aureus* ATCC 6538p en fase logarítmica (2 h)

Proteínas con actividad lítica	Proteínas precipitadas de sobrenadantes de cultivo de <i>L. murinus</i> 10X (horas)							
	MRS	0	4	8	12	16	20	24
109±0.86	-	-	+	+	+	+	+	+
92±1.21	-	-	+	+	+	+	+	+
23±2.14	-	+	+	++++	++++	++++	++++	++++

Varias proteínas antimicrobianas reportadas en la literatura se producen durante la fase de crecimiento exponencial con un máximo en el medio o al final de esta fase, o al comienzo de la fase estacionaria (De Vuyst *et al.*, 1992; Parente *et al.*, 1994). Solo en unos pocos casos se ha demostrado que la producción de péptidos antimicrobianos se produce durante la fase estacionaria (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993). La amilovorina L471, una bacteriocina producida por *Lactobacillus amylovorus* L471, muestra una cinética con un pico de actividad durante la fase media exponencial (De Vuyst *et al.*, 1996). De aquí la importancia de identificar los péptidos contenidos en los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 mediante electroforesis SDS-PAGE y evaluar su actividad antimicrobiana mediante zimografías *in situ*.

3.5. Capacidad de *L. murinus* 26B1 y *S. aureus* ATCC 6538p para producir biopelículas

Como se mencionó en la metodología, se determinó la capacidad de *P. aeruginosa* ATCC 9027 como control positivo, así como las cepas de interés *S. aureus* ATCC 6538p y *L. murinus* 26B1 para producir biopelículas en microplacas de poliestireno (figura 18). El método descrito por Lebeer *et al.*, (2007) permitió cuantificar la producción de biopelículas de cada cepa durante 72 h y el efecto de tres diferentes temperaturas (4, 25 y 35°C) sobre su desarrollo. Para la interpretación de los resultados se utilizó la técnica descrita por Stepanovic *et al.*, (2000), la cual consiste en medir la absorbancia ($A_{\lambda 595 \text{ nm}}$) de los controles y la $DO_{\lambda 595 \text{ nm}}$ de cada cultivo bacteriano individualmente.

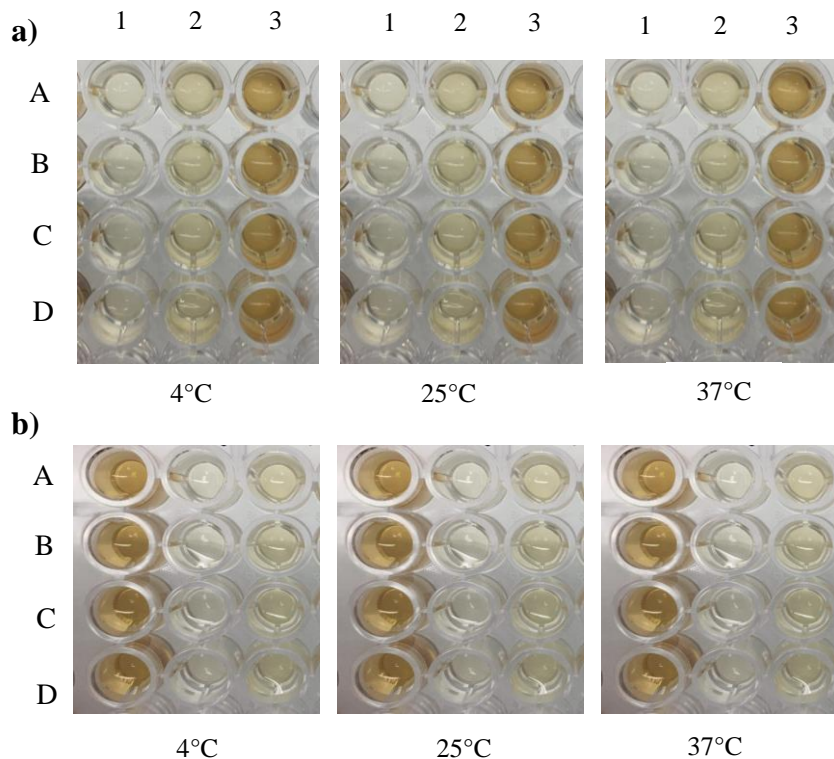


Figura 18. Ensayo *in vitro* para la detección de biopelículas en placa de poliestireno a 4, 25 y 35°C durante 72 h

Todas las muestras se probaron por cuadruplicado. a) Pocillos del 1 (A-D): Control positivo (*P. aeruginosa* ATCC 9027); 2 (A-D): *S. aureus* ATCC 6538p; 3 (A-D): cultivo de *L. murinus* 26B1 de 12 h. b) controles negativos; pocillos del 1 (A-D): MRS 10X estéril; 2 (A-D): Luria-Bertani fortificado; 3 (A-D): BHI estéril. Las placas fueron almacenadas a 4, 25 y 35°C, durante 72 horas

En la figura 19, se observó que la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 9027, utilizada solo como control positivo, tiene la capacidad de producir biopelículas a 4, 25 y 35°C. El medio Luria-Bertani fortificado estéril fue el control negativo. A una temperatura de 4°C se obtuvo una $DO_{\lambda 595 \text{ nm}}$ de 0.265, a 25°C una $DO_{\lambda 595 \text{ nm}}$ de 0.427 y a 35°C una $DO_{\lambda 595 \text{ nm}}$ de 0.578. Los resultados permitieron clasificar a *P. aeruginosa* como fuerte productora de biopelículas a 4, 25 y 35°C.

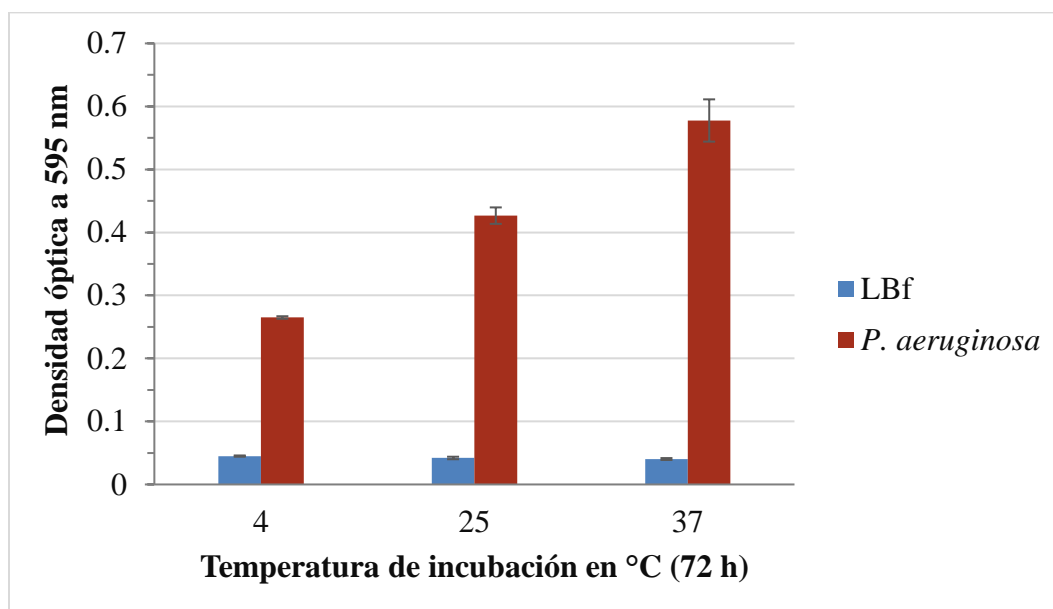


Figura 19. Formación de biopelículas de *P. aeruginosa* ATCC 9027 en poliestireno (4, 25 y 35°C, durante 72 h de incubación)

En el cuadro 25, se observan los valores P que prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que $p < 0.05$, se determinó que entre la producción de biopelículas del medio Luria-Bertani y el cultivo de *P. aeruginosa* a las 72 horas existen diferencias estadísticamente significativas, lo mismo se observó cuando se evaluó el efecto de las temperaturas de 4, 25 y 35°C sobre la producción de biopelículas, con un 95.0% de nivel de confianza. Se empleó la prueba de rangos de Tukey, con este método se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre la producción de biopelículas promedio del medio Luria-Bertani, la cepa de *P. aeruginosa*, así como el efecto de las temperaturas manejadas. La cepa de *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista multirresistente por su capacidad para producir biopelículas bacterianas, favorecidas por la producción de exopolisacáridos. Las especies del género *Pseudomonas* son productoras bien

conocidas de biopelículas formadas en superficies de contacto con alimentos y, a menudo, sirven como organismos modelo para estudios de biopelículas (Ochoa *et al.*, 2013).

Cuadro 25. Resultados del ANOVA para la producción de biopelículas de *P. aeruginosa* ATCC 9027

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Muestras	0.652	1	0.652	116.78	0.0000
B: Temperaturas	0.071	2	0.036	6.37	0.0108
INTERACCIONES					
AB	0.075	2	0.038	173.57	0.0000
RESIDUOS	0.003	12	0.0002		
TOTAL (Corr.)	0.801	17			

Factor A: Muestras. Niveles: Medio Luria-Bertani y cultivo de *P. aeruginosa* ATCC 9027

Factor B: Temperaturas. Niveles: 4, 25 y 35°C

Por otro lado, *S. aureus* ha desarrollado entre sus mecanismos de resistencia, la formación de biopelículas, lo que lo hace persistente a tratamientos de desinfección. En la figura 20, se observó que *S. aureus* ATCC 6538p, microorganismo indicador, tiene la capacidad de producir biopelículas a 4, 25 y 35°C. El medio BHI estéril fue el control negativo. A una temperatura de 4°C se obtuvo una $DO_{\lambda_{595\text{ nm}}}$ de 0.070, a 25°C una $DO_{\lambda_{595\text{ nm}}}$ de 0.514 y a 35°C una $DO_{\lambda_{595\text{ nm}}}$ de 2.884. Los resultados permitieron clasificar a *S. aureus* como débilmente productora a 4°C y fuerte productora de biopelículas a 25 y 35°C. Litrán *et al.*, (2002), determinaron que *S. aureus* produce adhesinas intercelulares de polisacárido y un homoglucano (28 kDa), descrito como un polímero de N-acetilglucosamina, los cuales son necesarios para la formación de biopelículas. La producción de polisacáridos extracelulares juega un papel crucial en la formación de biopelículas, en gran parte porque estos polímeros tienen un impacto significativo en la virulencia bacteriana.

En el cuadro 26, se observan los valores P que prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que $p < 0.05$, se determinó que entre la producción de biopelículas del medio BHI y el cultivo de *S. aureus* a las 72 horas existen diferencias estadísticamente significativas, lo mismo se observó cuando se evaluó el efecto de las temperaturas de 4, 25 y 35°C sobre la producción de biopelículas, con un 95.0% de nivel de confianza. Se empleó la prueba de rangos de Tukey, con este método se determinó que existen diferencias

estadísticamente significativas entre la producción de biopelículas promedio del medio BHI, la cepa de *S. aureus*, así como el efecto de las temperaturas manejadas.

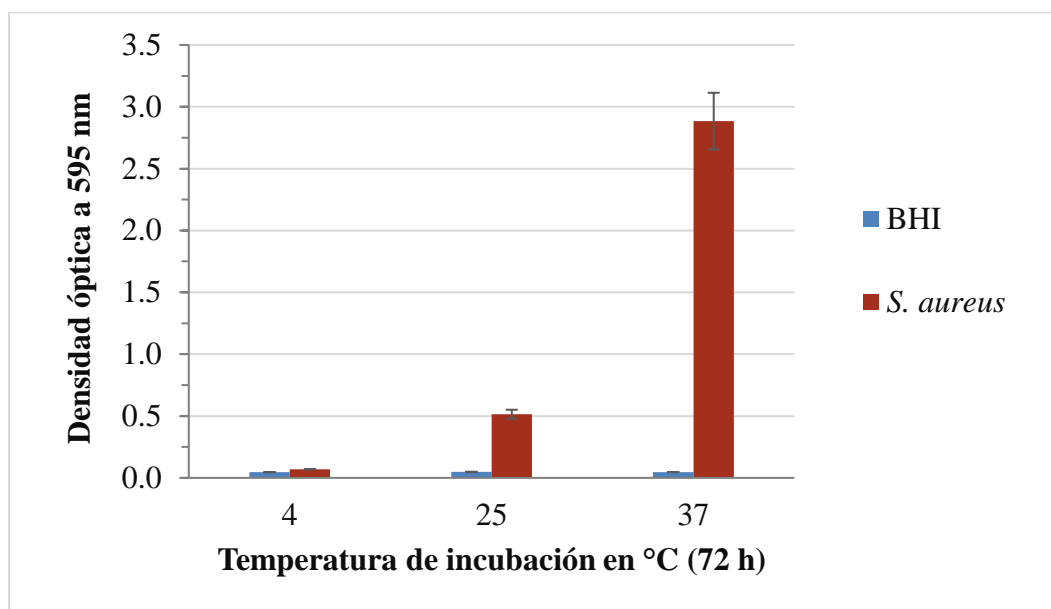


Figura 20. Formación de biopelículas de *S. aureus* ATCC 6538p en poliestireno (4, 25 y 35°C, durante 72 h de incubación)

Cuadro 26. Resultados del ANOVA para la producción de biopelículas de *S. aureus* ATCC 6538p

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Muestras	5.538	1	5.538	616.81	0.0000
B: Temperaturas	6.866	2	3.433	382.36	0.0000
INTERACCIONES					
AB	6.868	2	3.434	382.48	0.0000
RESIDUOS	0.108	12	0.009		
TOTAL (Corr.)	19.379	17			

Factor A: Muestras. Niveles: Medio BHI y cultivo de *S. aureus* ATCC 6538p

Factor B: Temperaturas. Niveles: 4, 25 y 35°C

Se ha descubierto que las BAL forman biopelículas en material biótico y abiótico, y funcionan como efectores antagonistas contra varios patógenos transmitidos por los alimentos en el modo de crecimiento planctónico o biofilm. Se ha informado que *L. lactis*, *L. sakei* y *L. curvatus* producen compuestos activos que inhiben el desarrollo de biopelículas y la proliferación celular de varios patógenos (Gómez *et al.*, 2016). En la figura 21, se observó

que la temperatura juega un papel importante en la formación de biopelículas. El medio MRS estéril fue el control negativo. A una temperatura de 4°C se obtuvo una $DO_{\lambda 595 \text{ nm}}$ de 0.082, a 25°C una $DO_{\lambda 595 \text{ nm}}$ de 0.092 y a 35°C una $DO_{\lambda 595 \text{ nm}}$ de 0.155. Los resultados permitieron clasificar a *L. murinus* 26B1 como débilmente productora de biopelículas a 4 y 25°C, y moderadamente productora a 35°C.

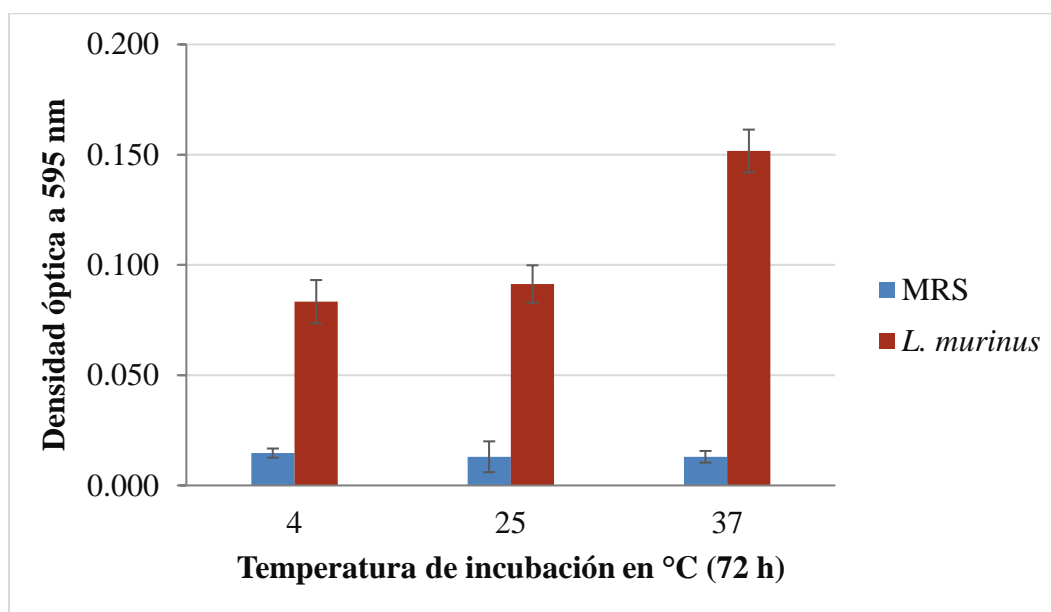


Figura 21. Formación de biopelículas de *L. murinus* 26B1 en poliestireno (4, 25 y 35°C, durante 72 h de incubación)

En el cuadro 27, se observan los valores P que prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que $p < 0.05$, se determinó que entre la producción de biopelículas del medio MRS y el cultivo de *L. murinus* a las 72 horas existen diferencias estadísticamente significativas, lo mismo se observó cuando se evaluó el efecto de las temperaturas de 4, 25 y 35°C sobre la producción de biopelículas, con un 95.0% de nivel de confianza. Se empleó la prueba de rangos de Tukey, con este método se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre la producción de biopelículas promedio del medio MRS, de la cepa de *L. murinus*, así como el efecto de las temperaturas manejadas. Lebeer *et al.*, (2007), evaluaron la capacidad intrínseca de formación de biopelículas de cepas de *L. rhamnosus*, determinando que los factores ambientales y el medio de cultivo influyen considerablemente en su desarrollo. Estas cepas de *L. rhamnosus* fueron capaces de formar biopelículas *in vitro*, en contraste con las de *L. casei* y registraron $DO_{\lambda 595 \text{ nm}} \leq 1.9$, cuando se

omitió el MgSO₄ en la composición del medio MRS, así como $DO_{\lambda,595\text{ nm}} \leq 0.5$ cuando se omitió la glucosa.

Cuadro 27. Resultados del ANOVA para la producción de biopelículas de *L. murinus*

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Muestras	0.040	1	0.040	806.66	0.0000
B: Temperaturas	0.004	2	0.002	39.83	0.0000
INTERACCIONES					
AB	0.004	2	0.002	43.76	0.0000
RESIDUOS	0.001	12	0.00005		
TOTAL (Corr.)	0.049	17			

Factor A: Muestras. Niveles: Medio MRS y cultivo de *L. murinus*

Factor B: Temperaturas. Niveles: 4, 25 y 35°C

De acuerdo con la intensidad de la formación de biopelículas las cepas se clasificaron en las siguientes categorías (cuadro 28):

Cuadro 28. Capacidad para producir biopelículas de *L. murinus* 26B1 y *S. aureus* ATCC 6538p luego de 72 h

Cepa	Densidad Óptica a 595 nm			Resultado final (No productora, débil, moderada o fuerte)
	4°C	25°C	35°C	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0.265	0.427	0.578	-Fuerte productora a 4, 25 y 35°C
<i>S. aureus</i> ATCC 6538p	0.070	0.514	2.884	- Productora débil a 4°C - Productora fuerte a 25 y 35°C
<i>L. murinus</i> 26B1	0.082	0.092	0.155	- Productora débil a 4 y 25°C - Productora moderada a 35°C

Los resultados de las tres réplicas fueron analizados mediante un ANOVA multifactorial. Se determinó que cada una de las cepas (*P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. aureus* ATCC 6538p y *L. murinus* 26B1), así como la temperatura (4, 25 y 35°C) presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) sobre la formación de biopelículas. Esto indica que los microorganismos indicadores utilizados (*P. aeruginosa* y *S. aureus*) en dicho ensayo son capaces de adherirse a superficies abióticas y producir biopelículas en gran intensidad y en ambientes adversos, lo que los convierte en una preocupación recurrente, ya que sus

biopelículas forman una barrera de difusión que impide la penetración de antimicrobianos (Berrang *et al.*, 2005).

En la actualidad *S. aureus* es uno de los patógenos ubicuos más importantes, su capacidad para producir toxinas estafilocócicas lo convierte en uno de los microorganismos patógenos causantes de enfermedades de origen alimentario, cuyo tratamiento se hace cada vez más complejo debido a la gran capacidad de desarrollar resistencia a los antimicrobianos y soportar condiciones ambientales adversas. Las toxinas responsables de las ETA son termoestables, capaces de resistir temperaturas de 100°C durante 15-30 minutos, la dosis mínima infecciosa es de 20 hasta 144 ng (FDA, 2012). De aquí la importancia de evaluar la capacidad productora de biopelículas de *S. aureus* y conocer el papel que juega la temperatura en su desarrollo. Es necesario seguir trabajando para determinar si los péptidos con actividad lítica producidos por *L. murinus* 26B1, una vez purificados inhiben las biopelículas de *S. aureus* ATCC 6538p.

CONCLUSIONES

- La cepa *L. murinus* 26B1 tuvo un perfil de fermentación similar a *L. lactis* spp., esto por su capacidad de fermentar glucosa, fructosa, manosa, sorbitol, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, sacarosa y rafinosa.
- En las cinéticas de crecimiento de cada cepa se identificaron las diferentes etapas de crecimiento de cada una de las cepas estudiadas. *L. murinus* 26B1 presentó fase logarítmica temprana a las 4 y logarítmica tardía hasta las 8 horas (5-7 log UFC/mL, respectivamente). Mientras que *S. aureus* ATCC 6538p presentó fase logarítmica temprana a las 2 y tardía hasta las 5 horas (7-8 log UFC/mL).
- La técnica *in vitro* de *Spot on the lawn* permitió evaluar la actividad antibacteriana de *L. murinus* 26B1 sobre *S. aureus* en fase logarítmica (7 log UFC/mL), con halos de inhibición de 9 mm, con las células de *L. murinus* 26B1.
- La concentración de proteínas del sobrenadante de cultivo concentrado, analizada mediante el reactivo de Bradford en las fases de crecimiento de *L. murinus* estuvo entre de 1.49 ± 0.010 y 2.19 ± 0.026 mg/mL.
- Por difusión en agar, con sobrenadantes de cultivo de *L. murinus* en fase logarítmica temprana, se obtuvieron halos de inhibición de *S. aureus* de 12.23 ± 0.025 mm siendo la CIM de 0.186 mg/mL. Con los sobrenadantes en fase logarítmica tardía los halos de inhibición de *S. aureus* fueron de 12.84 ± 0.037 mm y la CIM de 0.199 mg/mL.
- Las cinéticas de inhibición en caldo permitieron determinar que la CIM de los sobrenadantes de cultivo en fase logarítmica temprana fue de 0.07 mg/mL, con una reducción de 2.49 log UFC/mL de *S. aureus* a las 24 horas. Mientras que la CIM de los sobrenadantes de cultivo de *L. murinus* en fase logarítmica tardía fue de 0.08 mg/mL y una reducción de 3.31 log UFC/mL de *S. aureus* a las 24 horas.
- Los perfiles electroforéticos permitieron identificar 21 bandas de proteínas en los sobrenadantes de cultivos de *L. murinus* 26B1 en fase logarítmica temprana y 15 a partir de la fase logarítmica tardía mismas que permanecieron hasta las 24 horas de cultivo.
- Mediante zimogramas de actividad *in situ* se identificó una banda lítica de 109 ± 1.72 kDa en los geles con *M. lysodeikticus* ATCC 4698 (control positivo) que podría corresponder a una Péptidoglicano Hidrolasa (PGH) citada por distintos autores.

- En los zimogramas de actividad *in situ* con *S. aureus* ATCC 6538p, se observaron tres bandas líticas de 109 ± 0.86 , 92 ± 1.21 y 23 ± 2.14 kDa, sobre *S. aureus* ATCC 6538p.
- La técnica descrita por Stepanovic *et al.*, 2000 y Lebeer *et al.*, 2007 permitieron clasificar a *S. aureus* ATCC 6538p como débilmente productora de biopelículas a 4°C ($DO_{\lambda 595 \text{ nm}} 0.070$) y fuerte productora a 25 y 35°C ($DO_{\lambda 595 \text{ nm}} 0.514$ y 2.884 , respectivamente). Mientras que *L. murinus* 26B1 resultó ser débil productora de biopelículas a 4 y 25°C ($DO_{\lambda 595 \text{ nm}} 0.082$ y 0.092 , respectivamente) y productora moderada a 35°C ($DO_{\lambda 595 \text{ nm}} 0.155$).

RECOMENDACIONES

- Se recomienda recuperar las bandas de proteínas con masas moleculares relativas de 108 ± 0.43 , 92 ± 0.53 y 23 ± 1.36 kDa, detectadas en el perfil electroforético, mismas que demostraron actividad lítica sobre *S. aureus* ATCC 6538p (109 ± 0.86 , 92 ± 1.21 y 23 ± 2.14 kDa) y así continuar con su purificación.
 - Obtener la secuencia completa de aminoácidos de cada proteína y corroborar mediante herramientas bioinformáticas, si ya se publicaron o resultan ser nuevas proteínas con actividad antibacteriana.
 - Realizar una caracterización más completa de las proteínas líticas, frente a diferentes enzimas y distintos tratamientos térmicos.
- Es importante continuar con los estudios de las biopelículas producidas por la cepa de *L. murinus* 26B1 para identificar si guarda relación con la actividad antibacteriana observada.

REFERENCIAS

- Abbas, H. A., Serry, F. M., & EL-Masry, E. M. (2012). Combating *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by potential biofilm inhibitors. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science*, 2(2), 66-72.
- Alakomi, H. L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and environmental microbiology*, 66(5), 2001-2005.
- Álvarez, E. C., & Sánchez, L. C. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, 14(26), 53-62.
- And, H. C., & Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(3), 82-100.
- Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In, S. Salminen and A. Von Wright (eds). *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. Inc, New York.
- Bajagai, Y. S., Klieve, A. V., Dart, P. J., & Bryden, W. L. (2016). *Probiotics in animal nutrition: production, impact and regulation*. FAO.
- Balciunas, E. M., Martinez, F. A. C., Todorov, S. D., de Melo Franco, B. D. G., Converti, A., & de Souza Oliveira, R. P. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control*, 32(1), 134-142.
- Bardell, D. (1983). The roles of the sense of taste and clean teeth in the discovery of bacteria by Antoni van Leeuwenhoek. *Microbiological reviews*, 47(1), 121.
- Barraud, N., Kjelleberg, S., & Rice, S. A. (2015). Dispersal from microbial biofilms. *Microbiol Spectrum* 3: MB-0015-2014.
- Barry, A. L. (1986). Procedure for testing antimicrobial agents in agar media: theoretical considerations. *Antibiotics in laboratory medicine*, 1-26.
- Bennett, R. W. (1992). The biomolecular temperament of staphylococcal enterotoxin in thermally processed foods. *Journal of AOAC international*, 75(1), 6-12.

- Berrang, M. E., Meinersmann, R. J., Frank, J. F., Smith, D. P., & Genzlinger, L. L. (2005). Distribution of *Listeria monocytogenes* subtypes within a poultry further processing plant. *Journal of food protection*, 68(5), 980-985.
- Beristain-Bauza, S. C., Palou, E., & López-Malo, A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 6(2), 64-78.
- Blanco-Lizarazo, C. M., Sotelo-Díaz, I., & Llorente-Bousquets, A. (2016). In vitro modelling of simultaneous interactions of *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus sakei*, and *Staphylococcus carnosus*. *Food science and biotechnology*, 25(1), 341-348.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248- 254.
- Caggianiello, G., Kleerebezem, M., & Spano, G. (2016). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(9), 3877-3886.
- Cantón, R., & Ruiz-Garbajosa, P. (2013). Infecciones causadas por bacterias grampositivas multirresistentes (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp.). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(8), 543-551.
- Cardoso, C. V., Barbosa, E. V., Liberal, M. H. T., & das Chagas, E. F. (2019). Transgenic technology: the strategy for the control and prevention of bovine staphylococcal mastitis?. *Biotechnology Research and Innovation*, 3(2), 291-297.
- Carmona-Torre, F., & del Pozo, J. L. (2018). Tratamiento de las infecciones por *Staphylococcus aureus*. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(49), 2918-2923.
- Ceresa, C., Hutton, S., Lajarin-Cuesta, M., Heaton, R., Hargreaves, I., Fracchia, L., & De Rienzo, M. A. D. (2020). Production of mannosylerythritol lipids (MELs) to be used as antimicrobial agents against *S. aureus* ATCC 6538. *Current microbiology*, 77(8), 1373-1380.

- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28-40.
- Chambers, H. F., & DeLeo, F. R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 629-641.
- Chapot-Chartier, M. P., & Kulakauskas, S. (2014, August). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. In *Microbial cell factories* (Vol. 13, No. S1, p. S9). BioMed Central.
- Chen, C. C., Lai, C. C., Huang, H. L., Su, Y. T., Chiu, Y. H., Toh, H. S., ... & Tang, H. J. (2020). Antimicrobial ability and mechanism analysis of *Lactobacillus* species against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Fernández, M. F., & Hernández, P. E. (1998). Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiology*, 15(3), 289-298.
- Collins, E. B., & Aramaki, K. (1980). Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of dairy science*, 63(3), 353-357.
- Darsanaki, R. K., Rokhi, M. L., Aliabadi, M. A., & Issazadeh, K. (2012). Antimicrobial activities of *Lactobacillus* strains isolated from fresh vegetables. *Middle-east journal of scientific research*, 11(9), 1216-1219.
- De Albuquerque, T. M. R., Garcia, E. F., de Oliveira Araújo, A., Magnani, M., Saarela, M., & de Souza, E. L. (2018). In vitro characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing by-products as potential probiotics. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10(4), 704-716.
- De Vuyst, L., & Vandamme, E. J. (1992). Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *Microbiology*, 138(3), 571-578.

- De Vuyst, L., Callewaert, R., & Crabbé, K. (1996). Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology*, *142*(4), 817-827.
- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, *13*(4), 194-199.
- Delignette-Muller, M. L. (1998). Relation between the generation time and the lag time of bacterial growth kinetics. *International journal of food microbiology*, *43*(1-2), 97-104.
- Dertli, E., Colquhoun, I. J., Gunning, A. P., Bongaerts, R. J., Le Gall, G., Bonev, B. B., ... & Narbad, A. (2013). Structure and biosynthesis of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus johnsonii* FI9785. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(44), 31938-31951.
- Dinges, M. M., Orwin, P. M., & Schlievert, P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*, *13*(1), 16-34.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, *8*(9), 881.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, *87*(2), 951-962.
- Dosta, M. D. C. M., Barrera, T. C., Perrino, F. J. F., & Reyes, L. M. (2009). Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS*, *73*, 63-72.
- Drago, L., Gismondo, M. R., Lombardi, A., De Haën, C., & Gozzini, L. (1997). Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. *FEMS Microbiology Letters*, *153*(2), 455-463.
- Dziewanowska, K., Patti, J. M., Deobald, C. F., Bayles, K. W., Trumble, W. R., & Bohach, G. A. (1999). Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required

- for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infection and immunity*, 67(9), 4673-4678.
- Elayaraja, S., Annamalai, N., Mayavu, P., & Balasubramanian, T. (2014). Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4, S305-S311.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., & Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS microbiology Reviews*, 24(1), 85-106.
- FAO/WHO. (2001). Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. *Report from FAO/WHO Expert Consultation*, 1-4.
- Fleming, H. P., McFeeters, R. F., & Daeschel, M. A. (1985). The lactobacilli, pediococci, and leuconostocs: vegetable products. *Bacterial starter cultures for foods*, 97-118.
- Food and Drug Administration. (2012). Bad bug book, foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. *Gram-positive bacteria. Second edition*. Lampel K, Al-Khaldi S, Cahill S, editors. Silver Spring: Center for Food Safety and Applied Nutrition of the Food and Drug Administration (FDA), US Department of Health and Human Services.
- Fowler, T., Wann, E. R., Joh, D., Johansson, S., Foster, T. J., & Höök, M. (2000). Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell β 1 integrins. *European journal of cell biology*, 79(10), 672-679.
- Fujiwara, S., Hashiba, H., Hirota, T., & Forstner, J. F. (2001). Inhibition of the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 to human intestinal epithelial cell line HCT-8 by an extracellular protein fraction containing BIF of *Bifidobacterium longum* SBT2928: suggestive evidence of blocking of the binding receptor ganglioside on the cell surface. *International journal of food microbiology*, 67(1-2), 97-106.
- Garzón, J. P., Martínez, S. R., & Molina, L. M. (2019). *Staphylococcus aureus*. *Nova*, 17(32), 25-38.

- Grosso-Becerra, M. V., González-Valdez, A., Granados-Martínez, M. J., Morales, E., Servín-González, L., Méndez, J. L., ... & Soberón-Chávez, G. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 is a non-virulent strain suitable for mono-rhamnolipids production. *Applied microbiology and biotechnology*, *100*(23), 9995-10004.
- Jiménez-Díaz, R., Rios-Sanchez, R. M., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J. L., & Piard, J. C. (1993). Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and environmental microbiology*, *59*(5), 1416-1424.
- Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., & Jalaludin, S. (1998). Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Letters in applied microbiology*, *27*(3), 183-185.
- Joint, F. A. O. (2007). WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.
- Galindo, A. B. (2004). *Lactobacillus plantarum* 44A as a live feed supplement for freshwater fish.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Omar, N. B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International journal of food microbiology*, *120*(1-2), 51-70.
- García-Almendárez, B. E., Cann, I. K., Martin, S. E., Guerrero-Legarreta, I., & Regalado, C. (2008). Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*, *19*(7), 670-680.
- García, J. P., Gil, J. E., Botero, S., & Valencia, F. E. (2018). Growth control of *Listeria monocytogenes* in co-culture with *Lactobacillus plantarum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *20*(2), 68-77.
- Garzón, J. P., Martínez, S. R., & Molina, L. M. (2019). *Staphylococcus aureus*. *Nova*, *17*(32), 25-38.

- Gaspar, P., Carvalho, A. L., Vinga, S., Santos, H., & Neves, A. R. (2013). From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnology advances*, *31*(6), 764-788.
- Gilbert, I. (1931). Dissociation in an encapsulated staphylococcus. *Journal of bacteriology*, *21*(3), 157.
- Gómez, N. C., Ramiro, J. M., Quecan, B. X., & de Melo Franco, B. D. (2016). Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. *Frontiers in microbiology*, *7*, 863.
- Harper, D. R., Parracho, H. M., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., ... & Morales, S. (2014). Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics*, *3*(3), 270-284.
- Hartford, O., Francois, P., Vaudaux, P., & Foster, T. J. (1997). The dipeptide repeat region of the fibrinogen-binding protein (clumping factor) is required for functional expression of the fibrinogen-binding domain on the *Staphylococcus aureus* cell surface. *Molecular microbiology*, *25*(6), 1065-1076.
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B., & Lotfipour, F. (2015). Antimicrobial peptides from prokaryotes. *Edited by David A. Phoenix, Frederick Harris, and Sarah R. Dennison*.
- Halpin-Dohnalek, M. I., & Marth, E. H. (1989). *Staphylococcus aureus*: Production of extracellular compounds and behavior in foods-A review. *Journal of food protection*, *52*(4), 267-282.
- Hensen, S. M., Pavičić, M. J. A. M. P., Lohuis, J. A. C. M., De Hoog, J. A. M., & Poutrel, B. (2000). Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. *Journal of dairy science*, *83*(9), 1966-1975.
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., & Hernández-Rodríguez, A. (2007). Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista mexicana de fitopatología*, *25*(1), 66-74.

- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., & Ito, T. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*, 9(10), 486-493.
- Hojjati, M., Behabehani, B. A., & Falah, F. (2020). Aggregation, adherence, anti-adhesion and antagonistic activity properties relating to surface charge of probiotic *Lactobacillus brevis* gp104 against *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*, 147, 104420.
- Hoover, D. G., Dishart, K. J., & Hermes, M. A. (1989). Antagonistic effect of *Pediococcus* spp. against *Listeria monocytogenes*. *Food Biotechnology*, 3(2), 183-196.
- Hotel, A. C. P., & Cordoba, A. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prevention*, 5(1), 1-10.
- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol.
- Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science*, 49, S139-S150.
- Isani, M., Bell, B. A., Delaplain, P. T., Bowling, J. D., Golden, J. M., Elizee, M., ... & Ford, H. R. (2018). *Lactobacillus murinus* HF12 colonizes neonatal gut and protects rats from necrotizing enterocolitis. *PloS one*, 13(6), e0196710.
- Janisiewicz, W. J., & Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual review of phytopathology*, 40(1), 411-441.
- Jiang, L. (2011). Comparison of disk diffusion, agar dilution, and broth microdilution for antimicrobial susceptibility testing of five chitosans.
- Kim, S. J., Chang, J., Rimal, B., Yang, H., & Schaefer, J. (2018). Surface proteins and the formation of biofilms by *Staphylococcus aureus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1860(3), 749-756.
- Klein, R. C., Fabres-Klein, M. H., Brito, M. A. V. P., Fietto, L. G., & Ribon, A. D. O. B. (2012). *Staphylococcus aureus* of bovine origin: genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. *Veterinary microbiology*, 160(1-2), 183-188.
- Kleynmans, U., Heinzl, H., & Hammes, W. P. (1989). *Lactobacillus suebicus* sp. nov., an obligately heterofermentative *Lactobacillus* species isolated from fruit mashes. *Systematic and applied microbiology*, 11(3), 267-271.

- Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial pathogenesis*, *128*, 171-177.
- Laemmli, U. K. (1970). SDS-page Laemmli method. *Nature*, *227*, 680-5.
- Layec, S., Decaris, B., & Leblond-Bourget, N. (2008). Diversity of Firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation. *Research in microbiology*, *159*(7-8), 507-515.
- Le Loir, Y., Baron, F., & Gautier, M. (2003). Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genet Mol Res*, *2*(1), 63-76.
- Lee, C. Y., & Lee, J. C. (2006). Staphylococcal capsule. *Gram-Positive Pathogens*, 456-463.
- Lee, K., & Brumme, Z. L. (2013). Operationalizing the One Health approach: the global governance challenges. *Health Policy and Planning*, *28*(7), 778-785.
- Lebeer, S., Verhoeven, T. L., Vélez, M. P., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2007). Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(21), 6768-6775.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, *15*(2), 67-78.
- Leveau, J. Y., & Bouix, M. (2000). Microbiologia industrial: los microorganismos de interés industrial.
- Lewus, C. B., & Montville, T. J. (1991). Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, *13*(2), 145-150.
- Li, W. R., Xie, X. B., Shi, Q. S., Duan, S. S., Ouyang, Y. S., & Chen, Y. B. (2011). Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Biometals*, *24*(1), 135-141.
- Lima, E. T., Andreatti Filho, R. L., Okamoto, A. S., Noujaim, J. C., Barros, M. R., & Crocci, A. J. (2007). Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by

- Lactobacillus spp. isolated from chickens. *Canadian journal of veterinary research*, 71(2), 103.
- Liu, Z., Zhang, Z., Qiu, L., Zhang, F., Xu, X., Wei, H., & Tao, X. (2017). Characterization and bioactivities of the exopolysaccharide from a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* WLPL04. *Journal of dairy science*, 100(9), 6895-6905.
- Llinares, P., Barberán, J., Montejo, M., Salavert, M., Alvarez-Rocha, L., Maseda, E., ... & Candel11, J. (2013). Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. *Rev Esp Quimioter*, 26(1), 1-84.
- 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.
- Llorente-Bousquets, A., Pérez-Munguía, S., & Farrés, A. (2008). Novel extracellular proteolytic activity in *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Canadian journal of microbiology*, 54(8), 694-699.
- Londoño Restrepo, J., Macias Ospina, I. C., & Ochoa Jaramillo, F. L. (2016). Factores de riesgo asociados a infecciones por bacterias multirresistentes derivadas de la atención en salud en una institución hospitalaria de la ciudad de Medellín 2011-2014. *Infectio*, 77-83.
- López, J. E., Ochoa, A., Santoyo, G., Anaya, J. L., Medina, E., Martínez, M., & Loeza, P. D. (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39(3), 49-57.
- 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(6), 461-474.
- Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *New England journal of medicine*, 339(8), 520-532.
- Magnusson, J. (2003). *Antifungal activity of lactic acid bacteria* (Vol. 397).

- Maira-Litrán, T., Kropec, A., Abeygunawardana, C., Joyce, J., Mark, G., Goldmann, D. A., & Pier, G. B. (2002). Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infection and immunity*, *70*(8), 4433-4440.
- Makarova, O., Johnston, P., Walther, B., Rolff, J., & Roesler, U. (2017). Complete genome sequence of the disinfectant susceptibility testing reference strain *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538. *Genome announcements*, *5*(19).
- Martin, M., Paul, D., Orwin, M., & Schlievert, P. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.*
- Martínez-Suárez, J. V., Ortiz, S., & López-Alonso, V. (2016). Potential impact of the resistance to quaternary ammonium disinfectants on the persistence of *Listeria monocytogenes* in food processing environments. *Frontiers in microbiology*, *7*, 638.
- Mendoza, M. T. H., & Esp, B. (2004). El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia. *Nova*, *2*(2), 71-80.
- MEXICANA-NOM, N. O. (1994). *bienes y servicios. Método para la determinación de Staphylococcus aureus en alimentos*. NOM-115-SSA1-1994: México, DF.
- Monath, T. P., Kahn, L. H., & Kaplan, B. (2010). One health perspective. *ILAR journal*, *51*(3), 193-198.
- Moreira dos Santos, W. L. (2002). *Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por Pediococcus sp 347, de origen carníco* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones).
- Mora, D., Musacchio, F., Fortina, M. G., Senini, L., & Manachini, P. L. (2003). Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, *94*(4), 561-570.
- Moya, T. F. M., Newbold, C. J., Wallace, R. J., & Moyano, F. J. (2002). Effects of high-molecular-mass substrates on protein migration during sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, *23*(1), 1-7.

- Mukai, T., Asasaka, T., Sato, E., Mori, K., Matsumoto, M., & Ohori, H. (2002). Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *32*(2), 105-110.
- Munguía, V. P. (2015). Evaluación de la actividad antagónica de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre la expresión de algunos factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán, Estado de México.
- Nardi, R. M. D., Santoro, M. M., Oliveira, J. S., Pimenta, A. M. C., Ferraz, V. P., Benchetrit, L. C., & Nicoli, J. R. (2005). Purification and molecular characterization of antibacterial compounds produced by *Lactobacillus murinus* strain L1. *Journal of applied microbiology*, *99*(3), 649-656.
- Nazar, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, *67*(1), 161-172.
- NCCLS, 2005. *Manual of antimicrobial susceptibility testing*. USA: American Society of Microbiology.
- Nes, I. F., Yoon, S. S., & Diep, D. B. (2007). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. *Food Science and Biotechnology*, *16*(5), 675-690.
- Neeser, J. R., Granato, D., Rouvet, M., Servin, A., Teneberg, S., & Karlsson, K. A. (2000). *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiology*, *10*(11), 1193-1199.
- Ní Eidhin, D., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Höök, M., & Foster, T. J. (1998). Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology*, *30*(2), 245-257.
- NOM-062-ZOO-1999, N. O. M., & LA PRODUCCION, E. T. P. (1999). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

- Nuñez, M. R. M., Murillo, A. S., Suazo, H., Campos, J. C., Rodríguez, E., Espinal, O., & Avelar, G. (2009). Brote por *Staphylococcus aureus* en una guardería infantil en Choluteca, Honduras. *Rev Med Hondur*, 77(2), 57-98.
- Ochoa, S. A., López-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., López-Martínez, B., ... & Xicohtencatl-Cortes, J. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 70(2), 136-150.
- Ojcius, D. M., & Young, J. D. E. (1991). Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif?. *Trends in biochemical sciences*, 16, 225-229.
- O'Shea, E. F., Cotter, P. D., Stanton, C., Ross, R. P., & Hill, C. (2012). Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *International journal of food microbiology*, 152(3), 189-205.
- O'Riordan, K., & Lee, J. C. (2004). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clinical microbiology reviews*, 17(1), 218-234.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.
- Ote, I., Taminiu, B., Duprez, J. N., Dizier, I., & Mainil, J. G. (2011). Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Veterinary microbiology*, 153(3-4), 285-292.
- Ouwehand, A., Salminen, S., & von Wright, A. (Eds.). (2004). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Marcel Dekker.
- Parente, E., & Ricciardi, A. (1994). Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. *Letters in Applied Microbiology*, 19(1), 12-15.
- Parish, M. E., & Davidson, P. M. (1993). Methods for evaluation: In antimicrobials in foods.
- Paape, M., Mehrzad, J., Zhao, X., Detilleux, J., & Burvenich, C. (2002). Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 7(2), 109-121.

- Perelmuter, K., Fraga, M., & Zunino, P. (2008). In vitro activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. *Journal of Applied Microbiology*, *104*(6), 1718-1725.
- Pham, P. L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., & Cerning, J. (2000). Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Applied and environmental microbiology*, *66*(6), 2302-2310.
- Piddock, L. J. (1990). Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *Journal of applied bacteriology*, *68*(4), 307-318.
- Plachouras, D., Kärki, T., Hansen, S., Hopkins, S., Lyytikäinen, O., Moro, M. L., ... & Point Prevalence Survey Study Group. (2018). Antimicrobial use in European acute care hospitals: results from the second point prevalence survey (PPS) of healthcare-associated infections and antimicrobial use, 2016 to 2017. *Eurosurveillance*, *23*(46), 1800393.
- Preciado, G. M., Escalante Minakata, P., Castro, J. A. O., Junquera, V. I., Chávez, J. A. M., González, C. N. A., & Herrera, R. R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*, *21*(59), 64-70.
- Pulido, R. P., Omar, N. B., Abriouel, H., López, R. L., Cañamero, M. M., Guyot, J. P., & Gálvez, A. (2007). Characterization of lactobacilli isolated from caper berry fermentations. *Journal of applied microbiology*, *102*(2), 583-590.
- Purchiaroni, F., Tortora, A., Gabrielli, M., Bertucci, F., Gigante, G., Ianiro, G., ... & Gasbarrini, A. (2013). The role of intestinal microbiota and the immune system. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *17*(3), 323-33.
- Ríos, N., y Villanueva, S. (2019). Aislamiento de bacterias ácido lácticas de tracto intestinal de ratón infante y caracterización bioquímica primaria y de perfil de carbohidratos. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán, Estado de México.
- Rolfe, R. D. (1991). Population dynamics of the intestinal tract. *Colonization Control of Human Bacterial Enteropathogens in Poultry*, 59.

- Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, 9(1), 522-554.
- Ruiz-Rodríguez, L., Bleckwedel, J., Eugenia Ortiz, M., Pescuma, M., & Mozzi, F. (2017). Lactic acid bacteria. *Industrial Biotechnology: Microorganisms*, 1, 395-451.
- Sambrook, J. (2001). A laboratory manual. *Molecular cloning*, 1.
- Sánchez, J. I., Martínez, B., Guillén, R., Jiménez-Díaz, R., & Rodríguez, A. (2006). Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7495-7502.
- Sánchez Miranda, L., & Peña Rodríguez, J. (2016). Actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* spp. contra patógenos causantes de mastitis bovina. *Revista de Salud Animal*, 38(2), 85-92.
- Sandoval-Mosqueda, I., Llorente-Bousquets, A., Montiel-Sosa, J. F., Corona, L., & Guadarrama-Álvarez, Z. (2019). Encapsulation of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 and *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 in a freeze-dried alginate-gum arabic system and its in vitro testing under gastrointestinal conditions. *Journal of microencapsulation*, 36(7), 591-602.
- Santos, J. R., Ferrat, G. C., & Eichelmann, M. G. (2005). La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Rev. Latinoam. Microbiol*, 47(3-4), 92-101.
- Savage, D. C., Dubos, R., & Schaedler, R. W. (1968). The gastrointestinal epithelium and its autochthonous bacterial flora. *The Journal of experimental medicine*, 127(1), 67-76.
- Schelin, J., Wallin-Carlquist, N., Thorup Cohn, M., Lindqvist, R., & Barker, G. C. (2011). The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*, 2(6), 580-592.
- Schindler, C. A., & Schuhardt, V. T. (1964). Lysostaphin: a new bacteriolytic agent for the *Staphylococcus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51(3), 414.

- Shen, M., Li, Y., Zhang, L., Dai, S., Wang, J., Li, Y., ... & Huang, J. (2017). Staphylococcus enterotoxin profile of China isolates and the superantigenicity of some novel enterotoxins. *Archives of Microbiology*, 199(5), 723-736.
- Siamansouri, M., Mozaffari, S., & Alikhani, F. E. (2013). Bacteriocins and lactic acid bacteria. *Journal of Biology*, 2(5), 227-234.
- Sifuentes-Osornio, J., & Pérez-Patrigeon, S. (2006). Sepsis por Staphylococcus aureus resistente a meticilina: la sombra de una amenaza permanente. *Revista de Investigación Clínica*, 58(6), 598-607.
- Simha, B. V., Sood, S. K., Kumariya, R., & Garsa, A. K. (2012). Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application. *Microbiological Research*, 167(9), 544-549.
- Stoyanova, L. G., Ustyugova, E. A., & Netrusov, A. I. (2012). Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(3), 229-243.
- Tashakor, A., Hosseinzadehdehkordi, M., Emruzi, Z., & Gholami, D. (2017). Isolation and identification of a novel bacterium, *Lactobacillus sakei* subsp. dgh strain 5, and optimization of growth condition for highest antagonistic activity. *Microbial pathogenesis*, 106, 78-84.
- Todorov, S. D., Vaz-Velho, M., de Melo Franco, B. D. G., & Holzappel, W. H. (2013). Partial characterization of bacteriocins produced by three strains of *Lactobacillus sakei*, isolated from salpicão, a fermented meat product from North-West of Portugal. *Food Control*, 30(1), 111-121.
- Toutain-Kidd, C. M., Kadivar, S. C., Bramante, C. T., Bobin, S. A., & Zegans, M. E. (2009). Polysorbate 80 inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its cleavage by the secreted lipase LipA. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(1), 136-145.
- Tuchscher, L., Löffler, B., Buzzola, F. R., & Sordelli, D. O. (2010). *Staphylococcus aureus* adaptation to the host and persistence: role of loss of capsular polysaccharide expression. *Future microbiology*, 5(12), 1823-1832.

- Turgay, Ö., & Erbilir, F. (2006). Isolation and characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from various foods. *Turkish Journal of Biology*, 30(1), 39-44.
- Vásquez, S. M., Suárez, H., & Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista chilena de nutrición*, 36(1), 64-71.
- Vega Aragón, R. L. (2009). Zoonosis emergentes y reemergentes y principios básicos de control de zoonosis. *Revista de Medicina Veterinaria*, 1(17), 85-97.
- Verdenelli, M. C., Ghelfi, F., Silvi, S., Orpianesi, C., Cecchini, C., & Cresci, A. (2009). Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *European journal of nutrition*, 48(6), 355-363.
- Vigil, A. L. M., Palou, E., Parish, M. E., & Davidson, P. M. (2005). Methods for activity assay and evaluation of results. In *Antimicrobials in food* (pp. 661-682). CRC Press.
- Vitali, B., Minervini, G., Rizzello, C. G., Spisni, E., Maccaferri, S., Brigidi, P., ... & Di Cagno, R. (2012). Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. *Food Microbiology*, 31(1), 116-125.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., ... & Whitman, W. B. (Eds.). (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.
- Üçok, G., & Sert, D. (2020). Growth kinetics and biomass characteristics of *Lactobacillus plantarum* L14 isolated from sourdough: Effect of fermentation time on dough machinability. *LWT*, 109516.
- Urrego V., M., C., & Cadavid R., L. A. (2005). Efecto sobre la calidad microbiológica, sensorial y reológica, de la aplicación de tres diferentes niveles de ácido láctico en un corte de carne de res (Huevo de Solomo). *Trabajo de grado Especialización en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Medellín-Colombia*, 72.
- Wessel, D. M., & 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(1), 141-143.

- Wilson, C., Lukowicz, R., Merchant, S., Valquier-Flynn, H., Caballero, J., Sandoval, J., ... & Clement, B. (2017). Quantitative and qualitative assessment methods for biofilm growth: A mini-review. *Research & reviews. Journal of engineering and technology*, 6(4).
- Waldir, E., Rychtera, M., Melzoch, K., Quillama, E., & Egoavil, E. (2007). Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Revista peruana de biología*, 14(2), 271-276.
- Wu, C. W., Yin, L. J., & Jiang, S. T. (2004). Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1146-1151.
- Zecconi, A., Calvino, L., & Fox, L. (2006). *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *Bulletin-International Dairy Federation*, (408), 1-37.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., ... & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2858.

ANEXOS

Anexo 1. Cebadores utilizados para la identificación de las cepas de BAL obtenidas

Cuadro 29. Cebadores utilizados para la identificación de las cepas de BAL obtenidas

Nombre de BAL	ID cebador	Secuencia del cebador	Largo	GC (%)
<i>Lactobacillus intestinalis</i>	Lbinte-F	GTACAACGAGAAGCGAGCCT	20	55
	Lbinte-R	CACATAAGTGGTTAGGCCACC	20	52.4
<i>Ligilactobacillus animalis</i>	Lbanim-F	GAGTAACACGTGGGCAACCT	20	55
	Lbanim-R	TGTCTCAGTCCCAATGTGGC	20	55
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	Lbreute-F	AGTCACGGCTAACTACGTGC	20	55
	Lbreute-R	TTCGGTTAAGCCGAGTTTCCA	20	47.6
<i>Lactobacillus delbrueckii bulgaricus</i>	Lbdelb1-F	CCAAGGCAATGATGCGTAGC	20	55
	Lbdelb1-R	TTGCTCCATCAGACTTGCGT	20	50
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lbacid-F	ACGTCAAGTCATCATGCCCC	20	55
	Lbacid-R	TTAGACGGCTCCTTCCCGAGT	20	57.1
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	Lbferm-F	TCTTGCGCCAACCCTAGAGA	20	55
	Lbferm-R	GACTCGGTGTTTGGGTGTTACAAAC	20	48
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	Lclact1-F	GAGCGCTGAAGGTTGGTACT	20	55
	Lclact1-R	TGTCTCAGTCCCAATGTGGC	20	55
<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	Lclact2-F	GGCGTGCCTAATACATGCAA	20	55.9
	Lclact2-R	CCGTTGCTGCTCTTCAAAT	20	50
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Lbgrass-F	GAGCGAGCTTGCCTAGATGA	20	55
	Lbgrass-R	CTCTAGACATGCGTCTAGTGTT	20	45
<i>Ligilactobacillus murinus</i>	Lbmuri-F	AAGAGTTGAGCTGAGCGAACG	20	52.4
	Lbmuri-R	CGTAGAAGTTTGGGCCGTGTTT	20	50
<i>Lactobacillus crispatus</i>	Lbcris-F	GTACCAAGCCAAAGCAAGAC	20	50
	Lbcris-R	GTTTGAAGCCTTTACGTAAGTC	20	40.91
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Lbcris-F	CCGTTTATGCGGAACACCTA	20	50
	Lbcris-R	TCGGGATTACCAAACATCAC	20	45

Anexo 2. Medios de cultivos MRS y Luria-Bertani fortificado (LBf)

Formulación del caldo MRS y agar MRS

Reactivo	Caldo (g/L)	Agar (g/L)	Proveedor
Peptona	10.0	10.0	BD Medios Difco™
Extracto de carne	10.0	10.0	
Extracto de levadura	5.0	5.0	
Glucosa	20.0	20.0	
Monoleato de polisorbitán 80 (Tween)	1.0	1.0	
Citrato de amonio	2.0	2.0	
Acetato de sodio	5.0	5.0	
Sulfato de magnesio	0.1	0.1	
Sulfato de manganeso	0.05	0.05	
Fosfato dipotásico	2.0	2.0	
Agar bacteriológico	0	15	

Formulación del caldo LBf y agar LBf

Reactivo	Caldo (g/L)	Agar (g/L)	Proveedor
Peptona	10.0	10.0	
Extracto de levadura	5.0	5.0	
Cloruro de sodio	5.0	5.0	
Glucosa	2.0	2.0	
Agar bacteriológico	0.0	15.0	

Anexo 3. Ecuaciones de parámetros cinéticos

Tasa de crecimiento

$$dX/dt = \mu * X \quad X_t = X_0 * e^{\mu * t} \quad \mu = (\ln X_t - \ln X_0) / t \dots\dots\dots (h^{-1})$$

Donde:

X: células por mililitro

X_t: población microbiana en el tiempo t (horas)

t: tiempo

μ: tasa de crecimiento específico (por hora)

Tiempo de duplicación

$$X_t = 2X_0 \quad \mu = \ln 2 / g = 0.963 / t_d \quad t_d = 0.693 / \mu \dots\dots\dots (h)$$

Donde:

X: células por mililitro

X_t: población microbiana en el tiempo t (horas)

t_d: tiempo de duplicación (hora)

g: tiempo de generación (hora)

Número de generaciones

$$n = t/g \quad n = \Delta t / g = \Delta t / t_d$$

Δt: período de tiempo de crecimiento logarítmico

t_d: tiempo de duplicación (hora)

Anexo 4. Medios de cultivos, agares y soluciones buffer

Agua peptonada al 0.1%

Agua destilada	100.0 mL
Peptona proteosa	0.1 g
Cloruro de sodio	0.85 g

Agar BHI al 1.5%

Agua destilada	1000.0 mL
BHI (Difco™)	37.0 g
Agar (Difco™)	15.0 g

Solución salina fisiológica al 0.9%

Agua destilada	1000.0 mL
Cloruro de sodio	9.0 g

Agar BHI al 0.6%

Agua destilada	1000.0 mL
BHI (Difco™)	37.0 g
Agar (Difco™)	6.0 g

Caldo BHI

Agua destilada	1000.0 mL
BHI (Difco™)	37.0 g

Agar MRS al 1.5%

Agua destilada	1000.0 mL
MRS (Difco™)	55.0 g
Agar (Difco™)	6.0 g

Caldo MRS

Agua destilada	1000.0 mL
MRS (Difco™)	55.0 g

Preparación de alcohol al 70%

$$C_1N_1 = C_2N_2$$

$$(70%)(100.0 \text{ mL}) = (96%)*V_2$$

$$V_2 = 72.91 \text{ mL alcohol etílico al 96\%} + 27.1 \text{ mL de agua bidestilada}$$

Preparación de ácido láctico de 85% al 2%

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(2%)(100.0 \text{ mL}) = (85%)*V_2$$

$$V_2 = 2.35 \text{ mL ácido láctico al 85\%} + 97.65 \text{ mL de agua bidestilada}$$

Preparación de NaOH 6 N (Hidróxido de sodio)

$$\text{Peso} = (\text{Normalidad} * \text{Equivalentes} * \text{Volumen}) / 1000$$

$$\text{Peso} = ((6 \text{ N})(40 \text{ g})(500.0 \text{ mL})) / 1000.0 = 120.0 \text{ g de NaOH}$$

$$(100/98) * 120.0 \text{ g} = 122.44 \text{ gramos}$$

Anexo 5. Sustratos de la galería API®50CH (bioMérieux, México)

Cuadro 30. Sustratos contenidos en la galería API®50CH (bioMérieux, México)

Tubo	Ensayo	Sustrato	Tubo	Ensayo	Sustrato
0		Control negativo	25	ESC	Esculina citrato férrico
1	GLY	Glicerol	26	SAL	Salicina
2	ERY	Eritritol	27	CEL	D-Celobiosa
3	DARA	D-Arabinosa	28	MAL	D-Maltosa
4	LARA	L-Arabinosa	29	LAC	D-Lactosa
5	RIB	D-Ribosa	30	MEL	D-Melibiosa
6	DXYL	D-Xilosa	31	SAC	D-Sacarosa
7	LXYL	L-Xilosa	32	TRE	D-Trehalosa
8	ADO	D-Adonitol	33	INU	Inulina
9	MSX	Metil-βD-Xilopiranosida	34	MLZ	D-Melezitosa
10	GAL	D-Galactosa	35	RAF	D-Rafinosa
11	GLU	D-Glucosa	36	AMD	Almidón
12	FRU	D-Fructosa	37	GLYG	Glicógeno
13	MNE	D-Manosa	38	XLT	Xilitol
14	SBE	L-Sorbosa	39	GEN	Gentiobiosa
15	RHA	L-Rhamnosa	40	TUR	D-Turanosa
16	DUL	Dulcitol	41	LYX	D-Lixosa
17	INO	Inositol	42	TAG	D-Tagatosa
18	MAN	D-Manitol	43	DFUC	D-Fucosa
19	SOR	D-Sorbitol	44	LFUC	L-Fucosa
20	MDM	Metil-αD-Manopiranosida	45	DARL	D-Arabitol
21	MDG	Metil-αD-Glucopiranosida	46	LARL	L-Arabitol
22	NAG	N-Acetilglucosamina	47	GNT	Gluconato potásico
23	AMY	Amigdalina	48	2KG	2-Cetogluconato potásico
24	ARB	Arbutina	49	5KG	5-Cetogluconato potásico

Anexo 6. Curva estándar de Albúmina Sérica de Bovino

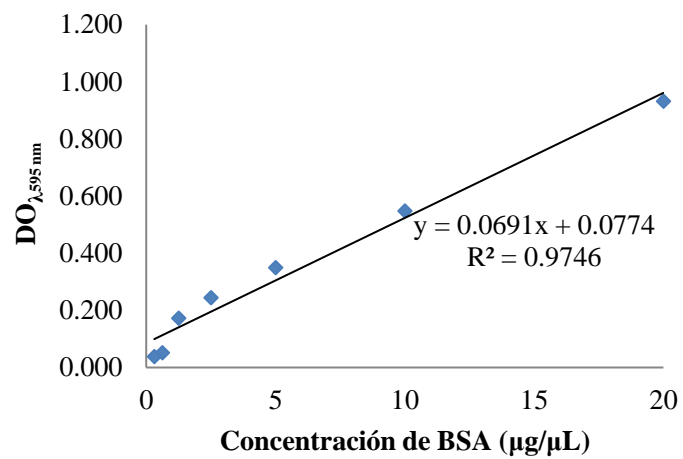


Figura 22. Curva estándar de Albúmina Sérica de Bovino

Anexo 7. Preparación de soluciones para Electroforesis SDS-PAGE

Buffer gel separador Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

Tris-Base	6.05g
Agua bidestilada estéril	80.0 mL
Aforar hasta 100.0 mL	
Ajustar pH a 8.8 con HCl concentrado	

Buffer gel concentrador Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

Tris-Base	6.05g
Agua bidestilada estéril	80.0 mL
Aforar hasta 100.0 mL	
Ajustar pH a 6.8 con HCl concentrado	

SDS al 10% (p/v)

SDS	10.0 g
Agua bidestilada estéril	80.0 mL
Aforar hasta 100.0 mL	
*Usar guantes y mascarillas	

Persulfato amónico (APS) al 10%

APS	0.1 g
Agua bidestilada estéril	1.0 mL
Repartir en alícuotas de 100 μ L en tubos eppendorf y almacenar a -20°C	

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

Acrilamida	29.2 g
NN-Bis-metilacrilamida	0.80 g
Agua bidestilada estéril	80.0 mL
Aforar a 100 mL	

Almacenar en un frasco ámbar o un frasco envuelto en papel aluminio, a 4°C (30 días máximo)

Running Buffer

Glycine	14.41 g (0.192 Mgly)
Tris	3.02 g (0.25 mMTris)
SDS	1.0 g (0.1% SDS)
Agua destilada estéril	1.0 L

Ajustar pH a 8.3-8.4 con HCl concentrado

Solución teñidora

Azul de Coomassie (R-250)	1.0 g
Ácido acético	100.0 mL
Metanol	400.0 mL
Agua destilada estéril	1.0 L

Solución decolorante

Etanol	100.0 mL
Ácido acético	50.0 mL
Metanol	200.0 mL
Agua destilada estéril	650.0 mL

Anexo 8. Preparación de solución teñidora y desteñidora para geles de actividad *in situ*

Solución teñidora

Azul de Coomassie (R-250)	2.5 g
Ácido acético	100.0 mL
Metanol	450.0 mL
Agua destilada estéril	450.0 mL

Solución decolorante

Ácido acético	150.0 mL
Metanol	200.0 mL
Agua destilada estéril	650.0 mL