UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis de la expresión de bacteriocinas de *Enterococcus faecium* QD-2

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Q.A. Claudia Sac Nicté Fuentes Curiel

Miembros del Comité Tutor:
Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
Facultad de Química

Dra. Sarabia Amelia Farrés González
Facultad de Química

Dr. José Adelfo Escalante Lozada
Instituto de Biotecnología

Ciudad Universitaria, CDMX. Noviembre, 2023

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

Análisis de la expresión de bacteriocinas de *Enterococcus faecium* QD-2

Esta tesis de maestría se realizó bajo la tutoría de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch, en el laboratorio 312 del Conjunto E, del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Amelia Farrés González Sarabia	Facultad de Química, UNAM.
Dr. Adelfo Escalante Lozada	Instituto de Biotecnología, UNAM.

Este proyecto fue financiado por el PAPIIT IN220921: "*Enterococcus* de origen alimentario como fuente de nuevas bacteriocinas con actividad antilisterial", por el PAIP FQ conclave 5000-9102 y se agradece la beca otorgada por el CONACYT.

El jurado asignado:

Camarena Mejía Rosa Laura	Presidente
Ruíz Terán Francisco	Secretario
Aguilar Osorio José Guillermo	Vocal
Bustamante Santillán Víctor Humberto	Vocal
Espín Ocampo Elda Guadalupe	Vocal

CONTENIDO

Lista de Abreviaturas 1

Resumen 2

1 Introducción 4

1.1 Bacterias Lácticas 4

1.2 Bacterias Lácticas en Quesos Artesanales 4

1.3 *Enterococcus* spp 5

1.4 *Enterococcus* en Alimentos Fermentados 6

1.5 Estrés Osmótico en Alimentos 6

1.6 Bacteriocinas 7

1.6.1 Clasificación y Mecanismo de Acción 8

1.6.2 Mecanismo de Acción 11

1.6.3 Biosíntesis e inmunidad 13

1.7 Expresión de Bacteriocinas 15

1.8 Análisis Bioinformático 17

1.9 Promotores, factores sigma y RNA polimerasa 18

1.10 PCR cuantitativa (qPCR) o PCR en tiempo real y RT-qPCR 19

2. Antecedentes 21

2.1 *Enterococcus* no nosocomiales 21

2.2 Detección de la Enterocina A en la cepa QD-2 de *E. faecium* 22

2.3 Secuenciación e información del genoma 23

3. Justificación 24

4. Hipótesis 24

5. Objetivo General 25

5.1 Objetivos Particulares 25

6. Metodología 25

6.1 Análisis Bioinformático 26

6.1.1 Análisis del Contexto Genómico 26

6.1.2 Predicción de Promotores 26

6.1.3 Diseño de Cebadores 26

6.2 Evaluación Fenotípica 27

6.2.1 Reactivación de la Cepa y Análisis de Pureza 27

6.3 Evaluación de la Expresión de Genes 28

6.3.1 Extracción de ARN total 28
6.3.2 Cuantificación y Evaluación de la Calidad de ARN obtenido 28
6.3.3 Análisis De La Expresión De Bacteriocinas 29
7. Resultados y Discusión 30
7.1 Análisis bioinformático 30
7.1.1 Análisis del Contexto Genómico 30
7.1.2 Predicción de Promotores 43
7.2 Evaluación Fenotípica 50
7.2.1 Análisis de Pureza 50
7.2.2. Cinética de Crecimiento de E. faecium QD-2 en presencia de diferentes concentraciones de NaCl 51
7.3 Análisis de Expresión de Genes 52
7.3.1 Extracción de ARN total, Cuantificación y Análisis de su Integridad 52
7.3.2 Análisis de los niveles de transcritos de bacteriocinas putativas mediante RT-qPCR 53
8. Conclusiones 58
9. Referencias 59
10. ANEXOS 69
10.1 Lineamientos para el diseño de cebadores 69
10.2 Metodología para realizar lisis celular por medio de enzimas 70
10.3 Metodología para extracción total de RNA por método de TRIzol 71
10.4 Metodología para electroforesis en gel de agarosa 1%-formaldehído 18% 72
10.5 Cuantificación de ARN extraído de la cepa QD-2 de *E. faecium*. Incubada en medio MRS, a 0%, 3% y 5% NaCl a 37°C 73
10.6 Curvas de amplificación y disociación del gen *rpoA* en diferentes concentraciones de NaCl 75
10.7 Curvas de amplificación y de disociación para el ORF 621, Enterocina A, en diferentes concentraciones de NaCl 77
10.8 Curvas de amplificación y de disociación para los ORFs 615 y 616, Enterocinas no caracterizadas, en diferentes concentraciones de NaCl 79
10.9 Curvas de amplificación y de disociación para los ORFs 901 y 902, Enterocinas no caracterizadas, en diferentes concentraciones de NaCl 80
10.9 Curvas de amplificación y de disociación para los ORFs 901 y 902, Enterocina X cadena α y Enterocina X cadena β, en diferentes concentraciones de NaCl 81

Lista de Abreviaturas

°C: Grados Centígrados (Celcius)
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARN: Ácido ribonucleico
ATP: Adenosín Trifosfato
BAL: Bacterias Ácido Lácticas
DDBJ: Banco de Datos de ADN de Japón (DNA Data Bank of Japan)
D.O.: Densidad Óptica
GRAS (Generally Recognized as Safe)
HPK: Histidina asociada a la membrana
KDa: Kilo Daltones
MRS: Man, Rogosa y Sharpe
NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)
NLM: Biblioteca Nacional de Medicina (National Library of Medicine)
ORF: Marco de lectura abierta (Open Reading Frame)
PIR: Protein Information Resource
RR: Regulador de Respuesta
RT-qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa con Transcriptasa Reversa
SIB: Instituto Suizo de Bioinformática
TDM: Dominio transmembrana

Resumen

El género *Enterococcus* pertenece a las bacterias ácido lácticas (BAL). Son cocos Gram positivos, no formadores de esporas, se presentan en forma de pares o de cadenas cortas, son anaerobios facultativos con metabolismo fermentativo. Utilizan un amplio rango de carbohidratos para producir principalmente L(+) ácido láctico generando un pH final de 4.2 – 4.6. Crecen usualmente entre 10°C y 45°C, siendo 37 °C la temperatura de crecimiento óptimo. Toleran un pH, concentración de NaCl y sales biliares de hasta 9.6, 6.5% y 40%, respectivamente. Sobreviven a un calentamiento de 60 °C durante 30 minutos (Díaz *et al*., 2010).

Los enterococos se encuentran distribuidos en la naturaleza, se hallan en el agua, en algunos alimentos y forman parte de la microbiota intestinal de humanos. Debido a su alta adaptabilidad y a su resistencia a condiciones adversas, los enterococos sobreviven a la producción, almacenamiento y a condiciones de estrés presentes en los alimentos, como el estrés osmótico causado por el NaCl (Hikmate *et al*., 2008). Se encuentran en numerosos quesos regionales, jugando un papel importante en su maduración, desarrollando características sensoriales. Sin embargo, algunos otros, son capaces de provocar infecciones nosocomiales, principalmente en individuos inmunodeprimidos; por lo que es importante mencionar que las cepas hospitalarias se encuentran en un grupo genómico diferente de las cepas aisladas de alimentos (Hikmate *et al*., 2008).

Enterococcus presenta la capacidad de producir bacteriocinas clase II, que se definen como péptidos antimicrobianos, su blanco de acción principal es la membrana citoplasmática donde forman poros, ocasionando pérdidas del material citoplasmático. Las bacteriocinas producidas por enterococos (enterocinas) muestran actividad bactericida contra patógenos como son: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* y *Clostridium tyrobutyricum*, y microorganismos alterantes presentes en los alimentos (Hikmate *et al*., 2008).

La cepa QD-2 fue aislada del Queso Cotija Artesanal, región de origen, de Quitupán (Jal). Por investigaciones anteriores del grupo de trabajo, se sabe que el genoma de esta cepa contiene ocho ORFs con anotación para bacteriocinas putativas. Para conocer su contexto genómico se realizó un análisis bioinformático y posteriormente se hizo la búsqueda del posible promotor para cada ORF con anotación de bacteriocina putativa. Mediante RT-qPCR se analizó la expresión de los ORFs que contaron con un posible promotor funcional y un contexto genómico característico a un operón de bacteriocina. Para conocer si la transcripción se veía alterada por el estrés osmótico que genera el NaCl en los alimentos fermentados, la cepa se cultivó en caldo MRS con diferentes concentraciones de NaCl (0%, 3% y 5% NaCl) y se estudió la expresión de los genes putativos de bacteriocinas.

Los resultados sugieren que de los ocho ORFs con anotación para bacteriocinas putativas codificados en el genoma de la cepa QD-2, tres tendrían promotores funcionales: 615, 621 y 901. El ORF 621 codifica para la enterocina A, ampliamente estudiada. Los genes 615 y 616 fueron los que mostraron mayor expresión y los genes 901 y 902 se expresaron en menor proporción. Ambos pares de genes posiblemente se encuentren en operones bicistrónicos. Finalmente, los cinco se expresan independientemente de la concentración de NaCl.

ABSTRACT

The genus *Enterococcus* belongs to the group of lactic acid bacteria (LAB). They are Gram-positive cocci, non-spore-forming, present in diplococci or short streptococci, and are facultative anaerobic with fermentative metabolism. They ferment a wide range of carbohydrates with production mainly of L (+) lactic acid generating a final pH of 4.2 – 4.6. Usually grow in broth from 10 °C to 45 °C, although the optimal growth is at 37 °C. These bacteria tolerate a pH, NaCl concentration, and bile concentration of up to 9.6, 6.5%, and 40% respectively. Finally, they survive 60 °C heating for 30 minutes (Díaz *et al.,* 2010).

Enterococci are distributed and found in nature, as in water, and some foods, and are part of the normal intestinal microbiota of humans. Due to their high adaptability and resistance to adverse conditions, enterococci survive production, storage, and stress conditions present in food, such as osmotic stress caused by NaCl. (Hikmate *et al.*, 2008). They are found in numerous regional cheeses, playing an important role in their maturation and developing sensory characteristics. However, some others are capable of causing nosocomial infections mainly in immunosuppressed individuals, so it is important to mention that the latter are in a different genomic group from food isolates (Hikmate *et al.,* 2008).

Enterococcus has technological properties of interest due to its ability to produce class II bacteriocins, which are defined as antimicrobial peptides, its main target of action is the cytoplasmic membrane where they form pores causing leakage of selective ions that influence the motive force of protons and the reduction of intracellular ATP, the leakage of intracellular substrates and, ultimately, cell death. The bacteriocins produced by enterococci (enterokinase) show bactericidal activity against pathogens such as *Listeria. monocytogenes*, *Staphylococcus. aureus*, *Bacillus. cereus,* and *Clostridium tyrobutyricum*, and spoilage microorganisms present in food (Hikmate et al., 2008).

The QD-2 strain was isolated from Artisanal Cotija Cheese, region of origin, from Quitupán (Jal). From previous research by the working group, it is known that the genome of this strain contains eight ORFs with annotation for putative bacteriocins. To know its genomic context, a bioinformatic analysis was performed and subsequently a search was made for the possible promoter for each ORF with putative bacteriocin annotation. Using RT-qPCR, the expression of the ORFs that had a possible functional promoter and a genomic context characteristic of a bacteriocin operon was analyzed. To find out if transcription was altered by the osmotic stress generated by NaCl in fermented foods, the strain was grown in MRS broth with different concentrations of NaCl (0%, 3% and 5% NaCl) and the expression of putative bacteriocin genes.

The results suggest that of the eight ORFs with annotation for putative bacteriocins encoded in the genome of strain QD-2, three would have functional promoters: 615, 621 and 901. ORF 621 encodes the widely studied enterocin A. Genes 615 and 616 were those that showed the highest expression and genes 901 and 902 were expressed in a lower proportion. Both gene pairs are possibly located in bicistronic operons. Finally, all five are expressed independently of the NaCl concentration.

1 Introducción

1.1 Bacterias Lácticas

Las bacterias ácido lácticas están estrechamente relacionadas filogenéticamente, son cocos o bacilos Gram positivos que pueden fermentar carbohidratos como principal fuente de carbono, (Mozzi, 2016; Wang *et al*., 2021). De acuerdo al tipo de fermentación de carbohidratos que llevan a cabo, se clasifican en homofermentativas (produce sólo ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico, CO_2, etanol y/o ácido acético) (Carr *et al*., 2002; Monroy & Fernández , 2009).

Este grupo de bacterias incluye más de 60 géneros, son responsables de procesos de fermentación en alimentos, se encuentran en productos lácteos, productos cárnicos, pescados, frutas, verduras y cereales. Su principal aplicación es como cultivos iniciadores en alimentos fermentados (yogurt, quesos, salchichas, pan y cerveza) y los géneros más frecuentes en la fermentación de alimentos son: *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Enterococcus* y *Weisella*, entre otros (Wang *et al*., 2021; Wang & Wang, 2014; Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010).

Al fermentar los carbohidratos disponibles contribuyen a la conservación de los alimentos, ya que generan un descenso en el pH por la producción de ácido láctico, éste es su principal mecanismo antimicrobiano. Sin embargo, algunas BAL pueden producir sustancias antagonistas contra otras bacterias, como las bacteriocinas, que actúan contra microorganismos patógenos y de deterioro (Vásquez *et al.*, 2009).

En la industria alimentaria, la degradación de las proteínas por parte de las bacterias del ácido láctico puede eliminar los alérgenos proteicos de los alimentos. Especialmente en el proceso de fermentación de productos lácteos, las BAL pueden degradar la caseína, lo que reduce la alergenicidad de la misma. Por ejemplo, ciertas cepas de *E. faecium* aisladas de leche y queso fermentados pueden expresar metaloproteasas o proteinasas que pueden hidrolizar eficazmente la caseína de la leche. Las bacterias del ácido láctico pueden mejorar la digestibilidad de las proteínas en los alimentos aumentando así el valor nutricional de las mismas (Wang *et al*., 2021).

Las BAL pertenecientes a los géneros *Lactococcus, Oenococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pedicoccus* y algunas de *Streptococcus* se consideran GRAS (Generally Recognized as Safe); sin embargo, las especies del género *Enterococcus* y algunas especies de *Streptococcus* pueden ser patógenas, lo que genera preocupación respecto a su inocuidad, ya que presentan factores de virulencia y resistencia a una variedad de antibióticos, por lo tanto, no se consideran GRAS (Coelho, Malcata, & Silva, 2022).

1.2 Bacterias Lácticas en Quesos Artesanales

Los quesos artesanales suelen fabricarse a partir de leche cruda en ranchos o pequeñas queserías, siguiendo protocolos poco estandarizados. Se distinguen por sus características de sabor y generalmente se asocian a una región o país en particular. Estos quesos exhiben una microbiota compleja, caracterizada por la presencia de diferentes microorganismos entre ellos las bacterias ácido lácticas.

Las BAL añadidas inicialmente o las que se encuentran como parte de la microbiota natural de la leche y productos lácteos, juegan un papel importante en la fabricación de quesos tradicionales de leche cruda, debido a que tienen la capacidad de liberar proteasas y lipasas que colaboran en el desarrollo de características sensoriales durante la maduración del queso, generando sabores y aromas únicos. En productos lácteos, especificamente en la fermentación de quesos, las funciones más importantes de las BAL son: (i) hidrólisis de la lactosa en monosacáridos de bajo peso molecular; galactosa y glucosa, que promueven la formación del sabor del queso; (ii) la degradación de las proteínas en péptidos y aminoácidos libres; y (iii) la descomposición de los lípidos en ácidos grasos. Por actividad de la lactasa, las proteasas y lipasas se liberan compuestos volátiles que contribuyen en la formación de sabores y olores distintivos del queso. (Coelho, *et al*., 2022; Jie *et al*., 2020; Ramírez *et al.* , 2011).

Las comunidades bacterianas difieren entre los quesos de leche cruda según el proceso de fabricación, pero las bacterias en el núcleo del queso están dominadas por BAL pertenecientes a los géneros *Lactococcus, Lactobacillus, Enterococcus, Streptococcus y Leuconostoc* (Coelho *et al.,* 2022; Giraffa, 2003).

Los enterococos forman parte de la microbiota subdominante de varios tipos de quesos artesanales y contribuyen en el desarrollo de sabores y aroma durante la maduración del mismo. (Amadi & Hanifian, 2022).

1.3 *Enterococcus* spp

Los enterococos son cocos Gram-positivos que se presentan solos, en pares o en cadenas cortas y son anaerobios facultativos, no forman esporas y son catalasa negativos. Pueden crecer en presencia de NaCl en concentraciones de hasta 6.5% y en un rango de temperaturas entre 10°C y 45°C, siendo 37°C su temperatura óptima de crecimiento, en un intervalo de pH de 4 a 9.6 y en presencia de hasta un 40 % de sales biliares. No se eliminan por completo mediante la pasteurización baja, ya que sobreviven a 60 °C durante 30 minutos (Coelho *et al*., 2022; Díaz *et al.*, 2010; Foulquié-Moreno *et al*., 2006; Giraffa, 2003; Franz *et al*., 2003).

Se encuentran en una gran variedad de ambientes, tales como suelo, agua, plantas y el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Comúnmente se encuentran en productos lácteos, principalmente en quesos producidos con leche cruda, siendo *E. faecalis* y *E. faecium* las especies predominantes (Coelho *et al.,* 2022).

Su presencia en alimentos fermentados ha causado cierta controversia, ya que dentro de los enterococos se encuentran cepas patógenas que causan infecciones nosocomiales, lo que ha provocado una limitación en su uso como cultivos iniciadores o probióticos; sin embargo, se ha demostrado que las infecciones adquiridas en hospitales no son causadas por cepas de *E. faecium* que normalmente residen en alimentos, sino por cepas específicas que se adquieren a través del material de curación durante la hospitalización. Además, estudios han revelado que cepas aisladas de alimentos especialmente cepas de *E. faecium*, son sensibles a los antibióticos clínicamente relevantes, como penicilina, ampicilina, estreptomicina y vancomicina (Amadi & Hanifian, 2022; Palmer *et al.,* 2014; Baumgartner *et al*., 2001**;** Franz *et al*., 2001**;** Aarestrup *et al*., 2002).

1.4 *Enterococcus* en Alimentos Fermentados

Los enterococos juegan un papel importante en el proceso de fermentación de los quesos tradicionales, sus características metabólicas no solo contribuyen al desarrollo de las características sensoriales deseables de los productos alimenticios, sino también a mejorar el valor nutricional de la materia prima al hidrolizar proteínas haciéndolas más biodisponibles (Coelho *et al.,* 2022).

Se pueden encontrar en las materias primas empleadas para la elaboración de alimentos (especialmente los de origen cárnico y lácteo). El género *Enterococcus* está formado por 32 especies, las más comúnmente encontradas en quesos son *E. faecalis, E. faecium, E. durans* y *E. casseliflavus* (Giraffa, 2003). La fuente principal de enterococos en quesos es la leche, el agua, los equipos de ordeña y los tanques de almacenamiento (Zarzecka *et al*., 2022; Hikmate *et al.*, 2008; Gelsomino *et al*., 2002).

Especies de *Enterococcus* han sido frecuentemente identificadas como productoras de bacteriocinas clase II, se ha reportado que cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* pueden producir bacteriocinas, llamadas enterocinas, las cuales tienen como blanco de acción principal la membrana citoplasmática (Cleveland *et al.,* 2001). Estudios previos han demostrado que las enterocinas exhiben una fuerte actividad antimicrobiana contra patógenos importantes transmitidos por los alimentos, incluidos *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica*, así como contra microorganismos de deterioro (Giraffa, 1995**;** Franz *et al*., 1996**;** Maisnier-Patin *et al*.,1996**;** Laukova & Czikkova, 2001**;** Sarantinopoulos *et al.,* 2002).

1.5 Estrés Osmótico en Alimentos

Los enterococos son uno de los grupos de bacterias más comunes en los alimentos, debido principalmente a su alta adaptabilidad y a su resistencia a condiciones adversas durante la producción y almacenamiento de los mismos. Uno de los factores de estrés más común en los alimentos es el estrés osmótico asociado a la presencia de NaCl. La sal originalmente se usó en la conservación de alimentos para reducir y prevenir el crecimiento microbiano (Zarzecka *et al*., 2022).

El NaCl modifica el balance osmótico del ambiente que rodea a una bacteria, en estas condiciones de baja actividad acuosa, el microorganismo pierde agua para reestablecer el equilibrio osmótico. La pérdida de agua resulta en una reducción de la actividad metabólica, deteniéndose el crecimiento de la bacteria ocasionando que el microorganismo entre en éstres. Una alta concentración de NaCl puede ejercer un efecto deshidratante sobre los microorganismos y esta pérdida de agua de las células resulta en una mayor inactivación celular (Martin A., 2002)

Se ha reportado que el cloruro de sodio influye en la producción de biomasa así como en la producción de bacteriocinas específicas, tanto en cepas de *Lactobacillus y Enterococcus* aisladas de diferentes nichos como son salchichas fermentadas, aceitunas, contenido intestinal de pejerrey (*Odontesthes* sp.), entre otros (Leroy & de Vuyst, 1999; Leroy, *et al.,* 2003; Vallejo *et al*., 2014).

Es importante mencionar que a los quesos artesanales se les añade NaCl en una concentración que va de 2% al 5%.

1.6 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana de baja masa molecular, sintetizados por los ribosomas bacterianos y generalmente están codificadas por genes localizados en plásmidos, aunque también hay genes cromosómicos. Estos péptidos por lo regular exhiben un espectro inhibidor estrecho contra bacterias taxonómicamente cercanas a la cepa productora, aunque algunas tienen actividad de amplio espectro, es decir, tienen capacidad antimicrobiana contra cepas no relacionadas filogenéticamente. Su producción es durante o al final de la fase logarítmica del crecimiento bacteriano (Vásquez *et al.,* 2009). Son producidas por algunas cepas de diferentes especies bacterianas, incluidas las BAL, de las cuales, son el grupo de bacteriocinas más diverso y conocido, son estables a amplios rangos de pH, son resistentes a tratamientos térmicos, son péptidos catiónicos y tienen propiedades hidrófobas o anfifílicas, en la mayoría de los casos, su objetivo blanco es la membrana citoplasmática. Pueden presentan diferentes mecanismos de acción que incluyen la formación de poros en la membrana celular o la inhibición de la síntesis de la pared celular. La cepa productora es inmune a sus bacteriocinas debido a la producción de una proteína de inmunidad. La mayoría de las bacteriocinas que son producidas por las BAL, especialmente aquellas que inhiben las bacterias Gram-positivas, ejercen sus efectos antimicrobianos formando poros en la membrana de la célula diana, agotando así el potencial transmembrana y/o el gradiente de pH, lo que conduce a la pérdida del contenido celular, ocasionando la muerte de la célula (Figura 1). (Kumar *et al.,* 2022; Coelho *et al*., 2022; Punia *et al*., 2022; Liu *et al*., 2019; Chikindas *et al.,* 2018; Olvera *et al.,* 2015; Sushida *et al*., 2008; McAuliffe *et al*., 2001).

Las bacteriocinas constituyen un mecanismo de defensa especial de las bacterias, que puede inhibir el crecimiento de otras bacterias y permitir que la bacteria productora obtenga una ventaja competitiva, lo que es de gran importancia para mantener el equilibrio de la microbiota en el entorno ecológico. Las bacteriocinas se secretan para matar o restringir el crecimiento de las células vulnerables que compiten por los nutrientes dentro del mismo ecosistema (Kumar *et al.,* 2022; Wu *et al*., 2022).

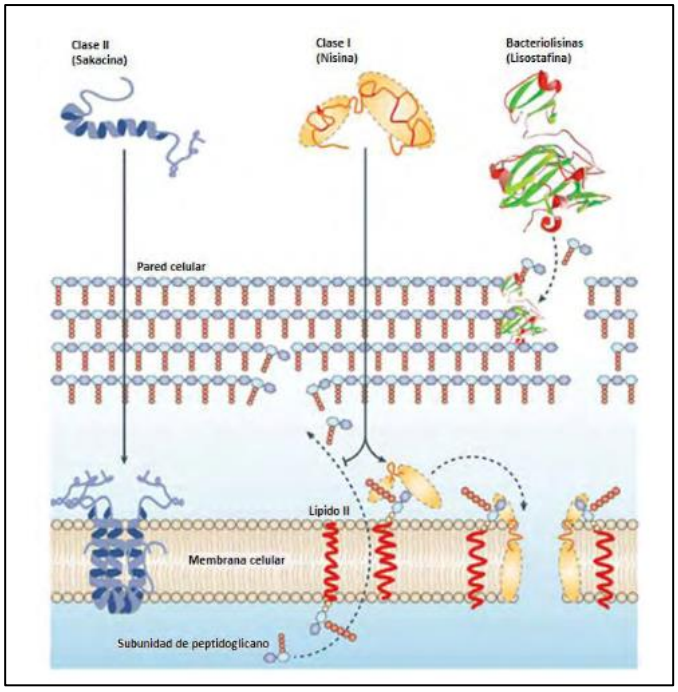


Figura 1. Modo de acción de diferentes clases de bacteriocinas, donde se observa que las bacteriocinas pueden formar poros en la membrana celular o puede intervenir en la síntesis correcta de la pared celular.
Cotter *et al*., 2005

Las bacteriocinas son excretadas al medio extracelular, generalmente las de clase II son excretadas utilizando el sistema de transporte de secuencia guía de doble glicina a través de un transportador ABC, algunas otras son excretadas por el sistema Sec, (Wang *et al.,* 2021).

Las bacteriocinas son sensibles a las proteasas digestivas como la pancreatina, la tripsina y la quimotripsina y, por lo tanto, no tienen efectos negativos sobre la microbiota intestinal del organismo que las consuma, debido a esto y a que no son tóxicas para las células eucariotas, las bacteriocinas generalmente se consideran moléculas seguras (Coelho, *et al.,* 2022).

Las bacteriocinas de BAL se han utilizado como conservadores de alimentos debido a su termoestabilidad y seguridad. La nisina es la única bacteriocina utilizada comercialmente y mejor estudiada, tiene una alta actividad antibacteriana contra una amplia gama de bacterias Gram positivas (Zhang *et al*., 2022).

1.6.1 Clasificación y Mecanismo de Acción

Clasificación

Existen varios esquemas de clasificación basados en las características bioquímicas y estructurales de las bacteriocinas. Anteriormente se sugirió un sistema de clasificación que divide las bacteriocinas de BAL en cuatro grupos: (i) bacteriocinas de clase I o lantibióticos,

(ii) la clase II incluye péptidos pequeños estables al calor sin residuos de lantionina, (iii) la clase III comprende proteínas termolábiles grandes, (iv) la clase IV está compuesta por péptidos grandes que forman complejos con carbohidratos o lípidos. Cotter *et al.* (2005) realizaron una modificación completa del esquema de clasificación de Klaenhammer y agruparon las bacteriocinas en solo dos categorías: lantibióticos (clase I) y bacteriocinas que no contienen lantionina (clase II). También sugirieron que los péptidos termolábiles de alto peso molecular (anteriormente clase III) deberían designarse como "bacteriolisinas", y la clase IV anterior debería eliminarse (Zhang *et al.,* 2022; Wang *et al.,* 2021).

***Clase I o lantibióticos*:** Se producen como péptidos precursores que sufren extensas modificaciones postraduccionales, son péptidos de 19 a 38 aminoácidos de longitud (<5 kDa), con poca estabilidad al calor y son modificados postraduccionalmente por la deshidratación de la serina y la treonina formando aminoácidos como dehidroalanina y dehidrobutirina, los cuales se unen a través de un grupo tioetér a cadenas laterales de cisteína dando lugar a los aminoácidos lantionina y β-metil-lantionina. Estos residuos forman puentes covalentes entre los aminoácidos, formando “anillos” internos que le brindan a los lantibióticos sus características estructurales (Figura 2) (Zhang *et al.,* 2022).

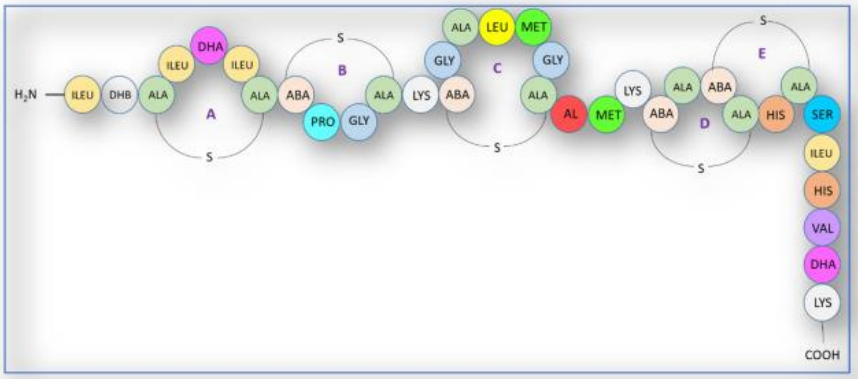


Figura 2. Formación de anillos estructurales de bacteriocinas clase I.
Fuente: Punia *et al*., 2022

Presentan un amplio espectro de inhibición. No sólo inhiben bacterias cercanamente relacionadas filogenéticamente, como *Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus* y *Streptococcus*, sino también, a bacterias menos relacionadas como *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* y *Clostridum botulinum* (Chen & Hoover, 2003).

Clase II o no lantibióticos:

Suelen ser pequeñas (<60 aminoácidos, <10 kDa), no contienen lantionina, son estables al calor, algunas soportan temperaturas de 100-121°C/15-30 minutos. No sufren modificaciones postraduccionales extensas, su modificación postraduccional consiste en el corte del péptido líder durante el transporte hacia el exterior de la célula. A menudo se sintetizan como prebacteriocinas ya que contienen una secuencia líder que se escinde durante la secreción, consta de 14-30 aminoácidos, con un sitio conservado de dos residuos

de glicina unidos por puente disulfuro que estabiliza su estructura de lámina β. El péptido líder es casi exclusivamente del tipo llamado doble glicina con excepciones para algunas bacteriocinas que usan una secuencia de señal Sec para la secreción. Disponen de un amplio rango de actividad inhibitoria contra bacterias que disminuyen la vida de anaquel del producto, así como contra patógenos, tales como, *L. monocytogenes, B. cereus, Staphylococcus* spp *y Clostridium* spp*.* (Zhang *et al*., 2022; Braïek & Smaoui, 2019; Franz *et al*., 2007).

Las bacteriocinas de clase II se dividen en cuatro subcategorías:

Clase IIa: Se conocen como péptidos similares a la pediocina. Conservan una secuencia consenso llamada caja pediocina, su actividad antimicrobiana se ve afectada negativamente por la ausencia de ésta (KYYGNGVXaaC, donde Xaa indica cualquier residuo de aminoácido) y se ubica en el extremo N-terminal (Nes *et al.*, 2013). Este extremo conservado se caracteriza por tener una estructura de lámina β y es responsable de la unión de la bacteriocina a la superficie de las células sensibles. Estas bacteriocinas son activas contra especies de *Listeria*, como *L. monocytogenes, L innocua* y *L. ivanovii* (Chen & Hoover, 2003).

Se sintetizan primero como prebacteriocinas, contienen una secuencia líder de 15 – 30 residuos de aminoácidos, la mayoría presenta una doble glicina río arriba del sitio de escisión. Se cree que el péptido líder sirve como secuencia señal para el procesamiento y secreción de bacteriocinas por un sistema de transporte ABC y una proteína accesoria. Se postula que las proteínas accesorias facilitan la translocación de la membrana y/o ayudan en el procesamiento del péptido líder. Para algunas bacteriocinas de clase IIa, la proteína accesoria asegura la formación correcta de enlaces disulfuro, tienen al menos un enlace disulfuro.

Clase IIb: Son bacteriocinas de dos péptidos; requieren de dos péptidos diferentes para una actividad óptima, por lo tanto, se considera que las bacteriocinas de dos péptidos funcionan juntas como una entidad antibacteriana. Se sintetizan como péptidos precursores (tienen péptido líder de tipo GG en extremo N-terminal). Contienen el motivo GXXXG (Hu *et al.,* 2010).

Clase IIc: Bacteriocinas circulares cuya estructura de anillo se forma uniendo cabeza y cola. Tienen péptido líder que oscilan entre 2-35 aminoácidos, no comparten similitud de secuencia, no tiene sitio de reconocimiento común para el corte del péptido líder.

Los sitios de ligación de las bacteriocinas circulares están ubicados dentro de una estructura hélice, que consiste principalmente de tramos de residuos hidrofóbicos. Las bacteriocinas de clase IIc tienen poca similitud de secuencia pero comparten patrones estructurales similares de disposición globular de cuatro o cinco hélices (Zhang *et al*., 2022).

Clase IId: Bacteriocinas que no tienen similitud de secuencia significativa con las otras bacteriocinas de clase II. No tienen péptido líder, se activan inmediatamente después de su proceso de traducción y no requieren proteína accesoria para su transporte, (Zhang *et al*., 2022).

1.6.2 Mecanismo de Acción

La mayoría de las bacteriocinas de las BAL inhiben el crecimiento de las bacterias mediante la formación de poros en la membrana celular provocando fuga de iones selectivos que influyen en la fuerza motriz de protones y la reducción del ATP intracelular, la fuga de sustratos intracelulares y, en última instancia, la muerte celular (Kumar *et al.,* 2022; Zhang *et al.,* 2022). La formación de poros se inicia con la atracción de las bacteriocinas hacia la bacteria diana a través de fuerzas electrostáticas, debido a que las bacteriocinas están cargadas positivamente e interactúan con los fosfolípidos de la membrana de las bacterias que se encuentran cargados negativamente. La unión de las bacteriocinas con las bacterias diana se da entre la región N-terminal de la bacteriocina (región hidrofílica) con la superficie polar de la membrana celular. Una vez unida la bacteriocina a la bacteria, la región C-terminal (región hidrofóbica) penetra hacia el interior no polar de la membrana celular (Heredia *et al.,* 2017).

Las bacteriocinas pueden interactuar con receptores específicos de células bacterianas, incluido el lípido II y otros precursores de la pared celular, como la undecaprenil pirofosfato fosfatasa, el sistema fosfotransferasa de manosa, el transportador ABC de maltosa o una metalopeptidasa dependiente de Zn (Wu *et al*., 2022).

La clase I pueden actuar de dos formas: (i) se enlazan al lípido II de la membrana plasmática o, (ii) pueden utilizarlo como molécula de acoplamiento. El lípido II es el mayor transportador de subunidades de peptidoglucano del citoplasma a la pared celular, y al enlazarse, la bacteriocina evita la síntesis correcta de la pared, lo cual tiene como consecuencia la muerte celular. Así mismo, al utilizar al lípido II como molécula de acoplamiento, logran insertarse en la membrana e iniciar la formación de poros, lo que conduce a una disipación del potencial de membrana y la salida de metabolitos pequeños, provocando una muerte rápida (Figura 3). La nisina secretada por *Lactococcus lactis* es la primera bacteriocina identificada en el grupo de las lantioninas. Su mecanismo de acción consiste en provocar la formación de pequeños poros en la membrana plasmática de las bacterias Gram positivas, lo que provoca daño celular (Wang *et al.,* 2021; Rehaiem *et al.,* 2010).

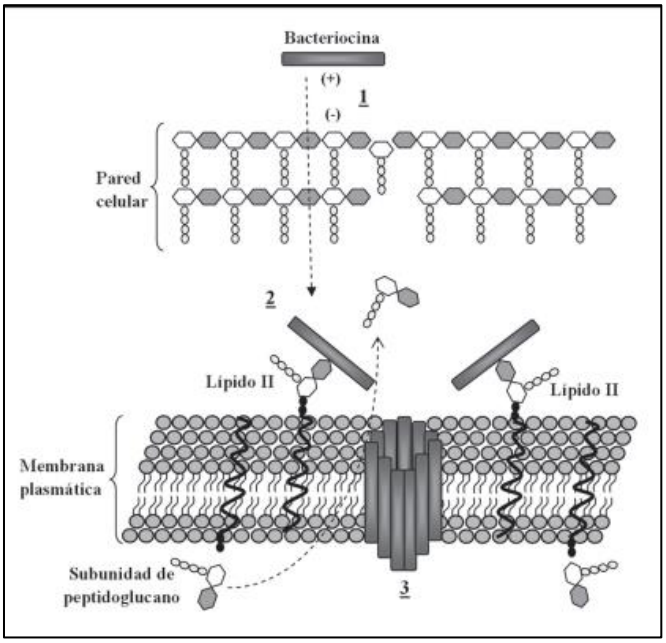


Figura 3. Esquema del mecanismo de acción de bacteriocinas clase I, específicamente nisina. 1) La nisina posee una carga neta positiva que incrementa su interacción con las cargas negativas de los componentes de la pared celular. 2) La nisina se une al lípido II, interfiriendo con la síntesis de la pared celular. 3) Varias moléculas de nisina utilizan el lípido II para anclarse e incrustarse en la membrana celular.
López *et al*., 2008.

La mayoría de las enterocinas de clase II pueden inducir la permeabilización de la membrana de células diana. Varias bacteriocinas de clase II (pediocina PA-1, sakacina P, lactococina A) utilizan el receptor Man-PTS, un sistema de transporte utilizado para la importación y la fosforilación de azúcares (Figura 4). La enzima EII, es un complejo de carbohidratos y tres proteínas (AB, C y D), y representa el blanco de estas bacteriocinas. La interacción de la misma con el Man-PTS da como resultado una apertura permanente de este receptor y, por lo tanto, una salida continua e incontrolada de moléculas intracelulares (Wu *et al.,*2022).

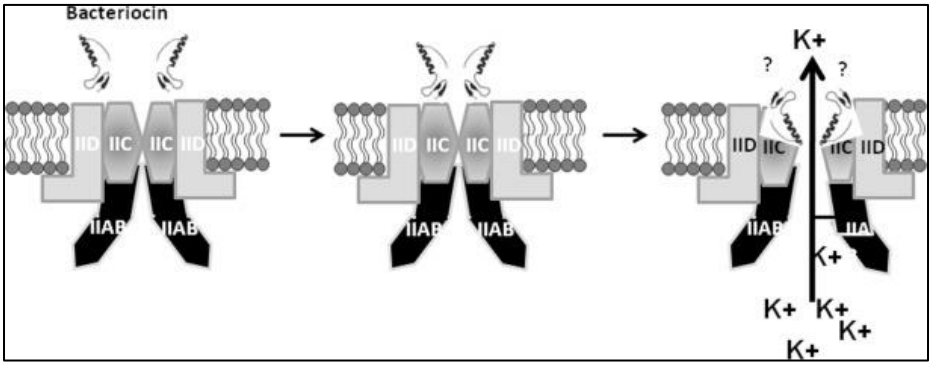


Figura 4. Mecanismo de acción de algunas bacteriocinas clase IIa. Se muestra la unión de una bacteriocina clase IIa a su receptor y al complejo embebido en la membrana, ManCD (IIC y IID) del transportador Man-PTS. Esta unión abre irreversiblemente el poro y permite la libre difusión de iones.
Nes *et al.,* 2013

Las bacteriocinas de dos péptidos (clase IIb), hacen que la membrana de las bacterias sensibles sea permeable a un grupo seleccionado de iones, lo que indica que las bacteriocinas forman poros que muestran especificidad con respecto al transporte de moléculas. Con base en estudios de estructura-función, se ha propuesto que los dos péptidos de las bacteriocinas clase IIb forman una estructura hélice-hélice que penetra la membrana e involucra motivos GxxxG. También se ha sugerido que la estructura hélice-hélice que penetra en la membrana interactúa con una proteína integrada a la membrana, lo que desencadena una alteración conformacional en la proteína, que a su vez provoca la fuga de iones. Los estudios revelaron que las bacteriocinas muestran especificidad con respecto a qué moléculas pequeñas conducen a través de las membranas y que las bacteriocinas difieren en sus especificidades (Nissen *et al*., 2010)

1.6.3 Biosíntesis e inmunidad

La síntesis de bacteriocinas está controlada por genes situados en el ADN cromosómico o bien en plásmidos (Punia *et al.,* 2022). Las cepas productoras de bacteriocinas están protegidas de la actividad de sus propios productos por los sistemas de inmunidad, cuyos genes codificantes generalmente se encuentran en los operones de los genes estructurales; sin embargo, las bacteriocinas relacionadas pueden exhibir inmunidad cruzada, como se observa para algunas subclases IIa y subclases IIb. Las proteínas de inmunidad se han detectado ancladas a la superficie de la membrana o incrustadas en la misma (Figura 5) (Bierbaum & Sahl, 2009; Dubois *et al*., 2009; Fimland *et al*., 2002).

La bacteriocina de clase IIa se sintetiza primero en los ribosomas como una prebacteriocina, que contiene una secuencia líder N-terminal para mantener el péptido inactivo (Figura 5). Los péptidos líderes contienen de 15 a 30 residuos, la mayoría de los cuales presentan residuos de doble glicina río arriba del sitio de escisión. Se cree que el líder sirve como secuencia señal para el procesamiento y secreción de la bacteriocina por un sistema que comprende un transportador ABC y una proteína accesoria. La proteína transportadora ABC contiene el dominio de unión a ATP C-terminal y el dominio transmembrana N-terminal embebido en la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática. La región N-terminal escinde el péptido líder en el motivo de doble glicina. La unión de la prebacteriocina con el dominio

proteolítico N-terminal desencadena la hidrólisis de ATP y los cambios conformacionales posteriores del transportador, lo que da como resultado la escisión del péptido líder y la translocación de la bacteriocina madura a través de la membrana. Se reporta que la proteína accesoria facilita la translocación de la bacteriocina y/o ayudan en el procesamiento del péptido líder. Para algunas bacteriocinas de clase IIa, la proteína accesoria asegura la formación correcta de enlaces disulfuro. Sin embargo, no todas las bacteriocinas de clase IIa se transportan a través del transportador ABC. Algunas bacteriocinas, incluidas la enterocina P, la bacteriocina 31 y la enterocina SE-K4, carecen del motivo de doble glicina y se exportan mediante un sistema de translocación dependiente de Sec. Estas bacteriocinas tienen un líder dependiente de Sec en el extremo hidrofóbico N-terminal para dirigir la secreción de las prebacteriocinas. El líder es eliminado por una peptidasa señal durante la translocación (Zhang *et al*., 2022).

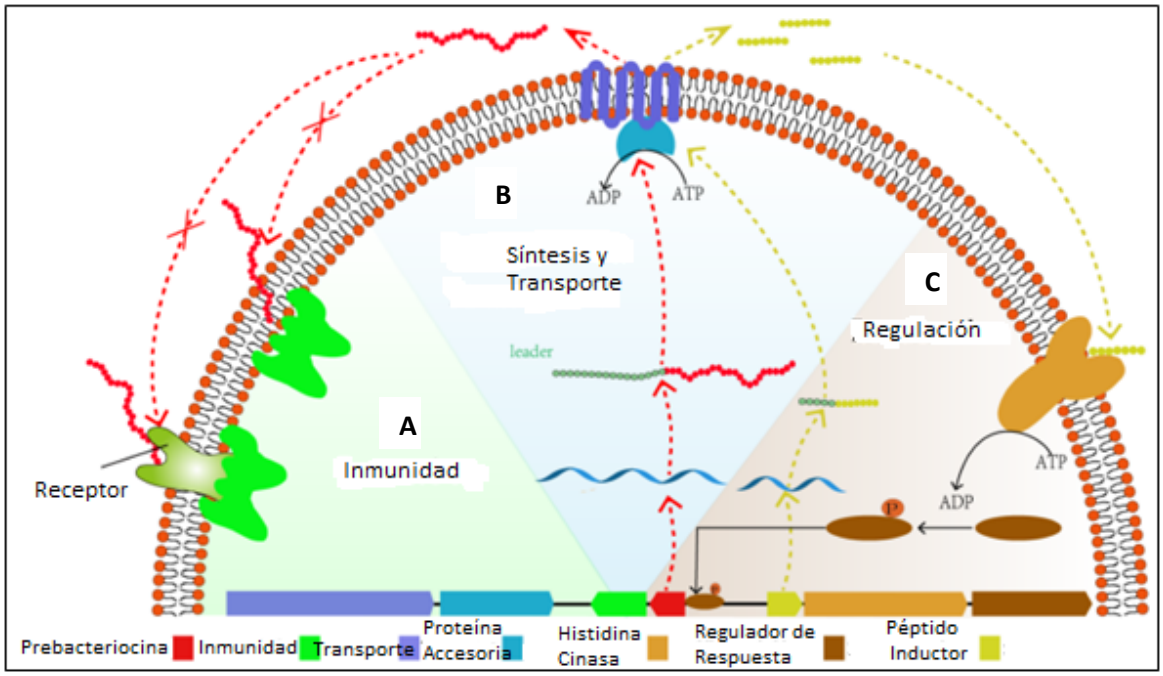


Figura 5. A) Diagrama esquemático de inmunidad para bacteriocinas IIa; se proponen dos modelos con respecto al mecanismo de la proteína de inmunidad, B) Diagrama esquemático de biosíntesis; el péptido inductor y la prebacteriocina son sintetizados con una secuencia lider que es escindida por el transportador ABC, C) Diagrama esquemático de regulación de bacteriocinas mediante un sistema de tres componentes (Zhang *et al.,* 2022).

La síntesis de bacteriocinas de clase IIa suele estar regulada por un sistema de detección de quórum (QS) que consta de tres componentes; un péptido inductor, una proteína cinasa de histidina asociada a la membrana (HPK) y un regulador de respuesta citoplasmática (RR). El péptido inductor se sintetiza inicialmente como un prepéptido con una secuencia líder, que se escinde tras la secreción por el transportador ABC. La concentración de péptido inductor aumenta junto con el crecimiento celular. Una alta concentración del péptido inductor activa el sistema al desencadenar la autofosforilación de HPK, que

transfiere un grupo fosfato al RR. El regulador de respuesta fosforilado actúa como un activador transcripcional y activa la expresión del grupo de genes biosintéticos (Figura 5). Además, los parámetros ambientales pueden influir en la producción de bacteriocina de clase IIa actuando sobre el sistema regulador de bacteriocina o afectando la unión del péptido de inducción a la HPK (Zhang *et al.,* 2022).

Las bacterias productoras de bacteriocinas evitan la muerte por sus propias bacteriocinas a través de la coexpresión de proteínas de inmunidad. Las proteínas de inmunidad para las bacteriocinas de clase IIa varían de 81 a 115 aminoácidos de longitud y muestran una variación sustancial en sus secuencias. La región C-terminal está involucrada en el reconocimiento específico de sus bacteriocinas relacionadas. Sin embargo, se observó "inmunidad cruzada" contra otras bacteriocinas de clase IIa. Actualmente se proponen dos modelos con respecto al mecanismo de inmunidad: (i) La proteína de inmunidad interactúa directamente con la bacteriocina para obstruir la formación de poros; (ii) se une al lado citoplásmico del receptor bloqueando su capacidad para interactuar con la bacteriocina (Figura 5) (Zhang *et al.,* 2022).

Para el caso de las bacteriocinas de clase IIb, se sintetizan como péptidos precursores, contienen péptido lider tipo doble glicina en extremo N-terminal, el cual se escinden durante la maduración. El transportador tipo ABC y una proteína accesoria conducen a la escisión del prepéptido inactivo con la exportación concomitante de la bacteriocina madura a través de la membrana citoplasmática. La producción de bacteriocinas de clase IIb conocidas hasta ahora están reguladas por un sistema regulador de tres componentes.

El mecanismo de cómo las proteínas de inmunidad protegen a las células productoras de las bacteriocinas de clase IIb no se ha elucidado por completo. Hasta ahora, se predice que todas las proteínas de inmunidad para este tipo de bacteriocinas contienen dominios transmembrana (TMD). Sin embargo, varían en longitud, número de TMD y orientación a través de la membrana. La amplia variedad estructural de las proteínas de inmunidad puede atribuirse al hecho de que las bacteriocinas de clase IIb adoptan diferentes receptores como moléculas objetivo (Zhang et al., 2022).

1.7 Expresión de Bacteriocinas

Los estudios moleculares revelan que casi todos los determinantes genéticos de las bacteriocinas se agrupan en operones. Los operones de bacteriocinas se han encontrado en tres lugares diferentes: en el cromosoma bacteriano, en plásmidos y en transposones. Muchas veces los operones son inducibles y necesitan la secreción y acumulación extracelular de péptidos inductivos que son péptidos cortos liberados por la cepa bacteriana productora de bacteriocina. La producción de bacteriocinas depende con frecuencia de factores ambientales como la temperatura, el pH, etc (Wu *et al.,*2022; Kumar *et al.,* 2022).

El operón bacteriocina en general está conformado de al menos cuatro genes necesarios para la producción de la misma: (i) gen estructural, que codifica una pre-bacteriocina, que se procesa durante su secreción, este proceso es necesario para que la bacteriocina pueda ser activa; (ii) gen de inmunidad, que codifica una proteína que protege a la cepa productora de la acción antimicrobiana de su propia bacteriocina; (iii) gen que codifica para el transportador ABC necesario para la secreción; y (iv) gen que codifica una proteína accesoria. Tres componentes más pueden estar presentes en algunos sistemas: (i) péptido inductor (feromona sintetizada ribosomalmente); (ii) proteína histidina cinasa (HK), proteína

de membrana que detecta la presencia de la feromona; y (iii) el regulador de respuesta (RR), que actúa como factor de transcripción y es modulado por la HK (Figura 6), (Drider *et al.,* 2006; Snyder & Worobo, 2014; Sushida *et al.,* 2018).

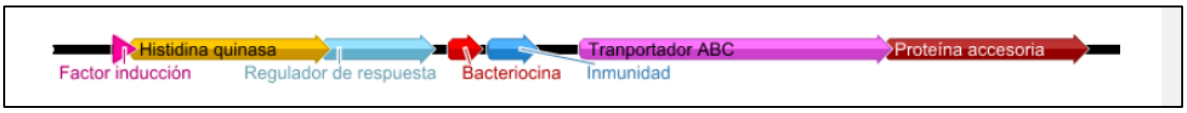


Figura 6. Esquema general de la organización genética del operón bacteriocina, donde se observan los genes que pueden estar presentes en el mismo (Aristimuño, 2015).

El contexto genómico de las bacteriocinas IIa está conservado, normalmente tienen un operón que codifica transportadores ABC y sus proteínas accesorias. Los genes estructurales de la bacteriocina generalmente se encuentran en un pequeño operón junto con el gen de inmunidad. Y tres genes que codifican el sistema regulador están ubicados en otro operón, en dónde los dos genes que codifican HK y RR siguen al gen que codifica al péptido inductor (Figura 7) (Zhang *et al*., 2022).

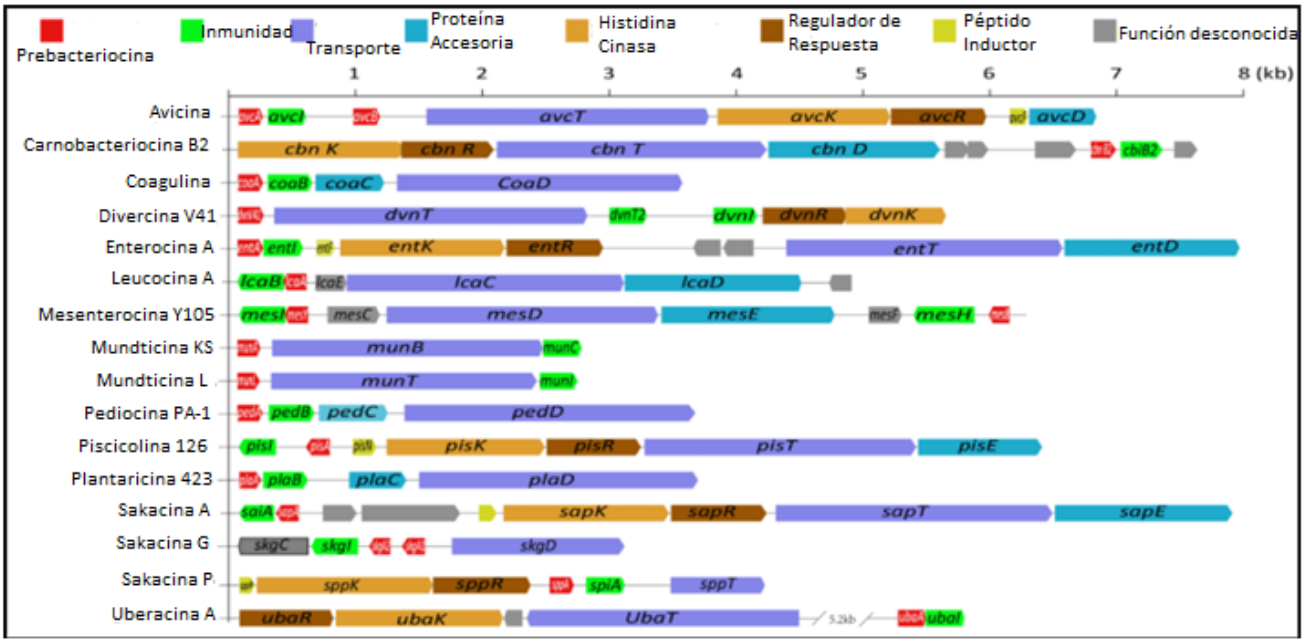


Figura 7. Organización de grupos de genes biosintéticos de diferentes bacteriocinas de clase IIa (Zhang *et al*., 2022).

Un conjunto típico de genes para la producción de bacteriocinas de clase IIb incluyen dos genes estructurales que codifican la bacteriocina y un gen estrechamente adyacente que codifica la proteína de inmunidad. Los genes que codifican un sistema regulador de tres componentes pueden ubicarse río arriba o río abajo de los genes estructurales (Figura 8) (Zhang *et al*., 2022)..

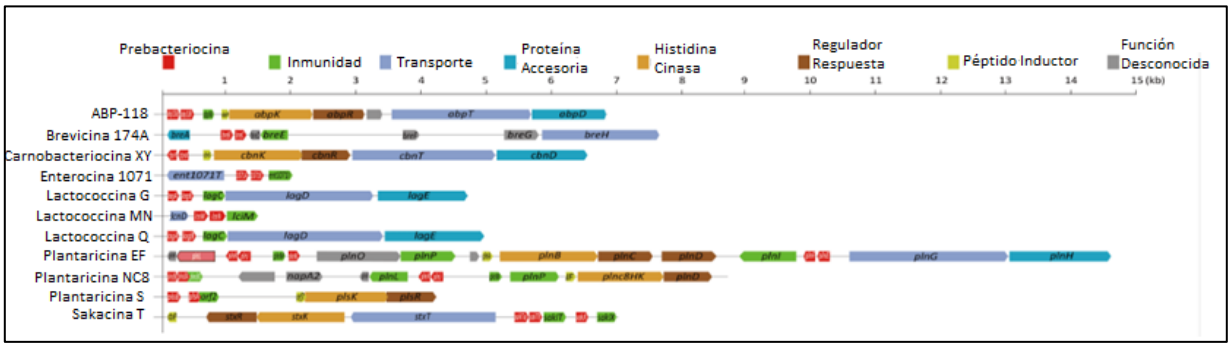


Figura 8. Organización de grupos de genes biosintéticos para algunas bacteriocinas clase IIb.
Zhang et al., 2022

1.8 Análisis Bioinformático

La Bioinformática es un campo de las ciencias computacionales que lleva a cabo el análisis de secuencias de moléculas biológicas. Normalmente se aplica al ADN, al ARN o a las proteínas, resulta útil para comparar secuencias de genes, transcritos y proteínas entre distintos organismos pudiendo revelar relaciones evolutivas, función de genes y proteínas (National Human Genome Research Institute , 2023).

Existen diferentes programas, plataformas, servidores y bases de datos que ayudan a realizar un análisis bioinformático, por ejemplo: NCBI y UniProt.

El Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI; National Center for Biotechnology Information) es un repositorio que pertenece a la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos de América (NLM; National Library of Medicine), creado en 1988 y mantiene la base de datos de GenBank, que contiene secuencias de ácidos nucleicos y proteínas, que a su vez, está en concordancia con el Banco de Datos de ADN de Japón (DDBJ; DNA Data Bank of Japan) y la base de datos de secuencias de nucleótidos del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL-EBI; The European Bioinformatics Institute). Por otra parte, el NCBI proporciona distintos sistemas de recuperación de información y herramientas computacionales para el análisis de muchos otros tipos de sistemas biológicos, que se complementa con contribuciones de la comunidad científica en general (Guzmán *et al.,* 2023).

UniProt (universal protein resource) es un recurso integral para datos de secuencias y anotaciones de proteínas creada mediante la combinación de Swiss-Prot, TrEMBL y PIR (Protein Information Resource). Esto lo hace un recurso mundial en cuanto al

almacenamiento de información sobre proteínas. UniProt es una colaboración entre el EBI, el Instituto Suizo de Bioinformática SIB y el PIR (UniProt, 2022).

Por otro lado, existen servidores para tareas más específicas, por ejemplo; para búsqueda de diferentes tipos de promotores, para el análisis de genes específicos implicados en una misma función, como es el caso de BAGEL4 que es un servidor web que permite identificar y visualizar grupos de genes en el ADN procariótico implicados en la biosíntesis de péptidos ribosómicos sintetizados y modificados postraduccionalmente y bacteriocinas (no modificadas) (J van Heel *et al.,* 2018).

1.9 Promotores, factores sigma y RNA polimerasa

El promotor es una secuencia específica de ADN que regula la transcripción de genes particulares. La RNA polimerasa (RNAp) es la enzima necesaria para la transcripción de genes, está formada por diferentes subunidades que forman el núcleo de la enzima (2α, β, β ', ω), para que haya reconocimiento del promotor se necesita una subunidad más, el factor sigma σ, que se une temporalmente al núcleo de la enzima formando la holoenzima. Los factores σ se clasifican de acuerdo a su función, a su secuencia y estructura, se dividen en dos familias, la familia del factor σ^{70} y la familia del factor σ^{54}.

Los σ^{70} a su vez se subdivide en cuatro grupos, el subgrupo uno está constituido por el σ^{70}, que reconoce promotores de genes de mantenimiento, genes de crecimiento celular, replicación, división celular, así como genes de bacteriocinas. Los subgrupos dos, tres y cuatro están formados por factores σ llamados sigmas alternativos (σ^{38}, σ^{32}, σ^{28} y σ^{24}) que son reconocidos en condiciones de estrés. En la Tabla 1 se indica la secuencia canónica y el número de nucleótidos espaciadores reconocidos por cada factor σ (Scheila de Avila *et al.*, 2012).

Tabla 1. Factores σ de *E. coli* y sus secuencias promotoras de sus sitios de unión.

Factor σ	**Gen**	**Uso celular**	**Secuencia consenso -35**	**Separación**	**Secuencia consenso -10**
28	*fliA*	Síntesis flagelar	CTAAA	15 pb	GCCGATAA
32	*rpoH*	Respuesta estrés por calor	CCCTTGAA	13-15 pb	CCCGATNT
38	*rpoS*	Respuesta general a estrés	TTGACA	16-18 pb	CTATACT
24	*rpoE*	Estrés extra-citoplasmático	GGAACTT	15 pb	GTCTAA
70	*rpoD*	Asociado al crecimiento	TTGACA	16-18 pb	TATAAT
Factor σ	**Gen**	**Uso celular**	**Secuencia consenso -24**	**Separación**	**Secuencia consenso -12**
54	*rpoN*	Metabolismo nitrógeno	CTGGNA	6	TTGCA

Fuente: (Scheila de Avila e Silva & Echeverrigaray, 2012)

Los promotores σ^{70} están formados por dos hexámeros principales, regiones -35 y -10, se localizan río arriba del sitio de inicio de la transcripción.

Mutaciones en las secuencias consenso de estas dos regiones afectan el nivel de expresión de los genes que controlan (Scheila de Avila *et al*., 2012).

De acuerdo a lo publicado por Mitchell y colaboradores en el 2003, la distancia entre los elementos -35 y -10 es crucial para la función del promotor. La longitud óptima de la región espaciadora es de 17 nucleótidos. Un cambio en las secuencias consenso o en la longitud espaciadora conduce a una reducción en la actividad del promotor.

Se ha visto que la existencia de la región -10 extendido es crucial para la transcripción de genes con promotores deficientes y es más frecuente en *Bacillus subtilis* (Haugen *et al.*, 2008). Se caracteriza por tener una secuencia consenso 5'-TG-3', a una base río arriba del hexámero -10 . Los promotores que la presentan tienden a tener longitudes de espaciado más largas que los promotores que no las tienen, parece que los promotores con menor coincidencia con los hexámeros consensos -10 y -35 son más dependientes del motivo TG ya que éste les ayuda a conseguir una actividad promotora óptima (Mitchell *et al.*, 2003).

1.10 PCR cuantitativa (qPCR) o PCR en tiempo real y RT-qPCR

La qPCR es una modalidad de la PCR punto final, su objetivo es detectar y cuantificar secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de moléculas fluorescentes en la reacción. Su principio se basa en la PCR punto final, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción.

Es importante mencionar que si se parte de ADN genómico entonces hablamos de una qPCR (quantitative PCR), por el contrario, si se parte de ARN para obtener ADNc y luego realizar la PCR, entonces se trata de una RT-qPCR.

El monitoreo de los productos amplificados conforme transcurre la reacción es mediante moléculas fluorescentes. En general, se clasifican en dos: (i) colorantes de unión al ADN; no son específicos debido a que se intercalan en cualquier ADN de doble cadena, el más conocido es el SYBR Green, que es una molécula cargada positivamente. Mientras está en solución sin unirse al ADN, prácticamente no emite fluorescencia; sin embargo, cuando se une al surco menor del ADN incrementa hasta 1,000 veces su fluorescencia y (ii) sondas de hidrólisis; son métodos específicos que siguen el principio conocido como "transferencia de energía de resonancia fluorescente" (FRET, por sus siglas en inglés) para generar la señal; este método consiste en transferir energía desde un donador o fluorocromo a un aceptor, apagador o "quencher". Las más empleadas son las sondas TaqMan que son oligos pequeños (12 – 15 pb) su extremo 5´ está etiquetado con un fluoróforo y su extremo 3´contiene un apagador, ambos se encuentran cercanos, por lo que no hay emisión de fluorescencia; sin embargo, cuando hibridan, el fluróforo reportero y el apagador se separan, lo cual permite que la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa hidrolice la sonda, logrando que la fluorescencia emitida por el fluoróforo reportero sea liberada y detectada por el equipo (Figura 9) (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

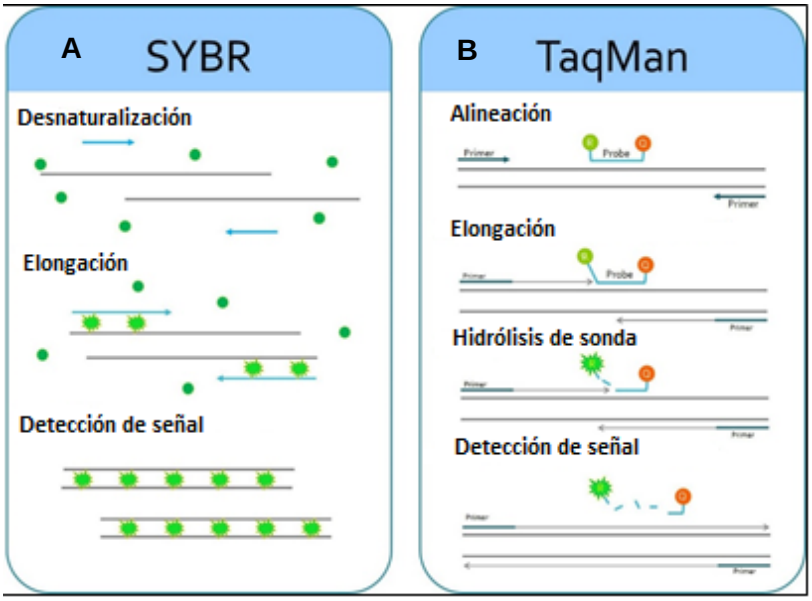


Figura 9. Funcionamiento de diferentes fluoróforos. A) El colorante de unión (SYBR Green) se intercala en ADN de doble cadena y es así como emite fluorescencia y se detecta la señal. B) Las sondas de hidrólisis (Taqman), una vez alineadas en la región de ADN de interés son hidrolizadas por la Taq polimerasa logrando la emisión de fluorescencia que será captada por el equipo. Fuente: Thermo Fisher Scietific

La PCR con transcripción inversa (RT-PCR) es una variante de la PCR convencional donde la enzima retrotranscriptasa genera ADN complementario (ADNc) a partir del ácido ribonucleico (ARN), posteriormente se realiza la PCR correspondiente (Figura 10).

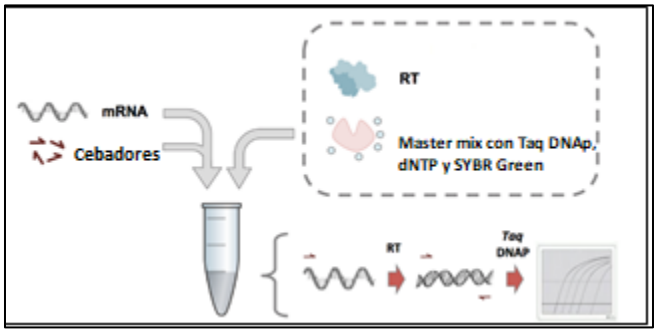


Figura 10. Esquematización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa con Transcriptasa Reversa (RT-qPCR). Para la RT-qPCR en un solo paso, en un mismo tuvo se añade el ARN mensajero, los cebadores, las enzimas RT y Taq polimerasa, los dNTP y el fluoróforo. Primeramente se sintetizará el ADNc y posteriormente se llevará acabo la PCR en tiempo real (qPCR)

2. Antecedentes

El género *Enterococcus* es capaz de colonizar diversos nichos ecológicos gracias a su capacidad para sobrevivir a condiciones ambientales desfavorables y crecer en ambientes hostiles (Hikmate *et al.*, 2008). Por tal motivo, cepas del género *Enterococcus faecium* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido encontradas en diversos ambientes, tales como: alimentos fermentados, el tracto gastrointestinal de mamíferos formando parte de su microbiota natural y en muestras clínicas pueden actuar como patógenos oportunistas.

2.1 *Enterococcus* no nosocomiales

Debido a que gradualmente se han generado cepas patógenas de enterococos que causan infecciones nosocomiales, existe cierta controversia por su presencia en alimentos, por lo que en el equipo de trabajo se han realizado investigaciones con el objetivo de analizar la relación filogenética entre las cepas aisladas de alimentos y las cepas patógenas oportunistas.

En el 2015, Guzmán Ovalle realizó un análisis MLST de cepas de *E. faecium* aisladas del queso Cotija, dentro de las cuales se encontraba la cepa QD-2. En la Figura 11 A se muestra el diagrama de población obtenido, donde se observa que las cepas aisladas del queso Cotija no se encuentran relacionadas filogenéticamente con cepas patógenas oportunistas (CC17).

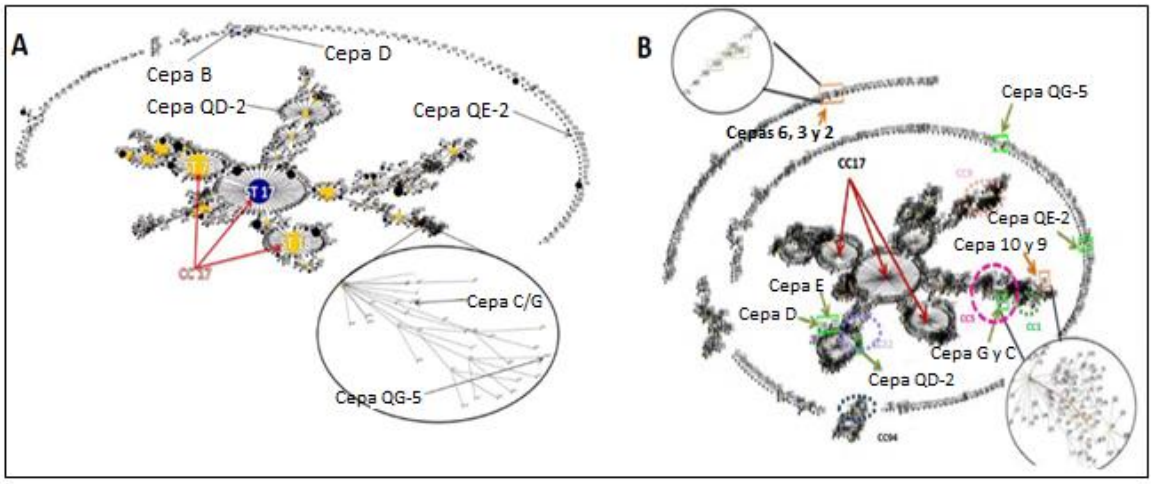


Figura 11. Análisis de la estructura poblacional de cepas de *E. faecium* aisladas de quesos artesanales mexicanos. 1A) Cepas de *E. faecium* aisladas de queso Cotija artesanal mexicano. B) Cepas de *E. faecium* aislados de queso Cotija (verde), del queso bola de Ocosingo (naranja) y el complejo clonal 17 (rojo), (Guzmán, 2015; Urrieta, 2018)

Por otro lado, en 2018, Urrieta realizó un análisis MLST de cepas aisladas del queso bola de Ocosingo, los resultados muestran que las cepas aisladas del queso bola están relacionadas filogenéticamente con cepas aisladas del queso Cotija, ambas no forman parte del CC17 (Figura 11 B). El complejo clonal 17 (CC17) se caracteriza por contener cepas

con resistencia a vancomicina, ampicilina y quinolonas, así como por la presencia de una isla de genes de patogenicidad putativa que incluye el gen *esp* y/o el gen *hyl* (Top *et al*., 2008).

2.2 Detección de la Enterocina A en la cepa QD-2 de *E. faecium*

Anteriormente, en el equipo de trabajo se evaluó la presencia del gen *entA* en *E. faecium*, cuyo gen codifica para la enterocina A. La detección se realizó por medio de PCR punto final obteniéndose un resultado positivo (Figura 12), lo que indica que el gen que codifica para la enterocina A está presente en el genoma de la cepa QD-2 de *E. faecium*.

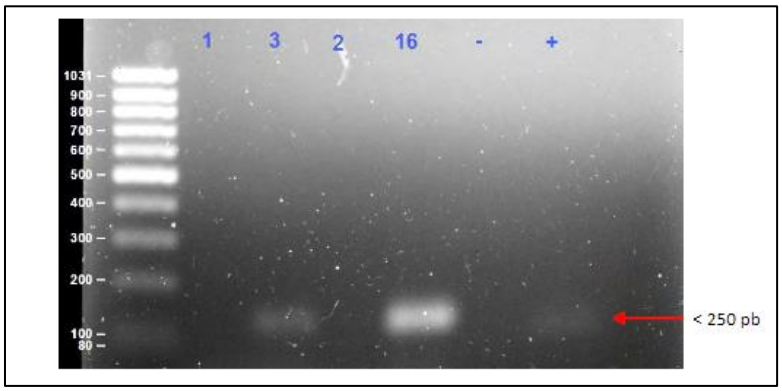


Figura 12. Evaluación de la presencia del gen *entA*. Las muestras 1,2, 3 y 16 corresponden a *E. faecium* A4-1, *E. faecium* A4-2, *E. faecium* A4-3 y *E. faecium* QD-2, respectivamente. El amplicón esperado de la Enterocina A es de 141 pb, se observa que las muestras 3, 16 y el control + (*E. faecium* MXVK29) presentan una banda entre 100 y 200 pb (Mendoza, 2019).

Posteriormente se realizaron pruebas fenotípicas para corroborar la presencia de la enterocina A, se hizo la prueba de difusión en agar contra *L. monocytogenes*, en donde se observó un ligero halo de inhibición en la cepa QD-2 de *E. faecium* (Figura 13, pozo 16).

Para demostrar que la actividad de inhibición de *L. monocytogenes* se debía a la enterocina A, se realizó un gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) para así evaluar el perfil proteínico del concentrado obtenido por el método selectivo de adsorción-desorción y se observó que la cepa QD-2 de *E. faecium* presentó dos bandas intensas de tamaño cercano a 6.5 KDa, lo que indica que hay presencia de péptidos con ese peso molecular, por lo que es posible que alguna de esas bandas corresponda a la enterocina A (Figura 14).

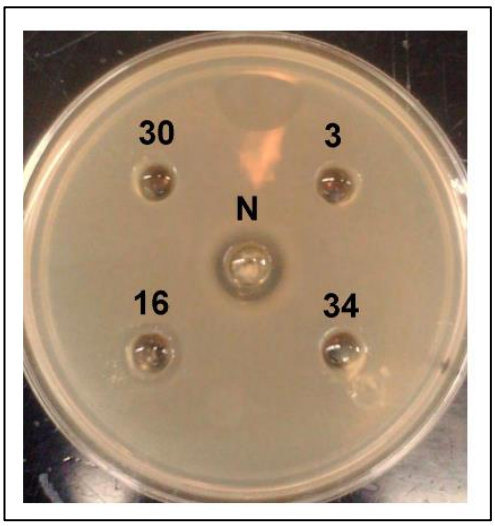


Figura 13. Evaluación de la actividad de diferentes cepas contra *L. monocytogenes*. Los pozos 3, 16, 30 y 34 corresponden a las cepas *E. faecium* A4-3, *E. faecium* QD-2, *E. faecalis* QB-2 y *E. faecalis* QA-2, respectivamente, se utilizó nisina como control positivo (N). (Mendoza, 2019).

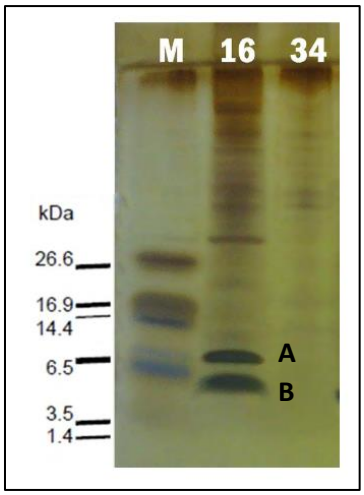


Figura 14. Gel SDS-PAGE teñido con nitrato de plata. Evaluación del perfil proteínico del extracto obtenido por adsorción-desorción de las cepas *E. faecium* QD-2 y *E. faecalis* QA-2, carril 16 y 34 respectivamente, carril M corresponde al marcador de peso de polipéptidos. A y B corresponden a bandas de tamaño menor a 10 kDa. (Mendoza, 2019)

2.3 Secuenciación e información del genoma

En el grupo de trabajo, se mandó a secuenciar el genoma de la cepa QD-2 de *E. faecium*, por ensamblado *de novo*, se obtuvo la siguiente información (Figura 15).

Posteriormente, se realizó la búsqueda bioinformática de secuencias codificantes para bacteriocinas con la plataforma de BAGEL4, se encontraron 8 genes que codifican para bacteriocinas putativas (Figura 16).

Organismo	*Enterococcus faecium*
No. de contigs	97
Tamaño del genoma (bp)	2,676,947
GC (%)	~ 39
No. de rRNAs	3
No. de CDSs	2565
No. de tRNAs	46
No. de tmRNAs	1

Figura 15. Estadística relacionada al genoma (Romero, 2022)

Contig	Gen	Bacteriocina
2	615	Bacteriocina IIc
	616	Acidocina_LF221B
	621	Enterocina A
3	718	Bacteriocina UviB
	901	Enterocina X cadena alpha
	902	Enterocin X cadena beta
20	2142	Enterolisina A
66	2596	Enterocina B*

Figura 16. Información de genes con anotación para bacteriocinas putativas. El genoma de *E. faecium* QD-2 tiene codificados ocho genes con anotación para bacteriocinas. (Romero, 2022)

3. Justificación

En el grupo de trabajo se aisló la cepa de *Enterococcus faecium* QD-2 proveniente de un queso Cotija artesanal mexicano. En investigaciones anteriores se determinó que la cepa QD-2 no está relacionada filogenéticamente con cepas nosocomiales y que sintetiza péptidos con actividad antilisterial. Además, se cuenta con la secuencia de su material genético cromosomal y se sabe que hay varios ORFs con anotación de bacteriocinas putativas. En vista de tales resultados nos interesa saber cuáles de éstos se están expresando.

Por medio de un análisis bioinformático se conocerá cual es el contexto genómico de los ORFs con anotación para bacteriocina putativa. Mediante una RT-qPCR se analizará su expresión y utilizando diferentes concentraciones de NaCl en el medio de cultivo se conocerá el efecto del estrés osmótico en la transcripción de las mismas.

4. Hipótesis

Los pares de ORFs 615-616 y 901-902, al encontrarse contiguos, formarán operones bicistrónicos.

La expresión de los ORFs codificantes para bacteriocinas disminuirá cuando la bacteria se encuentre en estrés osmótico generado por la presencia de NaCl en diferentes concentraciones.

5. Objetivo General

- Determinar si los marcos de lectura codificantes para bacteriocinas putativas de la cepa QD-2 de *Enterococcus faecium* se expresan.

5.1 Objetivos Particulares

- Predecir bioinformáticamente promotores y otros elementos involucrados en la expresión de los genes codificantes para bacteriocinas.
- Evaluar experimentalmente la transcripción de los marcos de lectura para bacteriocinas putativas seleccionadas.
- Determinar si la expresión de los marcos de lectura codificantes para bacteriocinas en *E. faecium* QD-2 varía por el estrés osmótico ocasionado por la presencia de NaCl en diferentes concentraciones.

6. Metodología

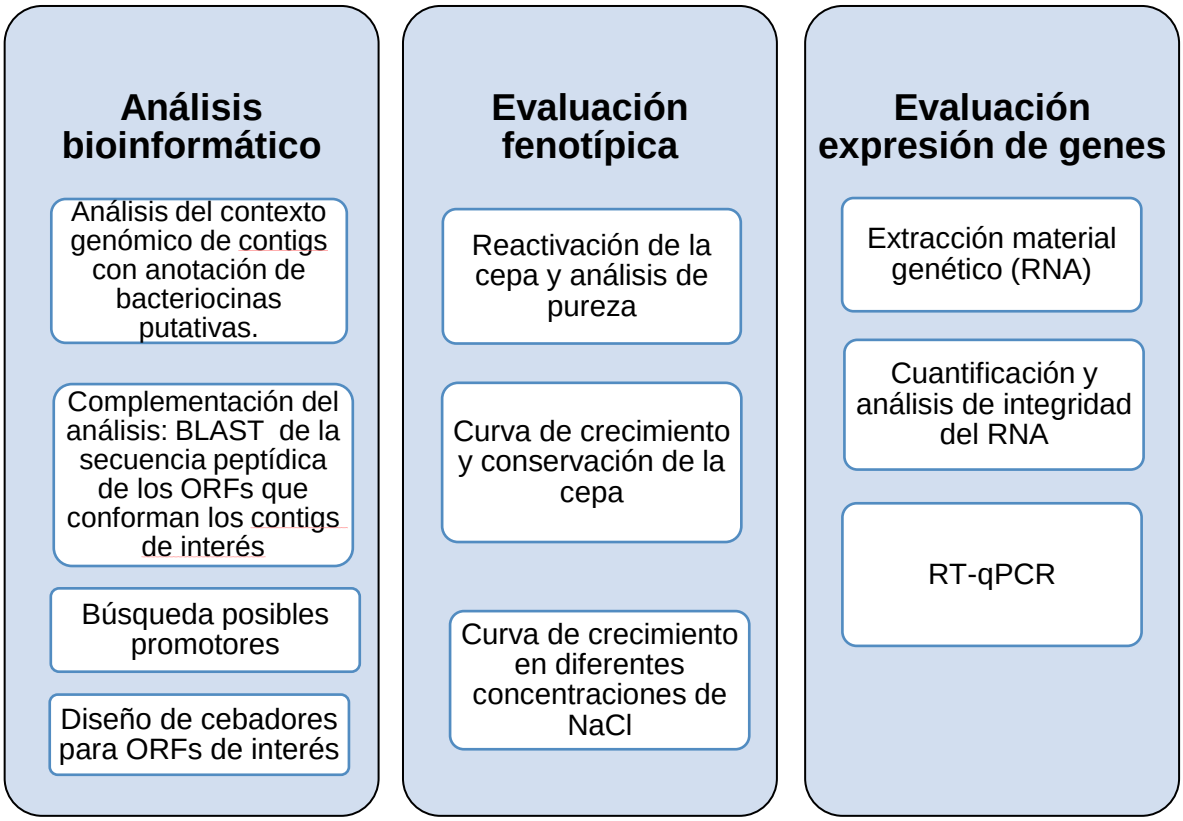


Figura 17. Diagrama general de trabajo

6.1 Análisis Bioinformático

El análisis bioinformático se realizó con la finalidad de conocer el contexto genómico de los ORFs codificantes para bacteriocinas putativas y determinar cuál de ellos cuenta con un posible promotor funcional.

6.1.1 Análisis del Contexto Genómico

Anteriormente en el grupo de trabajo se realizó la búsqueda de ORFs codificantes para bacteriocinas putativas en *E. faecium* QD-2. De acuerdo a esos resultados, se sabe que los contigs 2, 3, 20 y 66 son quienes los contienen. En el actual trabajo, estos cuatro contigs se analizaron por medio de la plataforma Bagel4 (libre acceso disponible en http://bagel4.molgenrug.nl.) que es una base de datos de péptidos antimicrobianos modificados postraduccionalmente, predice ORFs relacionados al transporte, regulación e inmunidad, por lo que Bagel4 es una herramienta que ayuda en la búsqueda de genes putativos de bacteriocinas en los genomas bacterianos (Nes *et al.,* 2007).

El análisis se complementó realizando el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de las secuencias peptídicas de los diferentes ORFs que conforman los contigs antes mencionados, para ello se utilizaron las plataformas de NCBI, UniProt y Pfam.

6.1.2 Predicción de Promotores

Únicamente las secuencias nucleótidicas localizadas río arriba de los genes que codifican para las bacteriocinas putativas se analizaron bioinformáticamente con las plataformas IPro70-FMWin y BProm con el fin de buscar sus posibles promotores. De acuerdo a lo publicado por Anzolini & Silva en 2020, IPro70-FMWin exhibe los mejores resultados para la mayoría de las métricas utilizadas entre diferentes herramientas para búsqueda de promotores. Los resultados obtenidos con IPro70-FMWin (libre acceso disponible en http://ipro70.pythonanywhere.com/server) se compararon y complementaron con los obtenidos con la plataforma de Bprom (libre acceso disponible en http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb). Ambas herramientas son plataformas web que ayudan en la predicción de promotores sigma 70 (σ^{70}).

6.1.3 Diseño de Cebadores

La secuencia de los genes estructurales, se usó como base para diseñar el par de cebadores que permitiera obtener la amplificación de cada gen de interés.

Todos los cebadores utilizados fueron diseñados para este trabajo y mandados a sintetizar en la compañía IDT (Integrated DNA Technologies).

Se diseñaron los cebadores para los ORFs que codifican para bacteriocinas putativas que cuentan con un contexto genómico de bacteriocina y que obtuvieron un puntaje mayor en el análisis bioinformático de su posible promotor. Éstos fueron los ORFs 615, 616, 621, 901 y 902. El gen *rpoA* se empleó como gen endógeno, el cual codifica para una de las subunidades α de la RNA polimerasa. El diseño de cada uno de estos cebadores se realizó en la plataforma de IDT con la herramienta PrimerQuest. Al finalizar el análisis de todos los posibles juegos de cebadores, se seleccionó el que mejor caracteristicas mostraba de acuerdo a los lineamientos necesarios para un buen diseño de cebadores. En el Anexo 10.1 se mencionan los lineamientos recomendados a seguir para el diseño de cebabores.

Una vez seleccionados el juego de cebadores para cada ORF, se realizaron diferentes BLAST para verificar la especificidad de los mismos. Primeramente se realizó un BLAST con dos genomas de *Enterococcus faecium* seleccionados al azar de la base de datos de NCBI (Tabla 2), y posteriormente se hizo un alineamiento con el contig respectivo de cada gen utilizando la plataforma Clustal omega v. 2.0.12, resultados no mostrados.

En la Tabla 2 se muestran las secuencias de los cebadores empleados en este trabajo.

Tabla 2. Secuencias y temperaturas de alineamiento de los cebadores seleccionados para cada gen a analizar.

Gen	**Secuencia 5' - 3'**	**Tm**	**Ampli-cón**	**BLAST ATCC 8459 = NRRL B-2354 (taxid:1158600)**	***Enterococcus faecium* T110 (taxid:1344042)**
615	F: TGGAGGCAATAATGCTTGGG	62.67	80	Proteína hipotética	Proteína hipotética
	R: CTAAACCTGCACCACCTACTG	62.18		Proteína hipotética	Proteína hipotética
616	F: GAGTGCCGTGGGAGTTT	61.49	95	bacteriocina clase II	bacteriocina clase II
	R: CACAAGCAGCTATTGCATAAGG	61.86		bacteriocina clase II	bacteriocina clase II
621	F: AAATAAATGTACGGTCGATTGGG	61.34	87	bacteriocina clase II	bacteriocina clase II
	R: CCTGGAATTGCTCCACCTAAA	62.26		bacteriocina clase II	bacteriocina clase II
901	F:ATGATAGTCTTTGGTATGGTGTAGG	61.96	81	bacteriocina	Transportdor ABC
	R: TCATGTGTTTAACAGGATGGTTTG	62.02		bacteriocina	Proteína de biosíntesis del ácido D-alanil-lipoteicoico
902	F: TTCAAGGAGGAATAGCACCTATTAT	61.79	84	bacteriocina clase II	Sin coincidencia
	R: AGATTATTTGATCTGAGTGATCCCA	61.98		bacteriocina clase II	Sin coincidencia
rpoA	F: CCTGTTCGTCGTGTGAACTATC	62.5	93	Subunidad alfa de RNA polimerasa	
	R: ACCATCTGTCCAAATCTCCATC	62.07		Subunidad alfa de RNA polimerasa	

6.2 Evaluación Fenotípica

6.2.1 Reactivación de la Cepa y Análisis de Pureza

La cepa QD-2 de *E. faecium* se encontraba almacenada en tubos crioviales a -70 °C en medio MRS con glicerol al 15%. Para reactivarla, el criovial se descongeló a 4°C, posteriormente se inocularon 100 µL del medio con glicerol en 25 mL de medio MRS estéril

y se incubó a 37 °C durante 18 horas, tiempo durante el cual se realizó la cinética de crecimiento y una tinción de Gram para verificar pureza.

Se determinó la tubidez del medio a 600 nm ($D.O._{600nm}$) en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, BioMate 3). El aumento en la D.O. del medio se correlaciona directamente con el crecimiento del microorganismo. Las mediciones se realizaron cada 60 minutos en las fases de crecimiento lag y estacionaria, mientras que en la fase exponencial las mediciones se realizaron cada 30 minutos.

Debido a que la expresión de bacteriocinas se da en la parte final de la fase exponencial, se analizó la cinética de crecimiento y se determinó que a las 6 horas de fermentación se alcanzó este punto en la curva de crecimiento, por lo que se prosiguió a realizar la conservación de la cepa en medio MRS con glicerol al 15% estéril y se almacenó a -70°C.

Con el fin de establecer el punto de extracción de ARN en cada una de las condiciones de cultivo a estudiar, se realizaron las cinéticas de crecimiento en cada una de ellas; medio MRS con 0 % (p/V) NaCl, 3 % (p/V) NaCl y 5 % (p/V) NaCl.

6.3 Evaluación de la Expresión de Genes

6.3.1 Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN total se utilizaron materiales y soluciones libres de ribonucleasas, para lo cual todo el material se esterilizó en autoclave a 121°C por 60 minutos. Se utilizó agua desionizada tratada con Dietil Pirocarbonato (DEPC, Sigma) al 0.1 % (V/V), se dejó en agitación con agitador magnético en campana de gases durante toda la noche y posteriormente se esterilizó durante 1.5 hrs (H_2O DEPC).

Todas las soluciones se prepararon con H_2O DEPC y se trabajó con guantes en todo momento.

Una vez alcanzada la D.O. deseada en cada condición de crecimiento, el cultivo se sacó de incubación e inmediatamente se obtuvo el paquete celular para llevar acabo la extracción de RNA. Para ello se empleó la centrifuga Beckman coulter, Allegra X-30R. Una vez obtenido el paquete celular se realizó la lisis celular y posteriormente la extracción de ARN total por medio del método de TRIzol (TRI Reagent®,Sigma-Aldrich), en los Anexos 10.2 y 10.3 se describe la metodología a detalle.

6.3.2 Cuantificación y Evaluación de la Calidad de ARN obtenido

La concentración y pureza del ARN obtenido se evaluó por espectrofotometría usando un NanoDrop (Thermo Scientific).

Posteriormente se evaluó la integridad del ARN total obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% - formaldehído 18%. En el Anexo 10.4 se muestra la metodología a detalle.

Una vez terminado de correr el gel de electroforesis, se visualiza el ARN desnaturalizado y para ello se sumergió el gel en una solución de Bromuro de Etidio (BrEt, 1µg/mL) durante 15 min. Tan pronto como hubo transcurrido el tiempo se realizó la visualización en un UV transiluminador.

6.3.3 Análisis De La Expresión De Bacteriocinas

En este trabajo se analizó el efecto que sufre la transcripción de genes que codifican para bacteriocinas en *E. faecium* QD-2, cuando la cepa se expone a estrés osmótico debido a la variación en la concentración de NaCl.

Las muestras de ARN se analizaron por RT-qPCR y se estudiaron los ORFs con anotación para bacteriocionas putativas, 615, 616, 621, 901 y 902. El nivel de expresión se determinó fluorométricamente utilizando SYBR Green como fluoróforo y para el análisis de resultados se empleó la cuantificación relativa, utilizando el método comparativo Ct ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

Para el análisis de la expresión génica se realizaron tres cultivos para cada condición y para cada extracto de ARN se hicieron tres reacciones independientes de RT-qPCR para cada ORF.

Las reacciones de amplificación para los ORFs de interés se realizaron mediante RT-qPCR en el termociclador ABI 7500, Applied Biosystems.

Una vez que se obtuvo ARN íntegro y de buena calidad se realizó la reacción RT-qPCR utilizando el kit SCRIPT RT-qPCR SybrMaster (Jena Bioscience), se determinaron los volúmenes de reactivos a utilizar (Tabla 3) y las condiciones de reacción (Tabla 4) tomando como base las indicadas por el proveedor y las Tm de cada cebador.

La reacción para cada ORF se llevó a cabo por triplicado en reacciones de RT-qPCR individuales. Estas reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µL que contenía 10µL de SCRIPT RT-qPCR SybrMaster (Jena Bioscience), 0.2 µL de cada cebador, 5 µL de ARN a una concentración de 100 ng y 4.6 µL de H_2O, se realizaron 40 ciclos.

Tabla 3. Reactivos y volúmenes utilizados por cada reacción de RT-qPCR

	Reactivo	Conc. inicial	Conc. Stock	Conc. final	Vol. p/1 reacción
1	Agua	--------	--	--	4.6 µL
6	Cebador F	100 µM	10µM	100 nM	0.2 µL
5	Cebador R	100 µM	10µM	100 nM	0.2 µL
6	Sybr Green	2x		1x	10 µL
7	ADN	--	20 ng	100ng	5 µL
Volumen final de reacción:		20 µL			

Tabla 4. Condiciones de reacción RT-qPCR

Etapa	Temp (°C)	Tiempo	Ciclos
Transcripción Reversa	50	10 min	1x
Desnaturalización inicial	95	5 min	1 x
Desnaturalización	95	15 s	40x
Alineación	63	20 s	40x
Elongación	72	31 s	40x

Para poder interpretar los resultados de las reacciones RT-qPCR se empleó la cuantificación relativa, utilizando el método comparativo Ct ($2^{-\Delta\Delta CT}$). En este método se normaliza la proporción de la expresión génica en comparación con un gen endógeno, en este caso el gen *rpoA,* que codifica para la subunidad α de la RNA polimerasa. Así mismo, se compara con la expresión de un gen de referencia, en este estudio se consideró el ORF que codifica para la enterocina A, ORF 621 en 0% NaCl. En el cálculo se considera el Ct del gen de referencia y el Ct del gen endógeno (Zarzecka *et al*., 2022), en la Tabla 5, se muestran las fórmulas empleadas para dichos cálculos.

Tabla 5. Fórmulas para la determinación del Delta delta Ct, Ct ($2^{-\Delta\Delta CT}$)

Cálculo	Fórmula
Delta Ct	$\Delta Ct = Ct\ gen\ interés - Ct\ endógeno$
Delta Delta Ct	$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct\ gen\ interés - \Delta Ct\ referencia)$
Veces de mayor o menor expresión	$2^{-\Delta\Delta CT}$

7. Resultados y Discusión

Es importante mencionar que este trabajo de investigación se realizó en condiciones de pandemia por lo que el enfoque bioinformático fue extenso y la parte experimental se vio limitada en cuestión de tiempo.

7.1 Análisis bioinformático

Mediante el análisis bioinformático se obtuvieron y analizaron los contextos genómicos y las secuencias de posibles promotores de ORFs con anotación para bacteriocinas putativas de *E. faecium* QD-2 para poder seleccionar a los que se les analizará su transcripción en diferentes concentraciones de NaCl.

7.1.1 Análisis del Contexto Genómico

Con ayuda de la plataforma BAGEL4 se obtuvieron los diagramas de contexto genómico de los contigs 2, 3, 20 y 66 que son los que contienen los ORFs para bacteriocinas putativas (Figuras 18, 20, 21, 26 y 27).

El análisis se complementó analizando los ORF que conforman el contexto genómico de cada bacteriocina putativa. Para ello se emplearon las plataformas de NCBI, UniProt y Pfam, los resultados se muestran en las Tablas 6, 7, 8, 9 y 10.

Los resultados del análisis de los contigs antes mencionados confirman la presencia de grupos de genes involucrados en la producción, en el transporte e inmunidad de la enterocina A, enterocina X y enterocina B (contigs 2, 3.2 y 66 respectivamente), así como también genes que codifican para bacteriocinas similares a la UviB y enterolisina A (contigs 3.1 y 20). Todos están codificados cromosómicamente y los primeros tres muestran un alto grado de similitud con los descritos previamente en la literatura. Sin embargo, el ORF 718 que codifica para una bacteriocina con similitud a UviB y el ORF 2142 que codifica para la

enterolisina A (contigs 3.1 y 20) muestran poca o nula similitud con lo reportado en la literatura.

- ✓ **CONTIG 2**

Tabla 6. BLAST y anotación de los ORFs que forman el contexto genómico de bacteriocinas putativas del contig 2.

ORF	NCBI	ID (%)	UniProt	ID (%)	Pfam	Score
613	Proteína de secreción de la familia HlyD	100	Proteína accesoria de secreción de bacteriocina	100	Proteína de secreción de la familia HlyD	52.4
614	Proteína de transporte ABC	99.8	Proteína de transporte ABC	99.9	Región transmembranal del transportador ABC	198.6
615	Bacteriocina	100	Bacteriocina *E.faecium*/prot. no caracterizada	100	Bacteriocina clase II con péptido líder de doble glicina	10.9
616	Bacteriocina	100	Bacteriocina	100	Bacteriocina clase II con péptido líder de doble glicina	32.5
617	Factor transcripcional regulador de respuesta	99	Factor transcripcional regulador de respuesta	100	Dominio regulador de respuesta	40.3
618	Proteína con dominio GHKL	100	Proteína cinasa de histidina	99.8	Dominio GHKL	57.3
619	Factor de inducción de bacteriocina	100	Secuencia señal tipo bacteriocina	100	Proteína tipo lactococina	16.2
620	Proteína de inmunidad de la Enterocina A	99	Proteína de inmunidad de la Enterocina A	99.1	Dominio Familia inmunidad de la enterocina A	47.7
621	Enterocina A	100	Enterocina A	100	Bacteriocina clase II	72.8
623	Proteína de transporte ABC	100	Proteína de transporte ABC	100	Dominio transportador ABC	125.5
624	Regulador transcripcional	100	Regulador transcripcional	100	Proteína reguladora de bacteriocinas	42.6

De acuerdo a los resultados previamente obtenidos en el grupo de trabajo, se sabía que el contig 2 contiene tres ORFs con anotación para bacteriocinas putativas, los cuales corresponden al 615, 616 y 621. De acuerdo a los resultados bioinformáticos de este trabajo, se puede mencionar que codifican para dos bacteriocinas no caracterizadas y para la enterocina A, respectivamente.

Al observar el contexto genómico obtenido para los ORFs codificantes para bacteriocinas putativas presentes en el contig 2, se aprecia que hay tres que van en dirección opuesta al resto, éstos corresponden a los ORFS 615 y 616 y se encuentran entre el operón de transporte y el operón de regulación de la Enterocina A (Figura 18). De acuerdo a lo reportado en la literatura, pudieran corresponder a una segunda bacteriocina.

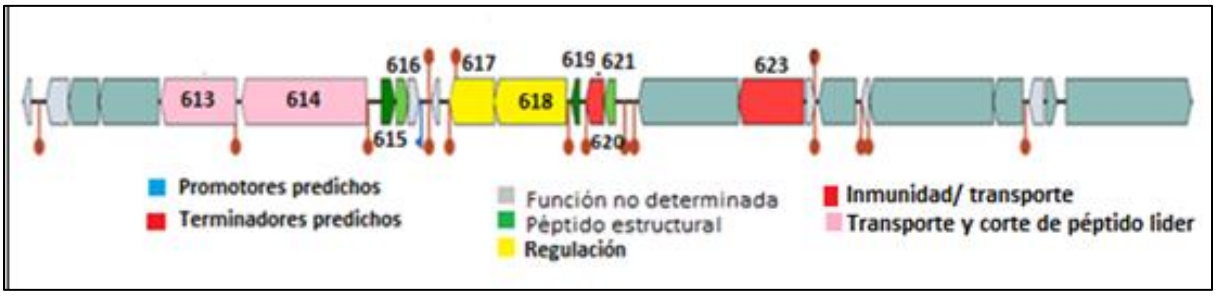


Figura 18. Contexto genómico de bacteriocinas putativas del contig 2 en *E. faecium* QD-2. Los ORFs en rosa corresponden al operón de transporte, los de amarillo al operón de regulación y los rojos al de inmunidad. Los ORFs en verden pertenecen a los genes estructurales para bacteriocinas putativas.

ORF 615. Codifica para una bacteriocina no caracterizada

De acuerdo al contexto genómico del contig 2, se observa que el ORF 615 tiene río abajo dos ORF en la misma dirección pero en sentido contrario al resto de los marcos de lectura (Fgura 18). Las tres bases de datos con las que se realizó la anotación identificaron al ORF 615 como bacteriocina (Tabla 6).

Los ORFs 615 y 616 ya habían sido identificados en *Enterococcus faecium* DPC1146 por O´Keeffe y colaboradores en 1999; sin embargo, únicamente al producto putativo del ORF 2, aquí ORF 616, le encontraron características relacionadas con bacteriocinas.

Por otro lado, Escamilla-Martínez y colaboradores en 2017, analizaron la cepa MXVK29 de *Enterococcus faecium,* aislada de salchichas fermentadas, e identificaron la presencia de los ORF2 y ORF3 (aquí 616 y 615, respectivamente) y los análisis realizados mostraron una alta identidad con bacteriocinas de clase IIb.

Se sabe que las bacteriocinas de clase IIb tienen un motivo similar a GxxxG (AxxxA o SxxxS) presente en péptidos y proteínas transmembranales. Escamilla-Martínez y colaboradores mencionan que el ORF3 (615) puede codificar para una bacteriocina de clase IIb porque incluye un motivo SxxxS en lugar de un motivo GxxxG, de forma similar a la plantaricina NC8β, que también pertenece a esta clase de bacteriocinas. El ORF 615 no muestra homología con otras bacteriocinas descritas previamente.

ORF 616. Bacteriocina no caracterizada con similitud a Acidocina_ LF221B

Las tres bases de datos identificaron al ORF 616 con anotación para bacteriocina (Tabla 6).

De acuerdo a lo reportado por O´Keeffe y colaboradores (1999), el péptido codificado por el ORF2 (aquí ORF 616) posee la mayoría de las características moleculares de las bacteriocinas clase II, incluyendo un perfil hidrofóbico y una posible secuencia líder con un

sitio de procesamiento GG. Además, el extremo C-terminal es similar a LafX, LcnM y LcnN, péptidos implicados en la biosíntesis de la lactacina F y lactococina M y N, respectivamente.

Se realizó un alineamiento entre la secuencia de aminoácidos del ORF2, reportada por O´Keeffe, y la secuencia de aminoácidos del péptido codificado por el ORF 616 y se observó que ambas secuencias son idénticas.

La proteína putativa del ORF 616 tiene una secuencia líder con un motivo doble de glicina, al igual que la proteína codificada por el ORF 615. Por lo tanto, de acuerdo a los resultados bioinformáticos y a lo reporado en la literatura, se puede inferir que los ORFs anteriormente mencionados codificarían para una bacteriocina de clase IIb. Esta clase requiere la presencia de dos componentes proteicos para una mayor actividad antimicrobiana.

ORF 621. Codifica para la Enterocina A

Dentro del contig 2 se reconoció al ORF 621 con anotación para la enterocina A,.

La enterocina A ya ha sido aislada y caracterizada; se ha reportado que el cluster de genes involucrados en su expresión incluyen al gen estructural, gen de inmunidad, gen que codifica para un factor de inducción, gen que codifica para una histidina cinasa (*ent*K) y un regulador de respuesta (*ent*R), así como un gen que codica un transportador ABC y un gen para una proteína accesoria (Escamilla *et al.,* 2017).

La anotación que se muestra en la Tabla 6 indica que el gen estructural de la enterocina A corresponde al ORF 621, el gen de proteína de inmunidad corresponde al ORF 620, el factor de inducción al ORF 619, la proteína histidina cinasa al ORF 618, el regulador de respuesta al ORF 617, el gen que codifica para un transportador ABC corresponde al ORF 614 y la proteína accesoria al ORF 613.

Haciendo una comparación entre el contexto genómico reportado y el obtenido en este trabajo para la Enterocina A (Figura 19 A y 19 B, respectivamente), se puede apreciar que ambos contienen los mismos ORFs, lo que indica que el ORF 621 de la cepa QD-2 tiene el mismo contexto genómico que el reportado en la literatura.

Se ha publicado que la enterocina A tiene actividad antimicrobiana frente a cepas como *Listeria monocytogenes, Enterococcus faecalis, Pediococcus parvulus, Staphylococcus aureus y Lactobacillus casei* (Escamilla *et al*., 2017).

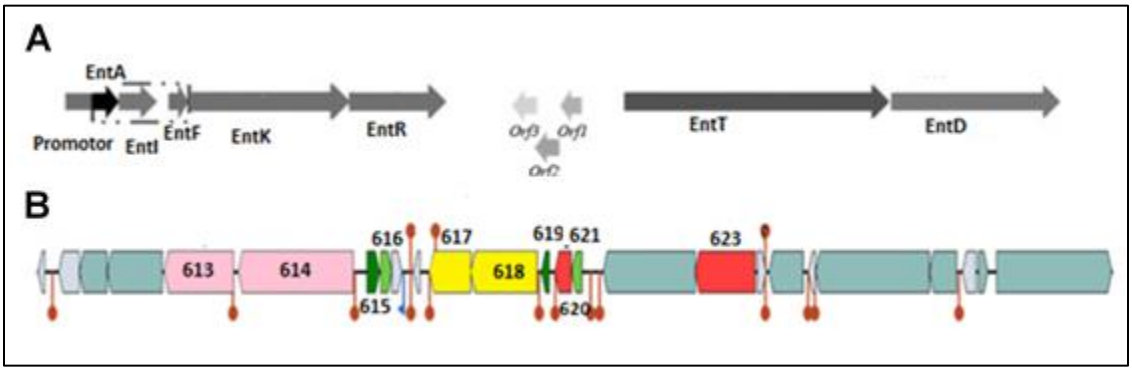


Figura 19. Comparación del contexto genómico del operón que codifica a la enterocina A. A) Contexto genómico propuesto por Escamilla-Martínez *et al* en 2017. B) Contexto genómico obtenido en este trabajo con la herramienta BAGEL 4.

- ✓ **CONTIG 3**

Debido a que el tamaño del contig 3 es muy grande, la plataforma de BAGEL 4 dividió éste en dos, el contig 3.1 y 3.2.

En la Tabla 7 se muestra el análisis complementario de los ORFs mostrados en el contexto genómico del contig 3.1

Tabla 7. BLAST y anotación de los ORFs que forman el contexto genómico de bacteriocinas putativas del contig 3.1.

ORF	NCBI	ID (%)	UniProt	ID (%)	Pfam	Bit score
717	Proteína hipotética	100	Proteína no caracterizada	99.8	Dominio de familia de función desconocida	95
718 UviB	Proteína hipotética (*E.faecium*) Bacteriocina UviB (*E.faecalis*)	96.92 68.66	Proteína no caracterizada Bacteriocina putativa UviB	98.5 88.2	Proteína de la Familia holinas	33.7
719	Proteína hipotética	100	Proteína con dominio BppU_N	66.2	Dominio N-terminal de BppU	22.4
720	Proteína de la cola del fago	100	Proteína estructural del fago menor	100	Cola de fago endopeptidasa	56.6
721	Proteína de la cola de fago	98.78	Proteína de la cola del fago	100	Proteína de cola de fago	21.2
722	Proteína de cinta métrica de cola de fago	100	Proteína de cinta métrica de cola de fago	99.6	Proteína relacionada con fagos	75.4
723	Proteína hipotética	99.17	Proteína de bacteriófago	100	---	---
724	Proteína de la cola del fago	100	Proteína B de la cola del fago mayor	99	---	---

- ✓ **Contig 3.1**

En la Figura 20 se muestra la representación esquemática del contexto genómico obtenido del contig 3.1 de *E. faecium* QD-2, donde se identificó un ORF codificante para bacteriocina putativa con similitud a la UviB, correspondiente al ORF 718.

ORF 718. Codifica para una bacteriocina con similitud a la bacteriocina UviB con dominio de holina

Observando la información de la Tabla 7, el ORF para la bacteriocina putativa es el que corresponde al 718. La base de datos de NCBI y UniProt lo identificaron como bacteriocina UviB, pero la base de datos de Pfam lo reconoció como una proteína de la familia de los holinas. Estas últimas son proteínas presentes en fagos, tienen afinidad por la membrana

bacteriana en la que se insertan haciendo poros que permiten el paso de la endolisina al espacio periplásmico, dónde degrada el peptidoglicano de la pared celular. Esto ocasiona que aumente la presión osmótica en el interior de la bacteria, lo que finalmente provoca su lisis (Catalao *et al.,* 2013).

Considerando que los ORFs que se encuentran alrededor del ORF 718 corresponden a proteínas de fagos, es probable que éste no codifique para una bacteriocina sino para una proteína de esta familia.

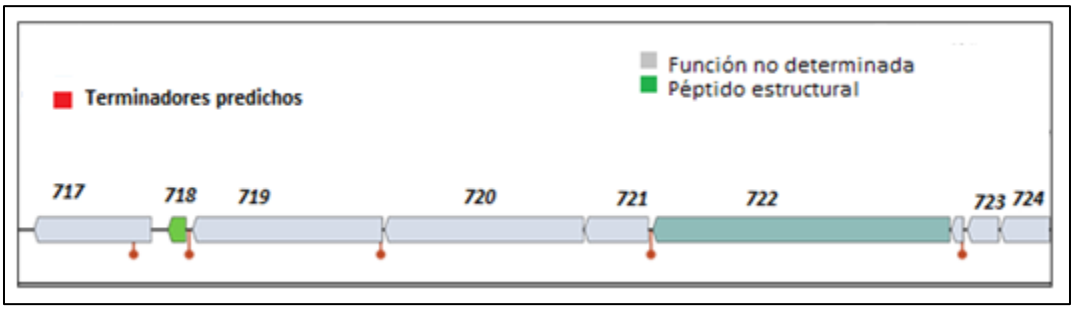


Figura 20. Contexto genómico del contig 3.1. El ORF en verde corresponde al de la bacteriocina putativa con similitud a UviB con dominio de holina.

- ✓ **Contig 3.2**

En la Figura 21 se muestra la representación esquemática del contexto genómico del contig 3.2 de *E. faecium* QD-2 donde se observan dos ORFs con posible anotación para bacteriocinas, corresponden a los ORFs 901 y 902 que fueron identificados como Enterocina X cadena α y Enterocina X cadena β, respectivamente. En la Tabla 8 se muestra la anotación de los ORFs contenidos en el contig 3.2.

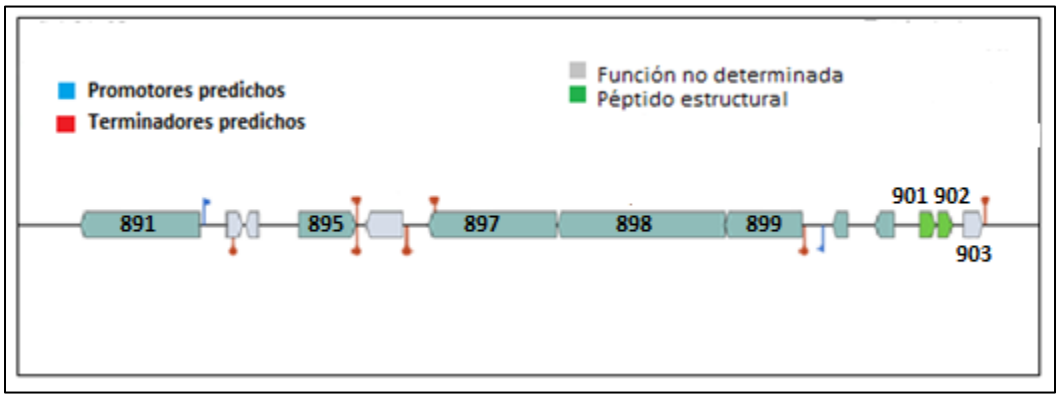


Figura 21. Contexto genómico correspondiente al contig 3.2. Los ORFs en verde corresponden a los de la Enterocina X cadena α y Enterocina X cadena β.

Tabla 8. BLAST y anotación de los ORFs que forman el contexto genómico de bacteriocinas putativas del contig 3.2.

Gen	NCBI	ID (%)	UniProt	ID (%)	Pfam	Bit score
891	Aminopeptidasa	99.77	Aminopeptidasa	100	Proteína similar a la peptidasa	677
895	Doble hidrolasa alfa/beta	99	Proteína con dominio hidrolasa	99.5	Proteína de la familia hidrolasa alfa/beta	34.8
897	Fosfo-beta-glucosidasa	99.79	Fosfo-beta-glucosidasa putativa	100	Proteína de la familia glucosil hidrolasa	398.9
898	Subunidad transportadora de betaglucósidos	99.84	Proteína de transporte específica de betaglucósidos	100	Proteína del sistema de fosfotransferasa de azúcar	165.1
899	Proteína con dominio PRD	100	Proteína con dominio PRD	100	Proteína con dominio PRD	71.4
901 Enterocina de cadena alfa	Precursor de enterocina B	100	Enterocina B	100	Lantibiótico tipo A	15.6
902 Enterocina de cadena beta	Bacteriocina clase IIb	100	Bacteriocina clase IIB	100	Bacteriocina clase II con péptido líder de doble glicina	20.9
903	Proteína hipotética	100	Proteína no caracterizada	100	Dominio de proteína incrustada en la membrana	15.0

De acuerdo a los resultados bioinformáticos los ORFs con anotación para posibles bacteriocinas son 901 y 902, los ORFs aledaños corresponden a proteínas que no están relacionadas con la expresión de bacteriocinas a excepción del ORF 903, las bases de datos de NBCI y UniProt lo identificaron como proteína hipotética/no caracterizada, sin embargo, la base de datos de Pfam detectó un dominio de proteína embebido en la membrana. Las proteínas de inmunidad se caracterizan por contener dominios embebidos en la membrana y se sabe que cuando son específicas para alguna bacteriocinas se encuentra inmediatamente río abajo del gen estructural, por lo tanto, es probable que el ORF 903 codifique para una proteína de inmunidad.

ORF 901, codifica para la Enterocina X cadena α y ORF 902, codifica para la Enterocina X cadena β

La enterocina X, compuesta por dos péptidos antibacterianos (Xα y Xβ), es una bacteriocina de clase IIb, purificada por primera vez de la cepa KU-B5 de *Enterococcus faecium*, aislada de manzanas dulces. Se ha identificado en cepas de *E. faecium* que producen la enterocina A y B.

Hu y colaboradores en 2010 aislaron dos péptidos desconocidos, en su trabajo denominados enxA y enxB; en sus secuencias, detectaron los motivos GXXXG, que a

menudo se encuentran en la mayoría de las bacteriocinas de dos péptidos, también mencionan que ambos codifican un prepéptido de tipo doble glicina con una secuencia líder de 18 residuos. Comparando la secuencia peptídica publicada por estos autores con las secuencia de los ORFs 901 y 902 de la cepa QD-2, se puede observar que 901 con respecto a la secuencia reportada para la Enterocina X cadena α y 902 con respecto a la secuencia reportada para la Enterocina X cadena β son idénticas, respectivamente. También se puede mencionar que las secuencias peptídicas de las proteínas codificadas por los ORFs 901 y 902 tienen una secuencia líder de 18 residuos de aminoácidos y son del tipo doble glicina (Figura 22).

La región genética que codifica para la enterocina X de acuerdo a lo publicado por Hu y colaboradores (2010), contiene seis ORFs, las funciones de los *orfX1, orfX2* y *orfX3* se desconocen, al *orfX4*, ubicado río abajo de *enxB*, lo reportan como posible gen de inmunidad para la enterocina X, debido a su ubicación y a que contiene dos dominios transmembrana putativos (Figura 23)

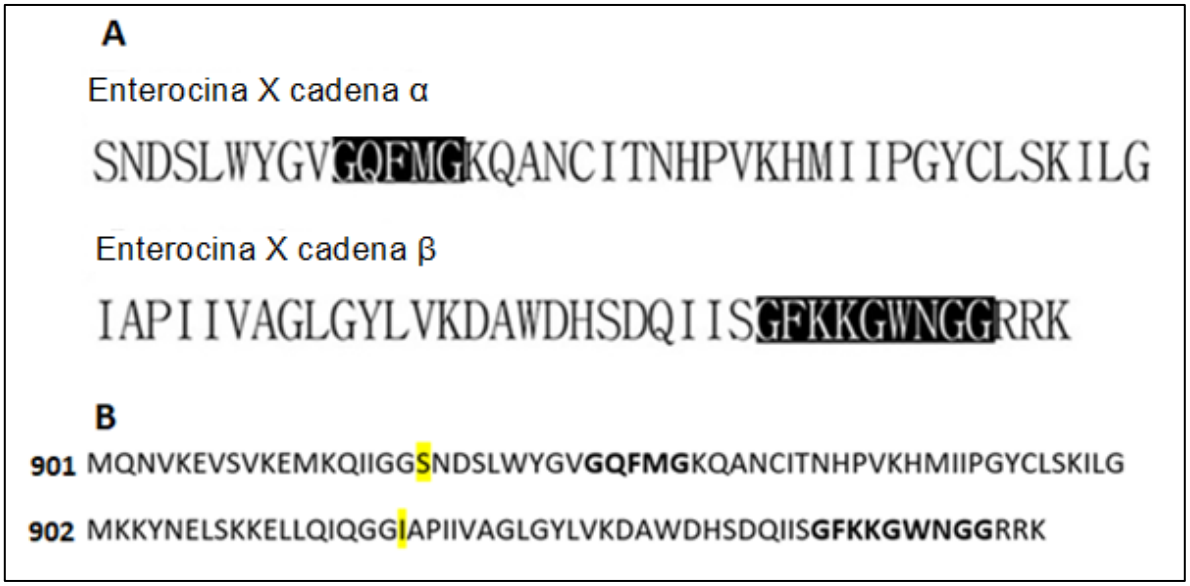


Figura 22. Comparación de la secuencia peptídica de la Enterocina X cadena α y Enterocina X cadena β con las secuencias de los ORFs 901 y 902. A) Secuencia reportada para la enterocina Xα y Xβ por por Hu y colaboradores en 2010, B) Secuencias peptídicas obtenidas de los ORFs 901, 902, estas últimas corresponden a los prepéptidos. En color amarillo se señala el inicio del péptido maduro y en negritas se resalta los motivos GXXXG.

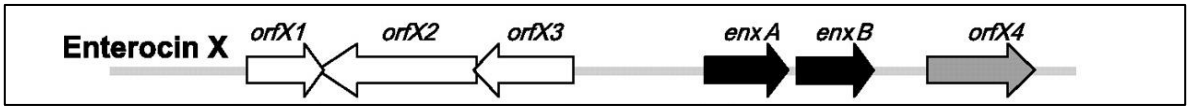


Figura 23. Región génica reportada para la Enterocina X. Hu *et al*., 2010

Hu y colaboradores revelan que el gen *enxB* está ubicado a 19 nucleótidos río abajo de *enxA* en la misma dirección. Comparándolo con los resultados obtenidos en este trabajo el ORF 902 se encuentra a 18 pb río abajo del ORF 901 y ambos en la misma dirección (Figura 24).

AAAAATAATATAAAAGGCGCGAGTTCCAATATGCAAAATGTAAAAGAAGTTTCTGTAAAAGAGATGAAACA
AATTATCGGTGGTTCTAATGATAGTCTTTGGTATGGTGTAGGACAATTTATGGGTAAACAAGCAAACTGTAT
AACAAACCATCCTGTTAAACACATGATAATTCCTGGATATTGTTTATCGAAAATTTTAGGGTAAGCGTAGGA
GTGAATATTAATGAAAAAATATAATGAGTTATCTAAAAAAGAACTTCTACAGATTCAAGGAGGAATAGCAC
CTATTATAGTTGCTGGCCTTGGCTATTTAGTAAAAGATGCATGGGATCACTCAGATCAAATAATCTCAGGAT
TTAAAAAAGGTTGGAATGGTGGACGTAGAAAATAA

Figura 24. Secuencias de nucleótidos de los ORFs 901 y 902. En amarillo se resalta el codón de inicio para cada ORF y en gris el codón de término. La secuencia subrayada son los 18 nucleótidos que separan al ORF 901 del ORf 902.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, la región río arriba del locus de la enterocina X, desde *orfX1* hasta el extremo 5´ de *enxA,* tiene una secuencia similar a la región río arriba del locus de la enterocina B. Dentro de esta región se encuentran las secuencias líder de los prepéptidos de la Enterocina B y Enterocina Xα; siendo éstas casi idénticas, por lo que se sugiere que tienen la misma maquinaria de transporte, quizás la misma que el de la enterocina A. El gen que codifica la enterocina X ha sido detectado en cepas de *E. faecium* productores de enterocinas A y B (Figura 25) (Hu *et al.,* 2010).

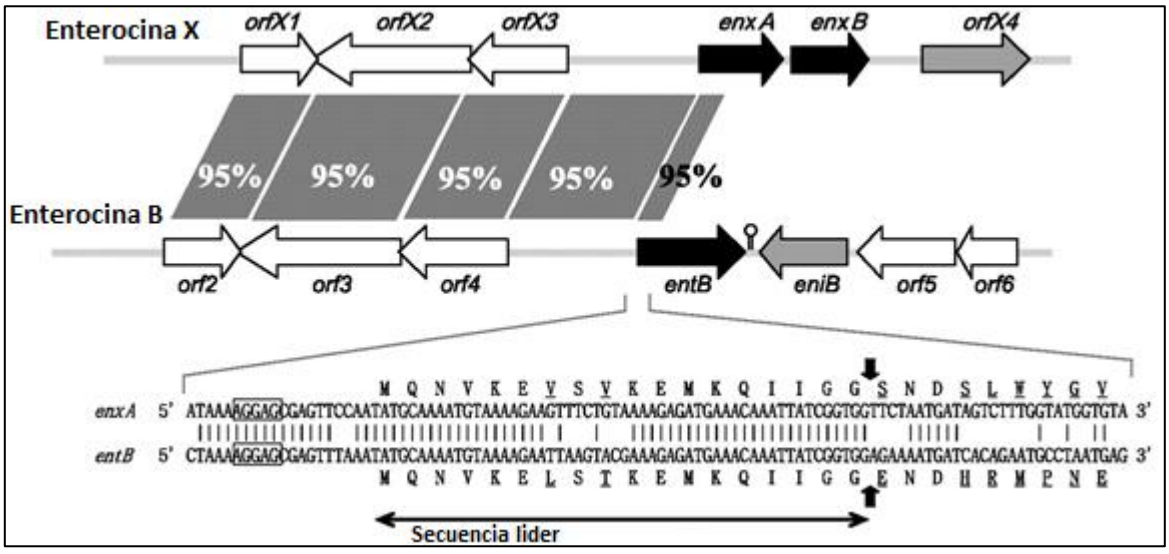


Figura 25. Alineación de las secuencias de ADN que contienen los determinantes genéticos de enterocina X y enterocina B. Los ORFs están representados por flechas, las negras corresponden a los ORFs que codifican un prepéptido con una supuesta secuencia líder de tipo doble glicina. *EnxA* y *enxB* son los ORFs estructurales de las enterocinas Xα y Xβ, respectivamente y *entB* es el gen estructural de la enterocina B. Las flechas grises representan genes de inmunidad, el *orfX4* es el gen de inmunidad supuesto para la

enterocina X y *eniB* el gen de inmunidad para la enterocina B. Las flechas blancas representan los genes con funciones desconocidas (Hu *et al*., 2010).

Comparando lo antes mencionado con el contexto genómico obtenido para los ORFs 901 y 902, se encontró coincidencia con lo reportado en la literatura para la enterocina X. Río abajo del ORF 901 se encuentra el ORF 902 y en seguida se encuentra el ORF 903 con dominio de proteína embebido en la membrana, por lo que pudiera tener anotación para una proteína de inmunidad. Río arriba del ORF 901 se encuentran los tres marcos de lectura abierto con función desconocida tal como los reportaron Hu y colaboradores en 2010.

- ✓ **CONTIG 20**

En la Figura 26 se muestra la representación esquemática del contexto genómico del contig 20 de *E. faecium* QD-2 donde se observa que el servidor web BAGEL 4 predice un ORF con anotación para una posible bacteriocina, la enterolisina A, correspondiente al ORF 2142. En la Tabla 9 se presenta la anotación de los ORFs presentes en el contig 20, para ello se emplearon las bases de datos de NCBI, UniProt y Pfam.

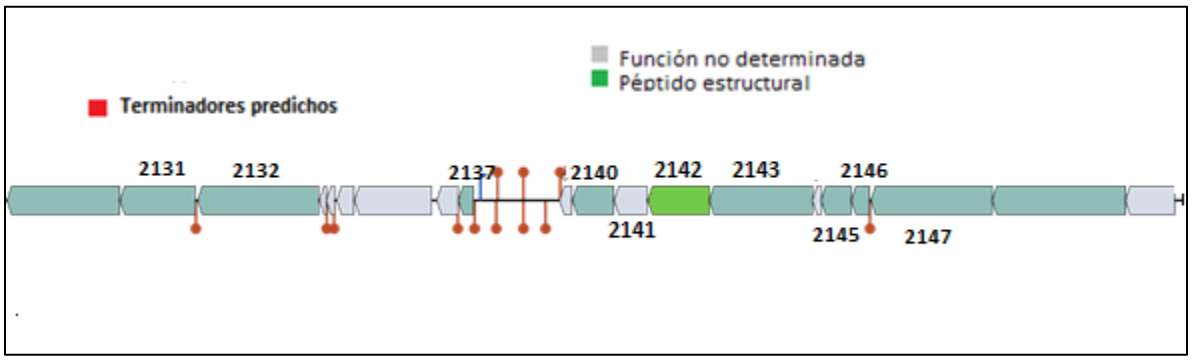


Figura 26. Contexto genómico del contig 20 de la cepa QD-2 de *E. faecium*. En verde se representa el ORF con anotación para bacteriocina putativa.

Tabla 9. BLAST y anotación de los ORFs que conforman el contig 20.

ORF	NCBI	ID (%)	UniProt	ID (%)	Pfam	Bit score
2131	Proteína hipotética	99.59	Proteína hipotética	99.8	Proteína hipotética	29.5
2132	Proteína hipotética	100	Proteína no caracterizada	99.7	Dominio de la subfamilia de metalopeptidasas	24.0
2137	Proteína hipotética	100	Proteína no caracterizada	100	Proteína FlgN	20.2
2140	Proteína hipotética	99.63	Proteína no caracterizada	99.6	Dominio del sensor bimodular helicoidal	18.7
2141	Proteína hipotética	99.53	Proteína no caracterizada	100	Clasificación vacuolar 38 y subunidad relacionada con autofagia	14.9
2142 Enterolisina A	Proteína con dominio glucosaminidasa	99.75	Peptidasa M23	99.8	Dominio de Glucosaminidasa	45.8
2143	ATPasa similar a VirB4	100	ATPasa	100	Dominio AAA ATPasa	16.6
2145	Proteína hipotética	99.49	Proteína no caracterizada	100	Proteína ribosomal L13e	14.4
2146	Proteína hipotética	99.15	Proteína no caracterizada	99.1	Familia de función desconocida	27.2
2147	Proteína hipotética	99.87	Proteína no caracterizada	98	Familia TrbC/VIRB2	11.3
2148	Proteína de la familia de transferencia de ADN conjugativa del sistema secretor tipo IV	99.89	Proteína de transferencia conyugal TraG/VirD4	97.5	Sitio de reconocimiento de TraM de TraD y TraG	92.7

Enterolisina A

Se ha reportado que es una bacteriocina producida por *Enterococcus faecalis* LMG 2333, es termolábil con un amplio espectro inhibidor, rompe la pared celular de las bacterias sensibles. Esta cepa fue aislada de peces en Islandia. Esta bacteriocina se traduce como una preproteína de 343 aminoácidos con un péptido señal dependiente de sec de 27 aminoácidos. La enterolisina A madura consta de 316 aminoácidos y tiene un peso molecular calculado de 34.501 KDa, inhibe el crecimiento de enterococos, pediococos, lactococos y lactibacilos (Nilsen *et al*., 2003).

Su extremo N terminal es homólogo a los dominios catalíticos de diferentes proteínas degradadoras de la pared celular tales como la lisostafina y a la zoocina A. Éstas son endopeptidasas que pertenecen a la familia de proteasas M37, por tal es probable que la base de datos de UniProt haya identificado al ORF 2142 como una peptidasa.

ORF 2142 con similitud a Enterolisina A

Analizando los datos de la Figura 26 y la Tabla 9, el ORF relacionado con la bacteriocina putativa es el ORF 2142. Los ORF aledaños corresponden a proteínas no caracterizadas o proteínas no relacionadas con la expresión de bacteriocinas. Teniendo en cuenta que las tres bases de datos identificaron al ORF 2142 como una peptidoglucano hidrolasa, la descartamos de este estudio.

- ✓ **CONTIG 66**

En la Figura 27, se muestra el diagrama del contexto genómico obtenido por el servidor BAGEL4 donde se puede observar que se predice el ORF 2596 con anotación para una bacteriocina, identificada como Enterocina B.

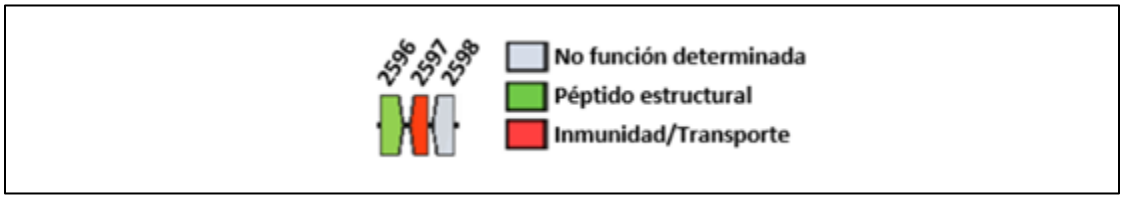


Figura 27. Contexto genómico del contig 66 de *E. faecium* QD-2. En verde se representa el ORF con anotación para la enterocina B.

Tabla 10. BLAST y anotación de los ORFs que forman el contexto genómico de la bacteriocina putativa del contig 66.

ORF	NCBI	ID (%)	UniProt	ID (%)	Pfam	Bit score
2596	Bacteriocina clase II	98.59	Bacteriocina Carnobacteriocina A	100	Bacteriocina clase II	28.8
2597	Proteína de inmunidad de enterocina	100	Proteína de inmunidad de enterocina B	100	Proteína de familia de función desconocida	14.8
2598	Proteína hipotética	100	Proteína no caractrizada	100	----	----

Enterocina B

La enterocina B fue aislada de la cepa T136 de *Enterococcus faecium*, se expresa como un prepéptido de 71 aminoácidos y contiene un péptido líder del tipo doble glicina que se escinde para dar la enterocina B madura que consta de 53 aminoácidos, es 47% idéntica a la carnobacteriocina A. La enterocina B no contiene el motivo YGNGVxC que caracteriza a las bacteriocinas tipo pediocina; sin embargo, tiene similitud de secuencia con las bacteriocinas de esta familia. Su péptido líder de 18 aminoácidos tiene el mismo tamaño y

un 50% o más de identidad de secuencia con el péptido líder de la carnobacteriocina A (Casaus *et al.,* 1997).

Las bacteriocinas de clase II tienen claras similitudes en su contexto genómico, que consiste en el gen estructural seguido inmediatamente por un gen que codifica la proteína de inmunidad, genes para transporte y proteínas accesorias. Algunas bacteriocinas de clase IIa están reguladas y pueden tener un factor de inducción, así como genes reguladores. (Franz *et al*., 1999). Para el caso de la enterocina B, únicamente se han podido identificar el gen estructural y el de inmunidad que se encuentra localizado río abajo y con orientación opuesta al gen estructural (Figura 28), no se ha reportado ningún otro gen asociado a la producción de la bacteriocina, esto contrasta con el contexto genómico descrito para las bactericinas clase II, por lo que el locus genético de la enterocina B es atípico (Franz *et al*., 1999). En el contexto genómico para la enterocina B de la cepa QD-2, inmediatamente río abajo del gen estructural se encuentra un ORF en sentido opuesto que fue identificado por las bases de datos de NCBI y UniProt como proteína de inmunidad de enterocina, estos resultados concuerdan con el contexto genómico ya reportado para la enterocina B (Figura 28).

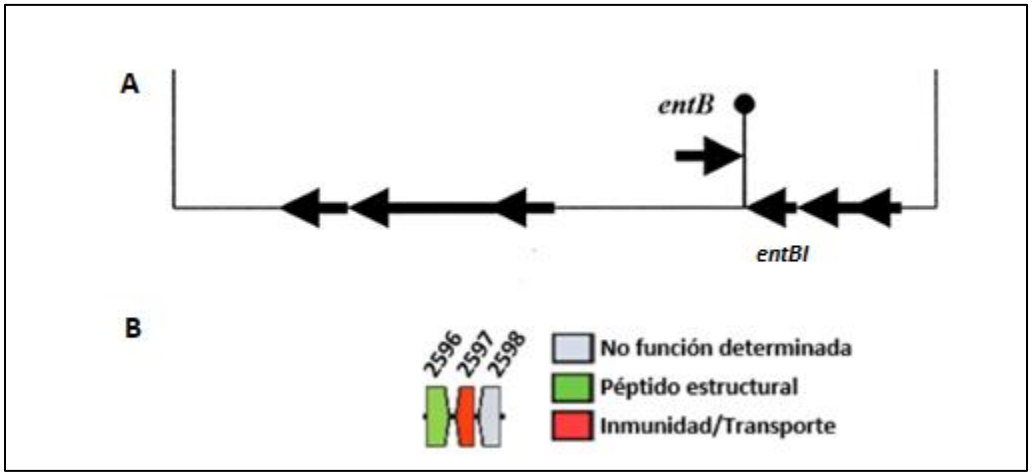


Figura 28. Comparación del locus genético de la enterocina B.
A) Contexto genómico reportado para la enterocina B Franz *et al*., 1999
B) Contexto genómico obtenido en este trabajo para la enterocina B

ORF 2596 codifica una proteína con similitud a la Enterocina B

En la Tabla 10 y Figura 27 se muestra el análisis que se realizó a los ORFs que conforman el contexto genómico de la enterocina que se encuentra en el contig 66, se identificó al ORF 2596 con posible anotación para bacteriocina clase II. El ORF 2597 fue identificado como una proteína de inmunidad, que de acuerdo a la base de datos de UniProt, se identificó específicamente como proteína de inmunidad de la enterocina B, seguido de un ORF con función desconocida, lo cual coincide con lo reportado anteriormente por Franz y colaboradores en 1999.

7.1.2 Predicción de Promotores

Con la finalidad de determinar a cuales de los ochos ORFs con anotación para bacteriocinas putativas se les podía predecir un posible promotor, se realizó la búsqueda de los mismos empleando las plataformas iPRo70-FMWin y BProm.

ORF 615, Bacteriocina no caracterizada y ORF 616, Bacteriocina no caracterizada con similitud a Acidocina_ LF221B

En la Figura 29 se presenta el posible promotor para los ORFs 615 y 616. En la Tabla 11, se muestran los puntajes obtenidos para los hexámeros -35 y -10 del posible promotor de estos ORFs. Para el ORF 616 los puntajes obtenidos son muy bajos por lo que se descartó como posible promotor. En cambio, se observa que los puntajes obtenidos para el posible promotor del ORF 615 son más altos, lo que indica que hay mayor probabilidad de que las secuencias realmente correspondan a un promotor.

Considerando que ambos ORFs se encuentran contiguos, que en la literatura los han reportado como bacteriocinas de clase IIb y que el posible promotor para el ORF 615 obtuvo un puntaje mayor, se propone que ambos ORFs formen un operón bicistrónico por lo que estarían regulados por el mismo promotor, en este caso, el que se ubica río arriba del ORF 615.

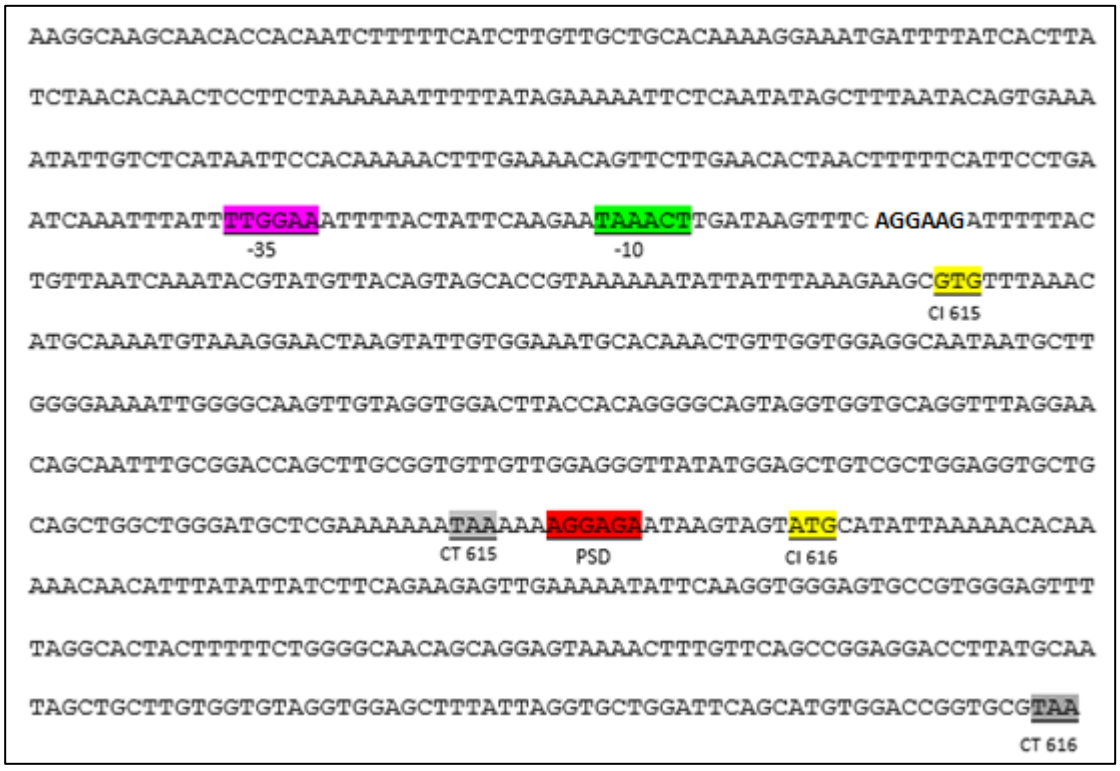


Figura 29. Posible promotor para los ORFs 615 y 616.
Hexámero -35 en morado, hexámero -10 en verde, posible Shine Dalgarno en rojo, codón de inicio en amarillo, codón de término en gris

Tablas 11. Puntaje de posibles promotores de acuerdo a la plataforma de BProm y iPro70-FMWin para los ORFs 615 y 616

ORF	Promotor	BProm	iPro70-FMWin	ORF	Promotor	BProm	iPro70-FMWin
615	-35	32	0.7860	**616**	-35	24	0.0914
	-10	48	0.7860		-10	48	0.0914

Ya teniendo un posible promotor para estos dos ORFs, se realizó su análisis comparando las secuencias de los hexámeros con las secuencias consenso -10 y -35, de igual manera, se analizó la región espaciadora entre estos dos hexámeros, la separación óptima es de 17 pb. Este análisis se realizó para saber qué tan degenerado se encuentra el posible promotor.

El promotor predicho para los ORFs 615 y 616 muestra una separación óptima entre los elementos -35 y -10, es decir, tienen una separación de 17 pb. En la Tabla 12 se observa la comparación de las secuencias de los hexámeros con respecto a las secuencias consenso. Es importante mencionar que el subíndice denota el porcentaje de aparición de cada base.

Para el hexámero -10 se observa que los nucleótidos de la posición -10 y -8 cambian por una adenina y citosina, respectivamente y en la región -35, los nucleótidos de la posición -33 y -34 cambian por una adenina y guanina, respectivamente. Se puede observar que cada hexámero presenta dos cambios y que en ambos casos se encuentran entre los nucleótidos que presentan un porcentaje de aparición menor.

Tabla 12. Comparación de la secuencias de los hexámeros -35 y -10 del promotor para el operón bicistrónico (ORFs 615 y 616) con respecto a la secuencias consenso.

Hexámero -10	**-12**	**-11**	**-10**	**-9**	**-8**	**-7**
	T_{80}	**A_{95}**	**T_{45}**	**A_{60}**	**A_{50}**	**T_{96}**
	T	A	A	A	C	T
Hexámero -35	**-37**	**-36**	**-35**	**-34**	**-33**	**-32**
	T_{82}	**T_{84}**	**G_{78}**	**A_{65}**	**C_{54}**	**A_{45}**
	T	T	G	G	A	A

Nota: Casillas sombreadas en azul son aquellos nucleótidos que presentan cambio con respecto a la secuencia consenso de cada hexámero

ORF 621, codifica para la Enterocina A

Se hizo la búsqueda del posible promotor para el ORF 621 (Figura 30). De acuerdo a los resultados de las plataformas iPro70-FMWin y BProm, se observa que ambos hexámeros obtuvieron un alto puntaje, lo que indica que dichas secuencias tienen alta probabilidad de ser un promotor (Tabla 13).

Del análisis del posible promotor se puede decir que; la distancia entre ambos hexámeros es de 11 pares de bases, aunque no se detectó a simple vista la secuencia consenso para un posible Shine-Dalgarno, la enterocina A ha sido aislada de diferentes cepas de

Enterococcus faecium. El hexámero -10 presenta una secuencia idéntica a la consenso, el hexámero -35 presenta dos cambios en comparación a la secuencia canónica, siendo los nucleótidos -32 y -35 que cambian por una guanina y una citosina respectivamente (Tabla 14).

Con estos resultados podemos decir que el promotor no cumple con la distancia óptima de la región espaciadora y presenta un cambio en una de las bases más conservadas en el hexámero -35, sin embargo, la caja -10 tiene exactamente la secuencia consenso.

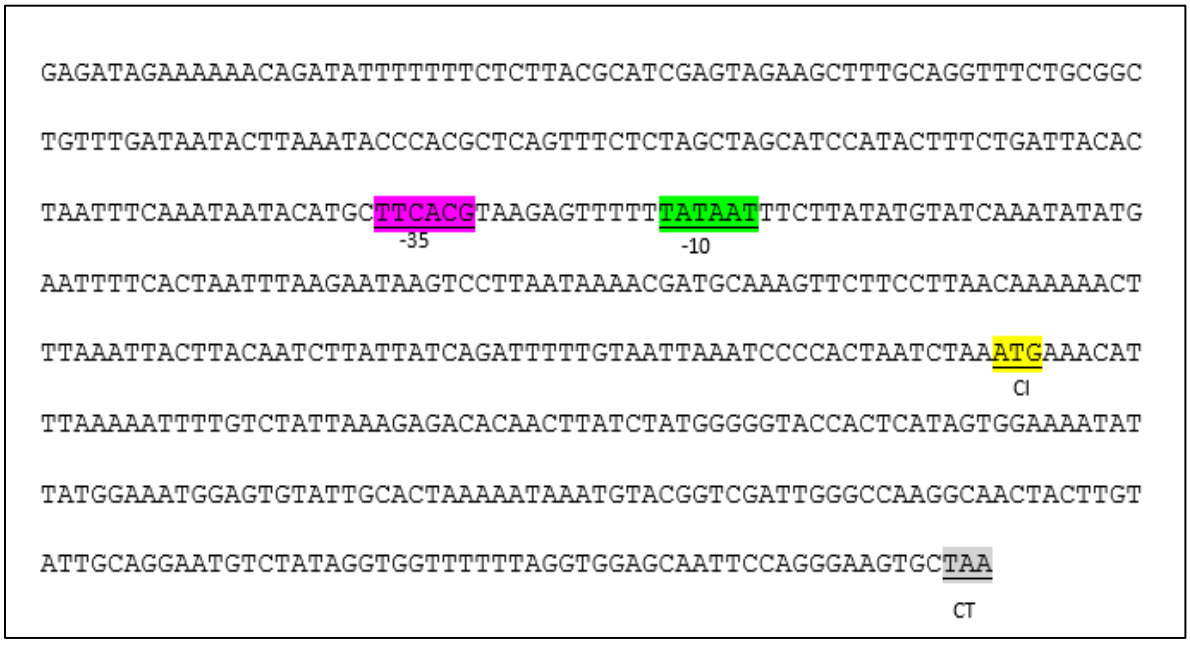


Figura 30. Posible promotor para el ORF 621
Hexámero -35 en morado, hexámero -10 en verde, codón de inicio en amarillo, codón de término en gris

Tabla 13. Puntaje de posible promotor de acuerdo a la plataforma de Bprom y iPro70-FMWin para el ORF 621

ORF	Promotor	Bprom	iPro70-FMWin
621	-35	86	0.9960
	-10	40	0.9866

Tabla 14. Comparación de la secuencias de los hexámeros -35 y -10 del promotor para el OFR 621 con respecto a la secuencias consenso.

Hexámero -10	-12	-11	-10	-9	-8	-7
	T80	**A95**	**T45**	**A60**	**A50**	**T96**
	T	A	T	A	A	T
Hexámero -35	**-37**	**-36**	**-35**	**-34**	**-33**	**-32**
	T82	**T84**	**G78**	**A65**	**C54**	**A45**
	T	T	C	A	C	G

Nota: Casillas sombreadas en azul son aquellos nucleótidos que presentan cambio con respecto a la secuencia consenso de cada hexámero

ORF 718, Codifica para una bacteriocina con similitud a la bacteriocina UviB con dominio de holina

En la Figura 31 se presenta el posible promotor para el ORF 718. Con respecto a su análisis, el puntaje obtenido para cada hexámero es muy bajo (Tabla 15), por lo que hay poca probabilidad que las secuencias propuestas correspondan a un promotor.

Haciendo la comparación de las secuencias consenso, el hexámero -35 sólo conserva tres bases de la secuencia canónica, dos de ellas de las más conservadas (-36 y -37) y una de ellas de las menos conservadas (-34). El hexámero -10 sólo cambia en la base -9, la cual es una de las bases con menor porcentaje de aparición, variando guanina por adenina (Tabla 16). La distancia entre estos dos hexámeros es de 12 pb y no hay presencia del elemento -10 extendido.

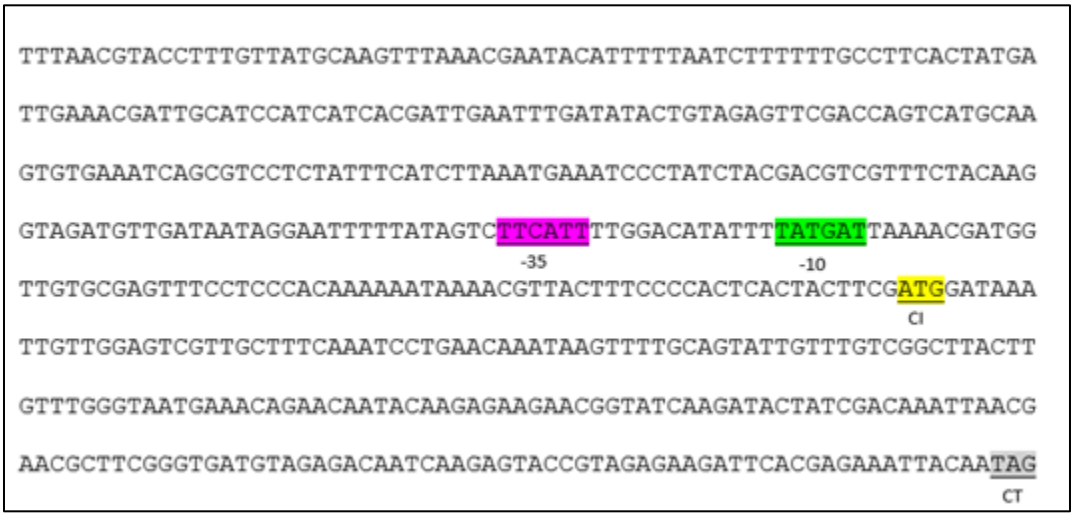


Figura 31. Contexto genómico del contig 3.1 y posible promotor para el ORF 718 Hexámero -35 en morado, hexámero -10 en verde, codón de inicio en amarillo.

Tabla 15. Score de posible promotor de acuerdo a la plataforma de BProm y iPro70-FMWin para el ORF 718

ORF	Promotor	BProm	iPro70-FMWin
718	-35	33	0.3302
	-10	70	0.4851

Tabla 16. Porcentaje de aparición de cada base en la secuencia consenso del hexámero -10 y -35 para el promotor del ORF 718

Hexámero -10	**-12**	**-11**	**-10**	**-9**	**-8**	**-7**
	T80	**A95**	**T45**	**A60**	**A50**	**T96**
	T	A	T	G	A	T
Hexámero -35	**-37**	**-36**	**-35**	**-34**	**-33**	**-32**
	T82	**T84**	**G78**	**A65**	**C54**	**A45**
	T	T	C	A	T	T

Nota: Casillas sombreadas en azul son aquellos nucleótidos que presentan cambio con respecto a la secuencia consenso de cada hexámero

ORF 901, codifica para la Enterocina X cadena α y ORF 902, codifica para la enterocina X cadena β

Se realizó la búsqueda de los posibles promotores para los ORFs 901 y 902, se analizaron y los resultados indican que el puntaje obtenido para el promotor del ORF 902 es muy bajo, lo que sugiere que las secuencias propuestas no corresponden a las de un promotor, sin embargo, en el caso del puntaje obtenido para el promotor del ORF 901 son altos, indicando que estas secuencias posiblemente corresponden a un promotor (Tabla 17).

Considerando los puntajes obtenidos para cada promotor y sabiendo que ambos ORFs se encuentran contiguos, se sugiere que ambos formen un mismo operón por lo que estarían regulados por un mismo promotor, en este caso, el promotor predicho para el ORF 901 (Figura 32).

Continuando con el análisis del posible promotor, se puede mencionar que la distancia entre el hexámero -35 y -10 es de 15 pb. Comparando los dos hexámeros con las secuencias consenso correspondientes, se puede mencionar que la secuencia del hexámero -35 cambia en la base -33, -34 y -35, de éstas la -33 y -34 se encuentran dentro de las bases con menor porcentaje de aparición, sin embargo, la base -35 es una de las tres bases mayor conservadas. El hexámero -10 sólo presenta un cambio en la posición -10 siendo esta la que tiene más variabilidad (Tabla 18).

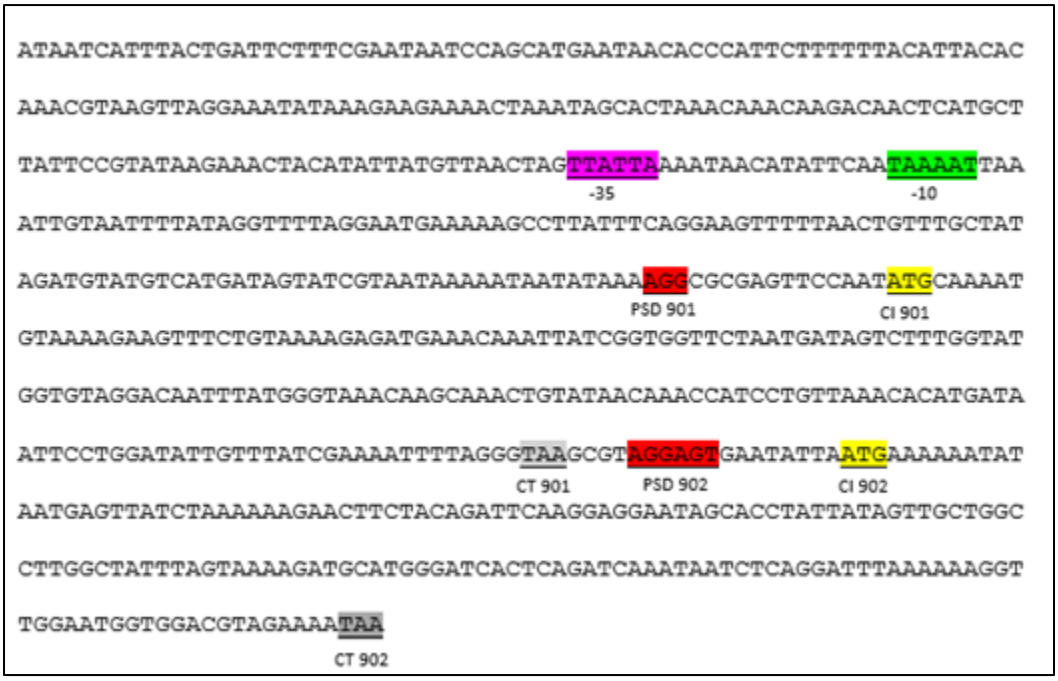


Figura 32. Posible promotor para los ORFs 901 y 902.
Hexámero -35 en morado, hexámero -10 en verde, posible Shine Dalgarno en rojo, codón de inicio en amarillo

Tabla 17. Score de los posibles promotores de acuerdo a la plataforma de BProm y iPro70-FMWin para los ORFs 901 y 902.

ORF	Promotor	BProm	iPro70-FMWin	ORF	Promotor	BProm	iPro70-FMWin
901	-35	22	0.9981	**902**	-35	53	0.4973
	-10	57	0.9981		-10	51	0.1140

Tabla 18. Comparación de la secuencias de los hexámero -35 y -10 del posible promotor para el operón bicistrónico (genes 901 y 902) con respecto a las secuencias consenso.

Hexámero -10	**-12**	**-11**	**-10**	**-9**	**-8**	**-7**
	T80	**A95**	**T45**	**A60**	**A50**	**T96**
	T	A	A	A	A	T

Hexámero -35	**-37**	**-36**	**-35**	**-34**	**-33**	**-32**
	T82	**T84**	**G78**	**A65**	**C54**	**A45**
	T	T	A	T	T	A

Nota: Casillas sombreadas en azul son aquellos nucleótidos que presentan cambio en la secuencia consenso de cada hexámero.

ORF 2596, codifica una proteína con similitud a la Enterocina B

En la Figura 33 se muestra el posible promotor para el ORF 2596, de acuerdo con el análisis que se le realizó, se puede mencionar lo siguiente. La distancia entre los elementos -35 y -10 es de 17 pb, la secuencia del hexámero -35 difiere de la secuencia consenso únicamente en la base -32, siendo ésta la menos conservada. Para el caso del hexámero -10, las bases que cambian son las que se encuentran en la posición -7 y -8, siendo la -7 la base con mayor porcentaje de aparición (Tabla 20). Sin embargo, los puntajes obtenidos para para cada hexámero son valores muy bajos por lo que es probable que esta secuencia no corresponde a un promotor (Tabla 19).

Figura 33. Posible promotor para el ORF 2596
Hexámero -35 en morado, hexámero -10 en verde, codón de inicio en amarillo

Tabla 19. Puntaje del posible promotor del ORF 2596 de acuerdo a la plataforma de BProm y iPro70-FMWin

ORF	Promotor	BProm	iPro70-FMWin
2596	-35	61	0.3136
	-10	25	0.3136

Tabla 20. Comparación de secuencias consenso con secuencias del posible promotor del ORF 2596

Hexámero -10	**-12**	**-11**	**-10**	**-9**	**-8**	**-7**
	T80	**A95**	**T45**	**A60**	**A50**	**T96**
	T	A	T	A	G	C
Hexámero -35	**-37**	**-36**	**-35**	**-34**	**-33**	**-32**
	T82	**T84**	**G78**	**A65**	**C54**	**A45**
	T	T	G	A	C	T

Nota: Casillas sombreadas en azul son aquellos nucleótidos que presentan cambio en la secuencia consenso de cada hexámero.

De acuerdo a los resultados bioinformáticos de los ocho ORFs codificantes para bacteriocinas putativas presentes en el genoma de *Enterococcus faecium* QD-2, seis coinciden en su contexto genómico con el ya reportado en la literatura, éstos son los ORFs 615, 616, 621, 902, 902 y 2596, ya que su contexto genómico contiene elementos involucrados en la expresión de las bacteriocinas, ya sea el gen codificante para proteína de inmunidad, genes relacionados con la exportación y/o genes relacionados con la regulación de la expresión de las bacteriocinas.

Con respecto al análisis de los posibles promotores, los resultados sugieren que los ORFs 615 y 616 se encuentran en un operón biscistronico, al igual que los ORFs 901 y 902. Los promotores para los ORFs 615, 621 y 901 son los que obtuvieron un mayor puntaje por lo que se eligieron como posibles promotores para estos operones.

7.2 Evaluación Fenotípica

7.2.1 Análisis de Pureza

En la Figura 34 se muestra la tinción de Gram que se realizó a la cepa QD-2 para analizar su pureza, se visualizaron varios campos y únicamente se observaron cocos Gram positivos solos, en pares o cadenas cortas que, de acuerdo a lo reportado en la literatura, corresponden a las características microscópicas de *E. faecium.*

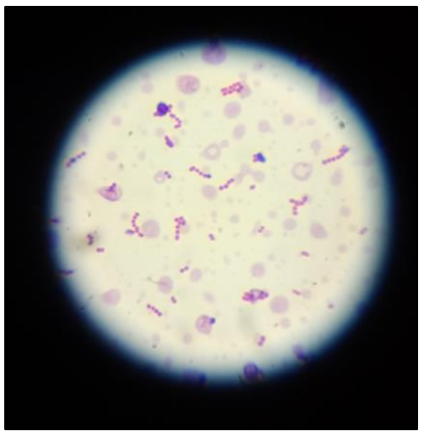


Figura 34. Tinción de Gram de la cepa QD-2 de *E. faecium*

7.2.2. Cinética de Crecimiento de *E. faecium* QD-2 en presencia de diferentes concentraciones de NaCl

Uno de los factores de estrés más común en los alimentos es el estrés osmótico asociado a la presencia de NaCl. El NaCl se utiliza como conservador ya que modifica la actividad acuosa de los alimentos, con lo que reduce y previene el crecimiento microbiano debido a su papel bactericida.

Con el objetivo de determinar el punto en el que se realizaría la extracción de ARN en cada condición a analizar la variación de la transcripción de ORFs para bacteriocinas, se realizaron las cinéticas de crecimiento en medio MRS a 37°C con diferentes concentraciones de NaCl: 0%, 3% y 5% (equivalente a 0, 0.05 y 0.086 OsM).

De acuerdo a un estudio realizado por Vallejo *et al.,* en 2014, la máxima producción de bacteriocinas es al final de la fase exponencial de crecimiento, por lo que se decidió realizar la extracción de ARN en ese momento para poder obtener la mayor cantidad de ARNm de cada bacteriocina. Estas cinéticas se realizaron por triplicado midiendo la densidad óptica (D.O.) a 600 nm, Se observa que en la condición de 0% de NaCl, la parte final de la fase exponencial se alcanzó a las 6 horas de incubación, en la condición de 3% de NaCl, se alcanzó a las 7.5 horas de fermentación y, por último, en la concentración de 5% de NaCl se necesitaron 12 horas de incubación para alcanzar la parte final de la fase exponencial de crecimiento (Figura 35)

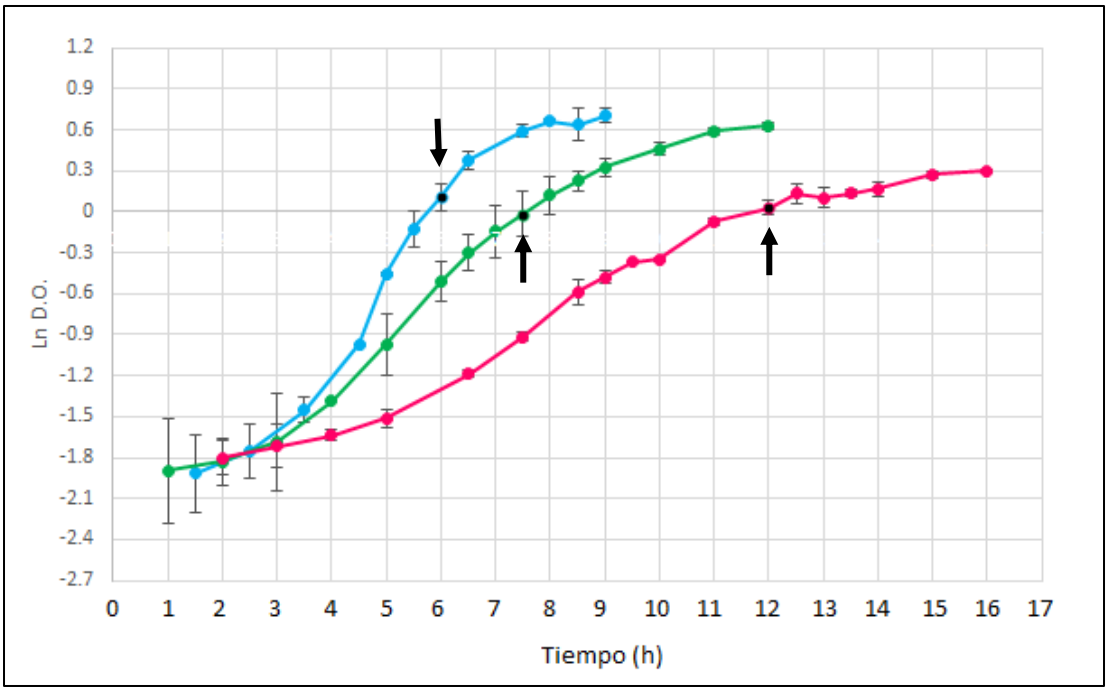


Figura 35. Crecimiento de *E. faecium* QD-2 en medio MRS a diferentes concentraciones de NaCl. Incubación a 37°C. Las flechas indican el punto dónde se realizó la extracción de ARN. Las tres cinéticas se realizaron por triplicado.

Se determinó la velocidad específica de crecimiento para las tres condiciones de cultivo, se obtuvo que para la condición de 0% NaCl la velocidad de crecimiento es de $\mu = 0.5439\ h^{-1}$, para la concentración de 3% NaCl es $\mu = 0.3449\ h^{-1}$ y para la condición de 5% NaCl es $\mu = 0.2226\ h^{-1}$. Haciendo una comparación entre las velocidades de crecimiento en las tres condiciones de cultivo analizadas, se observa que el NaCl es un factor influyente en el crecimiento de *E. faecium* QD-2, conforme aumenta la concentración de sal la velocidad de crecimiento es más baja, por lo que la duración de la fase exponencial aumenta, necesitándose más tiempo para alcanzar la fase estacionaria. Estos resultados coindicen con lo publicado por Leroy y colaboradores en 2003, donde se demuestra que el estrés salino disminuye el crecimiento celular de *E. faecium* RZS C5.

7.3 Análisis de Expresión de Genes

7.3.1 Extracción de ARN total, Cuantificación y Análisis de su Integridad

Se realizó la extracción de ARN de la cepa QD-2 para las tres condiciones a analizar a partir de cultivos con 6 hrs, 7.5 hrs y 12 hrs de incubación para la condición de 0%, 3% y 5% de NaCl, respectivamente. Se determinó la concentración de ARN por medio de absorbancia a 260 nm y la pureza con las relaciones 260/280 nm y 260/230 nm, para esto se utilizó el NanoDrop (Thermo Scientific). En la Tabla 21 se muestran estos resultados.

Los valores de absorbancia a 280 y 230 nm se utilizan para calcular índices de pureza de los ácidos nucleicos. Estos índices son sensibles a la presencia de contaminantes en la muestra, como los disolventes y reactivos residuales que se utilizan en la extracción del material genético.

A 230 nm se absorben contaminantes como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos. La relación A260/230 en muestras de ARN en general se considera que es aceptable si es >1.5.

Para la relación A260/280 en muestras de ARN, un valor cercano a ≈ 2.0, es generalmente aceptado como puro, (Thermo Scientific, Guía del usuario de NanoDrop One, 2016).

Tabla 21. Cuantificación de ARN extraído de la cepa QD-2 de *E. faecium*, incubada en medio MRS con 0%, 3% y 5% NaCl a 37°C. Muestras seleccionadas para realizar la reacción RT-qPCR

Concentración NaCl	Muestra	Concentración de ARN (ng/µL)	A260/280	A260/A230
0% NaCl	1.1	448.25	1.62	0.45
	2.1 A	2730.05	1.99	1.94
	3.1	1328.2	1.97	1.80
3% NaCl	1	3465.6	2.0	1.67
	2	2400.05	2.01	1.71
	3	3080.0	1.99	1.85
5% NaCl	1.1	1497.9	1.96	1.77
	2	1405.8	1.94	1.44
	3	1039.3	1.95	1.62

Nota: Se seleccionó una muestra de cada fermentación, las número 1 corresponden a la fermentación 1, las número 2 corresponden a la fermentación 2 y las número 3 corresponden a la fermentación 3.

El ARN obtenido tiene buena pureza (Tabla 21). Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% - formaldehído 18% con el objetivo de evaluar la integridad del ARN obtenido (Figura 36). En este gel se observó la presencia de tres bandas, las dos primeras corresponden al ARN ribosomal de las subunidades del ribosoma bacteriano, el cual está conformado por dos subunidades, la subunidad grande 50S (contiene los ARNr 23S y 5S) y la subunidad pequeña 30S (contiene el ARNr 16S) (Rodicio & Mendoza, 2004).

Las bandas bien definidas indican que el ARN obtenido se encuentra íntegro, aunado a que es de buena calidad, por lo tanto se prosiguió a realizar las reacciones de RT-qPCR para analizar la variación de la expresión de los ORFs codificantes para bacteriocinas putativas.

La Figura 36 corresponde al gel agarosa 1% - formaldehído 18%, para las muestras de ARN obtenido en la extracción en las condiciones de 0% NaCl. Para las condiciones de 3% y 5% NaCl los geles obtenidos en la electroforesis de igual manera mostraron las tres bandas bien definidas, resultados no mostrados.

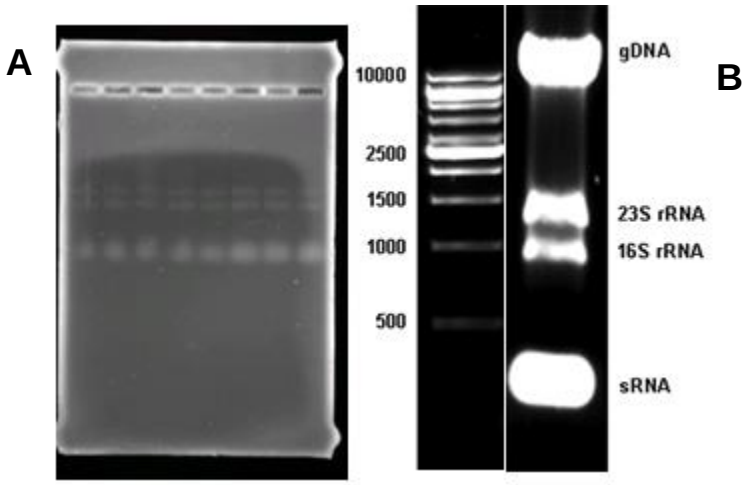


Figura 36. Gel de agarosa 1% - formaldehido 18%. Evaluación de la integridad del ARN extraído de *E. faecium* QD-2 incubado en condiciones estándares (medio MRS, 0% NaCl a 37°C). De arriba hacia abajo, las primeras dos bandas corresponden al ARNr 23S y 16S, respectivamente. La tercer banda corresponde a RNAs pequeños.

7.3.2 Análisis de los niveles de transcritos de bacteriocinas putativas mediante RT-qPCR

Se ha reportado que el género *Enterococcus* expresa a la bacteriocina EntA, que pertenece a la clase IIa; de igual manera, algunas cepas también pueden expresar bacteriocinas de clase IIb, como la Enterocina X. El género *Enterococcus* a menudo tiene más de un gen codificante para bacteriocinas; sin embargo, no todos los genes se expresan (Escamilla *et al*., 2017).

Al realizar una RT-qPCR se obtiene una gráfica de amplificación, en la cual se puede observar el valor de Ct que corresponde a la intersección de la línea umbral con la curva de amplificación. El valor de Ct equivale al número de ciclos necesarios para que la amplificación comience a ser exponencial; mientras mayor cantidad de ADN blanco haya en una muestra, menor el número de ciclos (Ct) que se requiere para alcanzar este umbral, es decir, es un valor inversamente proporcional a la cantidad de ADN blanco que haya sido amplificado (Aguilera *et al*., 2014).

Las condiciones que se emplearon para la RT-qPCR se muestran en la Tabla 4. Al emplearse un colorante de unión como flouróforo (SYBR Green), después de los ciclos de amplificación, se realizó una curva de disociación, ésta ayuda a corroborar la especificidad del ensayo. Cada amplicón obtenido tuvo una temperatura de fusión (Tm) diferente. Los resultados indican que los cebadores utilizados en este trabajo de investigación tuvieron una alta especificidad para cada uno de los ORFs analizados.

7.3.2.1 Gen *rpoA,* gen endógeno

Para analizar la transcripción de genes codificantes para bacteriocinas se definió como gen endógeno al gen *rpoA* que codifica para una de las subunidades alfa de la RNA polimerasa. Se trata de un gen de mantenimiento, por lo que se esperaba que en cualquier condición se hubiera expresado de manera constante; sin embargo, en la Tabla 22 se puede observar que su expresión cambia en presencia de NaCl.

En el anexo 10.6 se muestran las curvas de amplificación y la curva de disociación correspondientes al gen endógeno *rpoA* cuando *E. faecium* QD-2 se cultivó en diferentes concentraciones de NaCl.

En las tres gráficas se observa una curva de amplificación lo que indica que el gen se está transcribiendo en las tres condiciones analizadas. Los valores de Ct obtenidos se pueden consultar en la Tabla 22.

En el anexo 10.6 D se muestra la curva de disociación para el gen endógeno, donde se aprecia únicamente un pico, lo que indica que los cebadores empleados son altamente específicos para el gen de interés.

7.3.2.2 ORF 621, Enterocina A, gen de referencia

De acuerdo con los resultados bioinformáticos, el ORF 621 codifica para la enterocina A, ésta ya ha sido reportada en la literatura, fue aislada de cepas de *Enterococcus faecium*, está formada por 47 residuos de aminoácidos y tiene una secuencia líder de 18 aminoácidos, el cual es removido durante el proceso de maduración. El peso molecular de la bacteriocina madura es de 4.829 KDa, (Aymerich *et al*., 1996). En el anexo 10.7 se muestran las curvas de amplificación para este gen en las diferentes concentraciones de NaCl analizadas, así como también su curva de disociación.

De acuerdo a los resultados, el ORF 621 se expresa en las tres condiciones analizadas, los valores de Ct se pueden observar en la Tabla 22.

La curva de disociación para el ORF 621 se muestra en el Anexo 10.7 D, dónde se percibe únicamente un pico, lo que indica que los cebadores diseñados para este gen presentan alta especificidad.

7.3.2.3 ORFs 615 y 616, Enterocinas no caracterizadas

En el anexo 10.8 se muestran las curvas de amplificación para los ORFs 615 y 616 en concentraciones de 0%, 3% y 5% NaCl, se observa que en las tres condiciones ambas curvas empiezan a amplificar al mismo tiempo y se transcriben en cantidades muy parecidas ya que presentan valores de Ct muy semejantes (Tabla 22). Al empalmarse las curvas de amplificación de ambos ORFs, sabiendo que se encuentran contiguos y que posiblemente estén regulados por un mismo promotor, se sugiere que ambos ORFs forman parte de un operón bicistrónico y por ende presentan cotranscripción.

La curva de disociación de los ORFs 615 y 616 se muestra en el anexo 10.8 D y E, respectivamente, donde se observa que los cebadores son muy específicos para cada uno de los ORFs ya que en ambas curvas sólo se observa un pico.

7.3.2.4 ORFs 901 y 902, Enterocina X cadena α (901), cadena β (902).

En la literatura se ha reportado que la enterocina X cadena α y cadena β han sido aisladas de cepas de *E. faecium,* ambos péptidos de manera individual tienen actividad antimicrobiana pero al juntarlos presentan actividad sinérgica. El peso molecular reportado de estas dos bacteriocinas es de 4.42 y 4.06 KDa y están formadas por 40 y 37 residuos de aminoácidos, respectivamente (Hu *et al*.,2010).

En el anexo 10.9 se muestran las gráficas de amplificación para ambos ORFs en concentraciones de 0%, 3% y 5% de NaCl. En las tres condiciones se observa que las dos curvas de amplificación se empalman y presentan un valor de Ct muy parecido (Tabla 22). Los valores de Ct muy semejantes sugieren que ambos ORFs se transcriben en cantidades muy parecidas.

Por lo anterior y de acuerdo a los resultados bioinformáticos que indican que estos dos ORFs se encuentran contiguos y solamente el primero muestra un posible promotor, se sugiere que ambos se encuentran en un operón bicistrónico y presentan cotranscripción.

En el anexo 10.9 D y E se muestra la curva de disociación para los ORFs 901 y 902, respectivamente, en ambas se puede apreciar que los cebadores son muy específicos ya que en ambos casos sólo se observa un único pico.

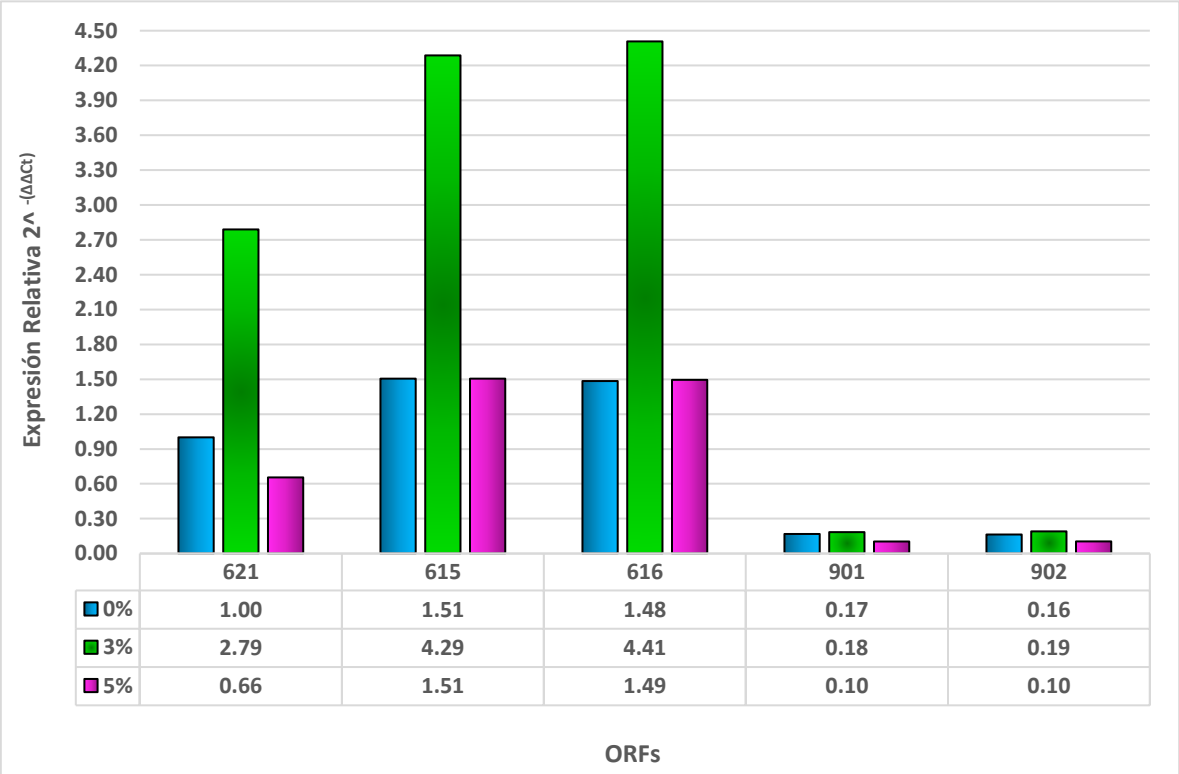
Tabla 22. Valores de Ct para todos los ORFs analizados en diferentes concentraciones de NaCl.

		Ct promedio		
ORF	**Nombre**	**0% NaCl**	**3% NaCl**	**5% NaCl**
rpoA	Subunidad α de la RNA polimerasa	15.72 ± 0.07	13.03 ± 0.09	14.85 ± 0.04
621	Enterocina A	22.36 ± 0.12	20.88 ± 0.13	22.97 ± 0.04
615	Bacteriocina no caracterizada	21.77 ± 0.04	20.26 ± 0.14	21.77 ± 0.05
616	Bacteriocina no caracterizada	21.79 ± 0.06	20.22 ± 0.18	21.78 ± 0.19
901	Enterocina X, cadena α	24.93 ± 0.16	24.80 ± 0.21	25.63 ± 0.12
901	Enterocina X, cadena β	24.97 ± 0.08	24.75 ± 0.25	25.62 ± 0.11

Podría esperarse que las condiciones para la producción máxima de bacteriocinas deberían corresponder a aquellas condiciones que también permiten la máxima densidad celular de la cepa productora, ya que la bacteriocina suele ser un metabolito primario (Leal-Sánchez *et al*., 2002). Sin embargo, se ha visto que el etanol, el NaCl y el $NaNO_3$, presentes en muchos entornos naturales, suelen inhibir tanto el crecimiento bacteriano como la producción de bacteriocinas (Delgado *et al*., 2007).

Una vez que se tenían los valores de Ct se empleó el método delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) para determinar qué tanto se expresan los ORFs de interés con respecto al ORFs de referencia, ORF 621 a 0% NaCl.

En la Figura 37 se realiza una comparación de la expresión de bacteriocinas en diferentes concentraciones de NaCl con respecto al ORF de referencia.



	621	615	616	901	902
0%	1.00	1.51	1.48	0.17	0.16
3%	2.79	4.29	4.41	0.18	0.19
5%	0.66	1.51	1.49	0.10	0.10

Figura 37. Expresión de ORFs codificantes para bacteriocinas en *E. faecium* QD-2 en diferentes concentraciones de NaCl.

Observando la Figura 37 y la Tabla 22, se aprecia que la expresión de los cinco ORFs codificantes para bacteriocinas putativas varía en presencia de NaCl. Siendo la concentración de 3% de NaCl la que favoreció una mayor transcripción en todos los casos.

El ORF 621 a una concentración 0% NaCl fue tomado como referencia ya que se ha reportado que *E. faecium* produce esta bacteriocina. Con los resultados de este trabajo, se pude decir que la transcripción del ORF 621 cambia en presencia de NaCl, favoreciéndose a una concentración de 3% NaCl y disminuyendo su expresión a una concentración de 5% NaCl, expresándose 2.79 veces y 0.66 veces lo que el gen de referencia en 3% y 5% NaCl, respectivamente (Figura 37).

Para los ORFS 615 y 616 se observa que a la condición de 3% NaCl tuvieron mayor expresión, transcribiéndose aproximadamente 4.35 veces lo que el ORF de referencia. Para las condiciones de 0% y 5% NaCl se transcribieron en cantidades semejantes, transcribiéndose aproximadamente 1.5 veces lo que el ORF de referencia (Figura 37)

Los ORFs 901 y 902 en las condiciones de 0% y 3% NaCl, mostraron una expresión semejante pero ligeramente mayor en la condición de 3% NaCl, expresándose 0.17 y 0.19 veces lo que el gen de referencia, respectivamente. Sin embargo, para la concentración de 5% NaCl tuvieron menor expresión, expresándose 0.10 veces lo que el ORF de referencia.

Observando la Figura 37 se puede apreciar que los ORFs 615 y 616 se expresaron más que el gen de referencia en cualquier concentración de NaCl, mientras que, los ORFs 901 y 902, en todas las condiciones se expresaron menos que el gen de referencia.

De manera general, la presencia de NaCl varía la expresión de los ORFs con anotación para bacteriocinas putativas. Independientemente de la cantidad de NaCl presente en cada condición, se observa la misma tendencia en los ORFs que codifican para bacteriocinas, es decir, todos mostraron mayor expresión en la condición de 3% NaCl y disminuyeron su transcripción en una concentración de 5% NaCl.

De acuerdo a lo publicado por Leal-Sánchez y colaboradores en 2002, la concentración de NaCl muestra una influencia estimulante sobre la producción de bacteriocinas cuando se encuentra en una concentración de hasta 2.5%, las concentraciones por encima de este nivel tienden a disminuir la producción de bacteriocinas. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo de investigación coinciden con lo publicado en dicho artículo.

Considerando que los ORFs 615, 616, 621, 901 y 902 son los que presentan transcripción se consultaron los pesos moleculares de las proteínas que codifican dichos ORFs (Tabla 23).

Recordando que anteriormente en el grupo de trabajo, Mendoza en el 2019 realizó el análisis electroforético del concentrado de bacteriocinas obtenido por adsorción-desorción cuando la cepa QD-2 se incubó con 0% NaCl (Figura 14), y considerando los datos de la Tabla 23, se sugiere que las la banda A podría corresponder a las enterocinas codificadas por los genes 615 y 616, y la banda B pudiera contener a la enterocina A, enterocina X cadena α y enterocina X cadena β.

Tabla 23. Peso Molecular calculado y reportado para diferentes bacteriocinas encontradas en el genoma de la cepa QD-2 de *E. faecium*

Gen bacteriocina	Peso Molecular calculado del péptido maduro (KDa)	Peso Molecular del péptido maduro reportado en la literatura (KDa)
615 Bacteriocina IIc	6.27	---
616 Bacteriocina clase II	5.28	---
621 Enterocina A	5.17	4.82
901 Enterocina X cadena α	4.40	4.42
902 Enterocina X cadena β	4.07	4.06

Fuente: Franz *et al.*, 2007

Es importante mencionar que de acuerdo a los resultados de Diana Romero (2022), quien realizó el modelamiento *in silico* de las secuencias proteínicas codificadas por los genes 615 y 616, ambas proteínas presentan una alfa hélice próxima al extremo carboxilo y exhiben un posible sitio de procesamiento de doble glicina, características de bacteriocinas de clase IIb. Por lo que llevó a cabo la clonación y expresión heteróloga del péptido codificado por el gen 616 en *E. coli*. La proteína recombinante tuvo actividad contra *L. monocytogenes* en zimograma y en pruebas de difusión en agar.

8. Conclusiones

Los resultados del análisis bioinformático y de transcripción realizados en este estudio sugieren que de los ocho ORFs con anotación para bacteriocinas putativas codificados en el genoma de la cepa QD-2 de *E. faecium*, cinco (615, 616, 621, 901 y 902) son los que presentan transcripción en las diferentes condiciones analizadas (caldo MRS con 0%, 3% y 5% NaCl)

De acuerdo al arreglo genómico, se sugiere que los ORFs 615 y 616 se encuentran organizados en un operón bicistrónico, al igual que los ORFs 901 y 902.

La presencia de NaCl en el medio de cultivo ocasiona una variación en la transcripción de los ORFs estudiados. La mayor expresión de los ORF 615, 616 y 621 se observó en la condición de 3% NaCl.

Los ORFs 615 y 616 presentan mayor expresión en comparación con el gen 621, independientemente de la concentración de NaCl.

Los ORFs 901 y 902 presentan menor expresión en comparación con el gen 621 en diferentes concentraciones de NaCl.

9. Referencias

Aarestrup, F., Hasman, H., Jensen, L. B., Moreno, M., Herrero, I., Domínguez, L., Franklin, A. (2002). Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three European countries. *Appl. Environ. Microbiol. 68*, 4127-4129.

Aguilera, P., Ruiz Tachiquín , M., Rocha Munive, M. G., Pineda Olvera, B., & Chánez Cádenas, M. (2014). *PCR en tiempo real. Herramientas moleculares aplicadas en ecología.* Obtenido de http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcrtiempo.pdf

Álvarez Cisneros, Y. (2011). Aspectos de seguridad de Enterococcus faecium MXVK29 y Enterococcus faecalis MXVK22 aislados de productos cárnicos y caracterización molecular de sus bacteriocinas. *Tesis de Doctorado. División de ciencias biológicas y de la salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, CDMX.*

Álvarez, R., Barrgan, E., & Chombo, P. (2005). Reglas de uso Marca Colectiva Queso Cotija Región de Origen. . *Asociación Regional de Productores de Queso Cotija*.

Amadi Fazli, N., & Hanifian, S. (2022). Biodiversity, antibiotic resistance and virulence traits of Enterococcus species in artisanal dairy products. *International Dairy Journal Vol.129*.

Anzolini Cassiano, M. H., & Silva-Rocha, R. (2020). Benchmarking available bacterial promoter prediction tools: potentialities and limitations. *mSystems*, 1-24.

Aristimuño Ficoseco, M. C. (2015). Reguaciónn génica del sistema lactocina Lac705. Aplicación enun sistema cárneo modelo. *Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina*.

Aunpad, R., & Panbangred, W. (2012). Evidence of two putative holin-like peptides enconding genes of Bacillus pumilus strain WAPB4. *Curr Microbiol 63*, 343-348.

Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L. S., Hugas, M., Garriga, M., & Nes, I. F. (1996). Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin A from Enterooccus faecium, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin Family of Bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 1676-1682.

Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L., Hugas, M., Garriga, M., & Nes, I. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from Enterococcus faecium, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiol. 62(5)*, 1676-1682.

Baumgarther, A., Kueffer, M., & Ronher, P. (2001). ccurrence and antibiotic resistance of enterococci in various ready-to-eat foods. *Arch. Lebensm hyg,52*, 1-24.

Bierbaum, G., & Sahl, H. (2009). Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol. 10 (1)*, 2-18.

Braïek, O., & Smaoui, S. (2019). Enterococci: Between emerging pathogens and potential probiotics. *BioMed Research International* , 1-13.

Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. . *Crit. Rev. Microbiol. 28*, 281-370.

Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L., Nes, I., Hernández , P., & Holo, H. (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from Enterococcus faecium T136 which can act synergistically with enterocin A. . *Microbiology 143 (7)*, 2287-2294.

Catalao, M. J., Gil, F., Moniz-Pereira, J., Sao, J. C., & Pimentel, M. (2013). Diversity in bacterial lysis systems: bacteriophages show the way. *FEMS Microbiology Reviews, 37*, 554-571.

Chen , H., & Hoover, D. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2*, 82-100.

Chikindas, M., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., & Dick, L. M. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr. Opin. Biotechnol. 49*, 23-28.

Cleveland, J., Montville, T. J., Ness, I. F., & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology 71*, 1-20.

Clewell, D. (1990). Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci Eur. *Journal clinical of Microbiology. Infect. Dis. 9*, 90-102.

Coelho, M. C., Malcata, F. X., & Silva, C. C. (2022). Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: From Started Cultures to Probiotic Functions. *Foods MDPI, 11(15)*.

Concha-Meyer, A., Schöbitz, R., Brito, C., & Fuentes, R. (2011). Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit Listeria monocytogenes growth on smoked salmon. *Food Control, 22*, 485-489.

Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacterial Lantibiotics: Strategies to improve therapeutic potential. *Curr. Protein Pept. Sci. 6*, 61-75.

de Freire Bastos, M., Varella Coelho, M., & da Silva Santos, O. (2015). Resistence to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology Vol. 161, Issue 4*.

Delgado, A., Arroyo López, F., Brito, D., Peres, C., Fevereiro , P., & Garrido Fernández, A. (2007). Optimum bacteriocin production by Lactobacillus plantarum 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. *Journal of Biotechnology, Vol 130, Issue 2*, 193-201.

Díaz Pérez, M., Rodríguez Martínez, C., & Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género Enterococcus como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, 48(2)*, 147-161.

Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L., & Prevost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70*, 564-582.

Dubois , J., Kouwen , T., Schurich , A., Reis, C., Ensing, H., Trip, E., . . . van Dijl, J. (2009). Inmunity to the bacteriocin sublancin 168 is determined by the SunI (YoIF) protein of Bacillus subtillis. *Antimicrob Agents Chemother 53 (2)*, 651-661.

Escamilla-Martínez, E., Álvarez Cisneros, Y., Fernández, F., Quirasco-Baruch, M., & Ponce-Alquicira, E. (2017). Identification of Structural and Inmunity Genes of a Class IIb Bacteriocin Encoded in the Enterocin A Operon of Enterococcus faecium Strain MXCK29. *Journal of Food Protection*, 1851-1856.

Fernández Villa, K. J., Chanci Echeverri, I. C., Wilches López, L., & Cardona Arias, J. A. (2014). Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido lácticas y efecto inhibidor de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: revisión sistemática de la literatura, 2008-2012. *Rev. Biosalud, 13*, 45-61.

Fimland, G., Vincent, G., Eijsink, & Nissen-Meyer, J. (2002). Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiology 148*, 3661-3670.

Foulquié-Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology. 106*, 1-24.

Franz, C. A., Muscholl-Silberhorn, A. B., Yousif,, N., Vancanneyt, M., Swimgs, J., & Holzapfel, W. (2001). ncidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology, 67*, 4385-4389.

Franz, C. A., Schillinger, U., & Holzapfel,, W. (1996). Production and characterisation of enterocin 900, a bacteriocin produced by Enterococcus faeciumBFE 900 from black olives. *Interrnational Journal of Food Microbiology, 29*, 255-270.

Franz, C. A., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., & Holzapfel, W. H. (2003). Enterococci in foods aconundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology. 88*, 105-122.

Franz, C., van Belkum, M., Holzapfel, W., Abriouel, H., & Gálvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in new classification scheme. . *FEMS Microbiol Rev 31*, 293 - 310.

Franz, C., Worobo, R., Quadri, L., Schillinger, U., Holzapfel, W., Vederas, J., & Stiles, M. (1999). Atypical genetic Locus associated with constitutive production of Enterocin B by Enterococcus faecium BFE 900. *Applied and Environmental Microbiology* .

Freitas, A., Tedim, A., Novais, C., Ruiz-Garbajosa, P., Werner, G., Leverde-Gómez, J., . . . Coque, T. (2010). Global spread of the hylEfm colonization-virulence gene in megaplasmids of the Enterococcus faeciumCC17 polyclonal subcluster. *Antimicrob Agents Chemother 54*, 26660-2665.

Furlaneto Maia, L., Cristina Costa, L., Real Rocha, K., Terra, M., Schueller, J., Favaro Tosoni, N., & Furlaneto Cristina, M. (2019). Influence of optimised commercial medium on bacteriocin production by Enterococcus faecium. *Acta Scientiarum. Technology, v. 41 e42324*, 1-9.

García Saturnino, V. (2006). Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolítica del queso Cotija . *Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM*.

Garcia Saturnino, V. (2011). Detección de microoganismos lipolítiocs durante las etapas de elaboración de un queso artesanal, mediante técnicas molesuclares. *Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas. UNAM*.

Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Cogan, T. M., Condon, S., & Swings, J. (2002). Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. *Applied Environmental Microbiology. 68*, 3560-3565.

Giraffa, G. (1995). Enterococcal bacteriocins: tehir potential use as antiListeria factors in dairy technology. *Food Microbiology*, 551-556.

Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology 88*, 215-222.

Günter, K. (2003). axonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology, 88*, 123-131.

Guzmán , A. (2015). Estudio genético poblacional de cepas de Enterococcus faecium aisladas del queso Cotija artesanal madurado. Tesis de licenciatura. Facultad de química UNAM, Ciudad Universitaria CDMX.

Guzmán- López, O., Ricaño-Rodríguez, C., Luis-Yong, D., & Ricaño-Rodríguez , J. (2023). NCBI: Generalidades del repositorio y breve descripción de recursos aplicables al estudio de la fitogenética. *Rev. Fitotec. Mex. Vol. 4(1)*, 63-76.

Haugen, S. P., Ross, W., & Gourse, R. L. (2008). Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nature Reviews Microbiology*, 1-13.

Heredia Castro, P., Hernández Mendoza, A., González Córdiva, A., & Vallejo-Córdoba, B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos de quesos. . *Interciencia, vol. 42, núm. 6*, 340-346.

Hernández Briones , V. (2010). Composición nutrimental de queso Cotija Región de Origen en función de condiciones de producción y maduración . *Tesis de Maestría. Ciencias Químicas. UNAM*.

Hikmate , A., Nabil Ben, O., Lucas López, R., & Gálvez, A. (2008). La doble faceta del género enterococcus, y su importancia en alimentos. *Anales Vol. 21(1)*, 65-83.

Hilal, T., Muhammad, T., & Kil To, C. (2020). Identification of prokaryotic promoters and their strength by integrating heterogeneous features. *Genomics 112*, 1396-1403.

Hu, C.-B., Malaphan, W., Zendo, T., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2010). Enterocin X, a Novel Two-Peptide Bacteriocin from Enterococcus faecium KU-B5, Has an Antibacterial Spectrum Entirely Different from those of Its Component Peptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 4542-4545.

J van Heel, A., de Jong, A., Song, C., H Viel, J., Kok, J., & Kuipers, O. (2018). Bagel4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Research, Vol. 46 (W1)*, W278-W281.

Jie , L., Huang, Q., Zheng, X., Ge, Z., Lin, K., Zhang, D., . . . Shi, X. (2020). Investigation of the Lactic Acid Bacteria in Kazak Cheese and Their Contributions to Cheese Fermenentation. *Front. Microbiol.* .

Kayser, F. H. (2003). Safety aspects of Enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiology, 88*, 255-262.

kumar Verma, D., Thakur, M., Singh, S., Tripathy, S., Kumar Gupta, A., Baranwal, D., . . . Prakash Srivastav, P. (2022). Bacteriocins as antimicrobial and preservative agents in food: Biosynthesis, separation and application. *Food Bioscience, Vol 46*.

Labra, M. G. (2012). Factores de riesgo para adquirir infección por Enterococcus faecium resistente a vancomicina en pacientes pediátricos del hospital infantil de México Federico Gómez. Tesis de posgrado. Facultad de medicina, división de estudios de posgrado, UNAM.

Laukova, A., & Czikkova , S. (2001). Antagonistic effect of enterocin CCM 4231 from Enterococcus faeciumon —bryndza‖, a traditional Slovak dairy product from sheep milk. *Microbiology Research 156*, 31-34.

Leal-Sánchez, M., Jiménez-Díaz, R., Maldonado-Barragán, A., Garrido-Fernández, A., & Ruíz-Barba, J. (2002). Optimization of Bacteriocin Production by Batch Fermentation of Lactobacillus plantarum LPCO10. *Applied and Environmental Microbiology, Vol. 68, No. 9*, 4465 - 4471.

Leroy, F., & de Vuyst, L. (1999). The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by Lactobacillus sakei CTC 494, a potential starter culture for sausage fermentation. *Applied and Environmental Microbiology Vol. 65 No. 12.*, 5350-5356.

Leroy, F., Vankrunkelsven, S., De Greef, J., & De Vuyst, L. (2003). The stimulating effect of a harsh environment on the bacteriocin activity by Enterococcus faecium RZS C5 and dependency on the environmental stress factor used. *International Journal of Food Microbiology Vol. 38, Issue 1*, 27-38.

Lewin, B. (2008). Capítulo 11. Transcripción. En B. Lewin, *Genes IX* (págs. 256-295). México: Mc Graw Hill.

Liu, G., Wang, Y., Li, X., Hao, X., Xu, D., Zhou, Y., . . . Wang, C. (2019). Genetic and Biochemical evidence that Enterococcus faecalis Gr17 produces a novel and sec-dependent bacteriocin, enterocin Gr17. *Frontiers in Microbiology, 10*, 1-12.

López M., J. E., Ochoa Z., A., Santoyo P., G., Anaya L., J., Medina M. , E., Martínez T., M., & Loeza L., P. D. (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, Vol. 39, No. 3*, 49-57.

Maisnier-Patin, S., Formi, E., & Richard, J. (1996). Purification, partial characterization and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of Enterococcus faecalisisolated from a cheese. . *International Journal of Food Microbiology 30*, 255-270.

Mandragón Preciado, G., Escalante Minakata, P., Osuna Castro , J. A., Ibarra Junquera, V., Morlett Chávez, J. A., Aguilar González, C., & Rodríguez Herrera, R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes No. 59*, 64-70.

McAuliffe, O., Ross, R., & Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. . *FEMS Microbiol. Rev. 25*, 285-308.

Mendoza Eslava, C. (2019). Evaluación de marcadores genéticos para la diferenciación de cepa de Enterococcus de origen alimentario. *Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM*.

Mitchell, J. E., Zheng, D., Busby, S. W., & Minchin , S. D. (2003). Identification and analysis of "extended -10" promoters in Escherichia coli. *Nucleic Acid Research Vol 31, No. 16*, 4689-4695.

Monroy, C., & Fernández , F. (2009). Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Contactos. 73*, 63-72.

Morrison, D., Woodford, N., & Cookson, B. (1997). Enterococci aas emerging pathogens of humans. *Journal of Applied Microbiology. Suppl. 83*, 89-99.

Mozzi, F. (2016). Lactic Acid Bacteria. *Encyclopedia of Food and Health*, 501- 508.

Murray , B. E. (1990). The life and the times of the Enterococcus. *Clinical Microbiology Reviews. 3*, 46-65.

National Human Genome Research Institute . (Septiembre de 2023). Obtenido de https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Bioinformatica#:~:text=La%20bioinform%C3%A1tica%2C%20en%20relaci%C3%B3n%20con,o%20anotaciones%20sobre%20esas%20secuencias.

Nes, I., Diep, D. B., & Holo, H. (2007). Bacteriocin diversity in Streptococcus and Enterococcus. *Journal of Bacteriology* , 1189-1198.

Ness, I., Brede, D., & Diep, D. (2013). Clase II non-lantibiotic bacteriocins. . *Handbook of biologically active peptides. Elsevier Inc.*, 85-92.

Nilsen, T., Nes, I., & Holo , H. (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from Enterococcus faecalis LMG 2333. *Appl Environ Microbiol. 69(5)*, 2975-2984.

Nissen-Meyer, J., Oppegard, C., Rogne, P., Haugen, H., & Kristiansen, P. (2010). Structure and mode of action of the two peptide (Class IIb) bacteriocins. . *Probiotics Antimicrob. Proteins 2*, 52-60.

Noordiana, N., Fatimah, A. B., & Mun, A. S. (2013). Antibacterial agents produced by lactic acid bacteria isolated from Threadfin Salmon and Grass Shrimp . *Food Res. J. 20*, 117-124.

O´Keeffe, T., Hill, C., & Ross, P. (1999). Characterization and heterologous expression of the genes enconding enterocin A production, inmunity and regulation in Enterococcus faecium DPC1146. *Applie and Environmental Microbiolgy 65(4)*, 1506-1515.

Ogier Jean, C., & Serror , P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The Enterococcusgenus. *International journal of Food Microbiology, 126*, 291-301.

Olvera García, M. (2013). Evaluación de la inocuidad de Enterococcus sp.aislados del queso Cotija. Tesis de Maestría. Posgrado de ciencias bioquímicas UNAM, CDMX.

Olvera García, M. (2018). Caracterización genómica, poblacional y funcional de Enterococcus aislados de un alimento artesanal. Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Bioquímicas UNAM.

Olvera García, M. (2018). Caracterización genómica, poblacional yfuncional de Enterococcusaislados de un alimento artesanal. *Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Bioquímicas. UNAM*.

Olvera García, M. (2018). Caracterización genómica, poblacional yfuncional de Enterococcusaislados de un alimento artesanal. Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Bioquímicas UNAM, CDMX.

Olvera García, M. (2018). Caracterización genómica, poblacional yfuncional de Enterococcusaislados de un alimento artesanal. Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Bioquímicas UNAM, CDMX.

Olvera-García, M., Serrano-Maldonado, C., & Quirasco, M. (2015). Detección de proteínas con actividad antibacteriana producidas por bacterias ácido lácticas. *BioTecnología, 19*, 25-43.

Ortega González, L. M. (2010). Enterococos: actualización. *Revista Habanera de Ciencias Médicas v.9 (4)*, 507-515.

Palmer, K., van Schaik, W., & Willems, R. (2014). Enterococcal Genomics. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. . *Gilmore M. Eye and Ear Infirmary, Boston, USA*, 1-37.

Peterbauer, C., Maischberger, T., & Haltrich, D. (2011). Food-grade gene expression in lactic acid bacteria. *Biotechnology 6*, 1147-1161.

Punia Bangar, S., Chaudhary, V., P. Singh, T., & Özogul, F. (2022). Retrospecting the concept and industrial significance of LAB bacteriocins. *Food Bioscience, Vol 46*.

Ramírez, J. C., Ulloa, P., Velázquez, M., Ulloa, J., & Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Rev. Fuente año 2. 7*, 1-16.

Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2010). Lactic acid bacteria:their antimicrobial compounds and their uses in foodproduction. *Ann. Biol. Res. 4*, 218-228.

Rehaiem, A., Martínez, B., Manai, M., & Rodríguez. (2010). Production of enterocin A by ENterococcus faecium MMRA isolated from "Rayeb", a traditional Tunisian dairy beverage. *Journal of Applied Microbiology, 108*, 1685-1693.

Rodicio, M., & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin, Vol 22, No. 4*, 238-245.

Romero Sánchez, D. I. (2022). Análisis de bacteriocinas producidas por Enterococcus faeciumde origen alimentario. *Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM*, 48 - 81.

Salminen, S., Von Wright , A., & Ouwehand, A. (2012). Lactic Acid Bacteria (BAL). *Microbiological and Functional Aspects 3*, 375-398.

Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., & Tsakalidou, E. (2002). Effect of Enterococcus faeciumon microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Fata chesee. *International Journal of Food Microbiology 76*, 93-105.

Scheila de Avila e Silva, & Echeverrigaray, S. (2012). Bacterial Promoter Features Description and Their Application on E. coli in silico Prediction and Recognition Approaches. *Bioinformatics, chapter 10*, 241-260.

Scientific, T. (Julio de 2016). *Espectrofotómetros micro-UV/Vis NanoDrop. Guía del usuario.* Obtenido de https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/3091-NanoDrop-One-User-Guide-v1.3-sw-SPANISH.pdf

Snyder, A., & Worobo, R. (2014). Chemical and gennetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *Journal of the Science Food and Agriculture, 94(1)*, 28-44.

Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P., Rebuffat, S., Ben Said, L., Gaudreau, H., Fliss, I. (2021). Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations. *FEMS Microbiology Reviews, Vol. 45, Issue 1*, 1-24.

Sushida, H., Ishibashi, N., Zendo, T., Wilaipun, P., Leelawatcharamas, V., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2018). Evaluation of leader peptides that affect the secretory ablity of a multiple bacteriocin transporter, EnkT. *Journal or Bioscience and Bioengineering, 126(1)*, 23-23.

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo , C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real . *Investigación en Discapacidad, Vol. 2, No. 2.*, 70-78.

Top, J., Willems, R., & Bonten, M. (2008). Emergence of CC17 Enterococcus faecium: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol, 52*, 297-308.

Treven, P., Turkova, K., Trmemié, A., Obermajer, T., Rogelj, I., & Matijasic, B. (2012). Detection and quantification of probiotic strain Lactobacillus gasseri K7 in faecal samples impact on food safety. *Internatinal Journal of Food Enfineerng 10(2)*, 203-221.

Tyne , D. V., Martin, M., & S. Gilmore, M. (2013). Structure, Function, and Biology of the Enterococcus faecalis Cytolysin. *Toxins, 5*, 895-911.

UniProt. (27 de Noviembre de 2022). Obtenido de https://www.uniprot.org/help/about

Urrieta, J. (2018). Análisis multilocus de Enterococcus faecium aislados del queso de Ocosingo. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM*.

Vallejo, M., Ledesma, P., & Marguet, E. R. (2013). Caracterización parcial de enterocinas producidas por una cepa de Enterococcus faecium aislada de leche ovina. *Rev. Soc. Ven. Microbiol. vol 33, no. 1*, http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562013000100007.

Vallejo, M., Ledesma, P., Anselmino, L., & Marguet, E. (2014). Efecto de las condiciones de crecimiento y composición del medio de cultivo sobre la producción de bacteriocina de Enterococcus mundtii Tw56. *Revista Colombiana de Biotecnología, Vol. 16, No. 2*.

Vallejo, M., Ledesma, P., Anselmino, L., & Marguet, E. (2014). Efecto de las condiciones de crecimiento y composición del medio de cultivo sobre la producción de bacteriocina de Enterococcus mundtii Tw56. *Revista Colombiana de Biotecnología Vol. 16 No. 2*.

Vásquez, S., Suárez, H., & Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobinas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Rev. Chil. Nutr. 36*, 64-71.

Wang, W., & Wang, H. (2014). The effect of Lactic Acid Bacteria in food and feed and their impact on food safety. *International Journal of Food Engineering 10(2)*, 203-210.

Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Front. Bioeng. Biotechnol.*

Willems, R., Top, J., van Schaik, W., Leavis , H., Bonten, M., Sire´n , J., Corander, J. (2012). Restricted gene flow among hospital subpopulations of Enterococcus faecium. *MBio 3*, e00151-e00212.

Wu, Y., Pang, X., Wu, Y., Liu, X., & Zhang Xinglin. (2022). Enterocins: Classification, Synthesis, Antibacterial Mechanisms and Food Applications. *Molecules 27(7): 2258*.

Yang, E., Lihua Fan, Jinping, Y., Yueming, J., Craig, D., Sherry, F., & Bradley, W. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express, 8:10*, 1-14.

Zarzecka, U., Zadernowska , A., & Chajecka-Wierzchowska, W. (2022). Effectos of osmotic and high pressure stress on expression of virulence factors among Enterococcus spp. isolated from food of animal origin. *Food Microbiology Vol 102*.

Zarzecka, U., Zadernowska , A., & Chajecka-Wierzchowska, W. (2022). Effects of osmotic and high pressure stress on expression of virulence factors among Enterococcus spp. isolated from food of animal origin. *Food Microbiology, Volume 102*, 1-9.

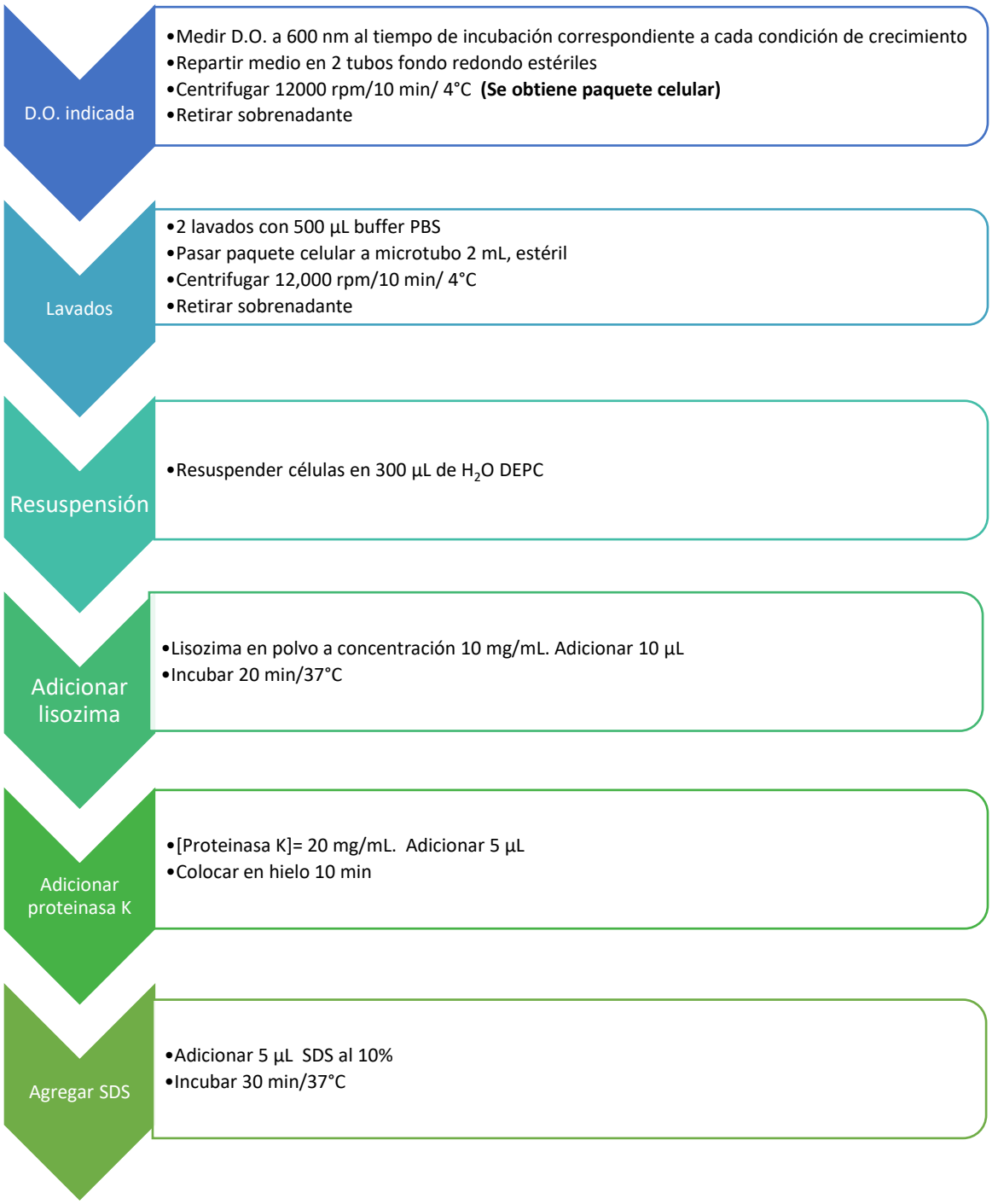
Zhang, T., Zhang, Y., Li, L., Jiang, X., Chen, Z., Zhao, F., & Yi, Y. (2022). Biosynthesis and Production of Class II Bacteriocins of Food-Associated Lactic Acid Bacteria. *Fermentation, Vol 8,Issue 5*, 1-32.

10. ANEXOS

10.1 Lineamientos para el diseño de cebadores

1. La diferencia entre las Tm de los cebadores debe ser inferior a 5°C
2. El contenido de CG debe estar ente 35-80%
3. Evitar complementariedad en el extremo 3´entre los dos cebadores para disminuir formación de dímeros.
4. El ΔG para estructuras de autodímero, horquilla y heterodímero debe ser débil, más positivo a -9.0 kcal/mol. Los números positivos indican que la estructura secundaria que se muestra no se formará en absoluto.
5. Para impedir la formación de estructuras de horquilla, lo más importante es la Tm de cada posible estructura que se pudiera formar. Si la Tm de cada estructura es más baja que las condiciones de reacción entonces no habrá formación de la estructura secundaria.

10.2 Metodología para realizar lisis celular por medio de enzimas



10.3 Metodología para extracción total de RNA por método de TRIzol

Dividir suspensión en 2 fracciones

- Cada fracción colocarla en tubo de 2 mL nuevo, estéril.

Adicionar trizol

- Adicionar 1 mL TRIzol, mezclar subiendo y bajando varias veces con pipeta
- **NOTA:** EL TRIzol siempre debe estar envuelto con aluminio y en refrigeración
- Incubar 10 min/30°C

Adición cloroformo

- Adicionar 200 µL de cloroformo, agitar con vortex (no intenso)
- **NOTA: Adicionar cloroformo en campana de extracción de gases y pipetear varias veces antes de volumen final.**
- Incubar 3 min/30°C
- Centrigufar a 14,000 rpm/15 min/ 4°C

Separación fases

- Tomar fase acuosa (superior) y transferirla a tubo estéril de 1.5 mL

Adición isopropanol

- Adicionar 500 µL de isopropanol, agitar por inversión.
- Incubar 15 min a T° ambiente
- Centrifugar a 14,000 rpm/10 min/4°C
- Retirar sobrenadante

Adición etanol

- Adicionar 1 mL etanol al 75%, agitar por inversión.
- Conservar a -20°C toda la noche
- Centrifugar a 14,000 rpm/5 min/4°C
- Elininar sobrenadante y dejar vial abierto boca abajo para eliminar etanol

Resuspensión

- Resuspender pastilla en 20 µL de H_2O DEPC
- Almacenar a -70°C

10.4 Metodología para electroforesis en gel de agarosa 1%-formaldehído 18%

Preparación cámara

- Limpiar cámara y peine con H_2O_2 al 3% antes de usar. Dejar actúar durante 15 min y enjuagar con H_2O DEPC
  NOTA: preparar el H_2O_2 con H_2O DEPC

Preparación gel

- Para 100 mL agarosa 1%:
- 1 g agarosa + 72 mL H_2O DEPC
- Se calienta en microondas hasta obtener una apariencia homogénea transparente.
  NOTA: preparar en frasco de vidrio estéril

Preparación gel en campana extracción de gases

- Dejar enfriar a temperatura ambiente, cuando la agarosa se encuentre aproximadamente a 60°C, agregar en campana extracción de gases:
- 10 mL buffer MOPS 10X + 18 mL formaldehído 37%
- Medir 30 mL de agarosa fundida en tubo eppendorf de 50 mL estéril y vaciar en molde para geles con el peine colocado para la formación de los pozos, dejar enfriar en campana hasta que solidifique y tapar con aluminio.

Preparación de la cámara

- Una vez solidificado el gel, colocarlo en la cámara de electroforesis y llenar esta última con buffer MOPS 1X, de manera que el gel quede cubierto.

Preparación de muestra

- La muestra debe contener de 1-5 µg de ARN
- 2 µL buffer de carga
- Correr el gel a 5 V/cm a 4°C (Durante 3 horas: 30 V durante las 2 primeras horas y la última hora subir voltaje a 50 V)
- Teñir con Bromuro de etidio a concentración ____ durante 15 minutos

10.5 Cuantificación de ARN extraído de la cepa QD-2 de *E. faecium*. Incubada en medio MRS, a 0%, 3% y 5% NaCl a 37°C

Muestra	Concentración de ARN (ng/µL), extracción 0% NaCl	A260/280	A260/A230
1	527.55	1.37	0.45
1 A	864.15	1.43	0.38
1.1	**448.25**	**1.62**	**0.45**
1.1 A	575.65	1.34	0.36
2	1676.15	1.98	1.61
2 A	2790.7	1.99	1.67
2.1	1891.55	1.99	1.73
2.1 A	**2730.05**	**1.99**	**1.94**
3	1198.4	1.93	1.26
3 A	1755.95	1.98	1.67
3.1	**1328.2**	**1.97**	**1.80**
3.1 A	1866.1	1.98	1.36

Nota: Las muestras marcadas en negritas fueron empleadas para realizar la reacción RT-qPCR

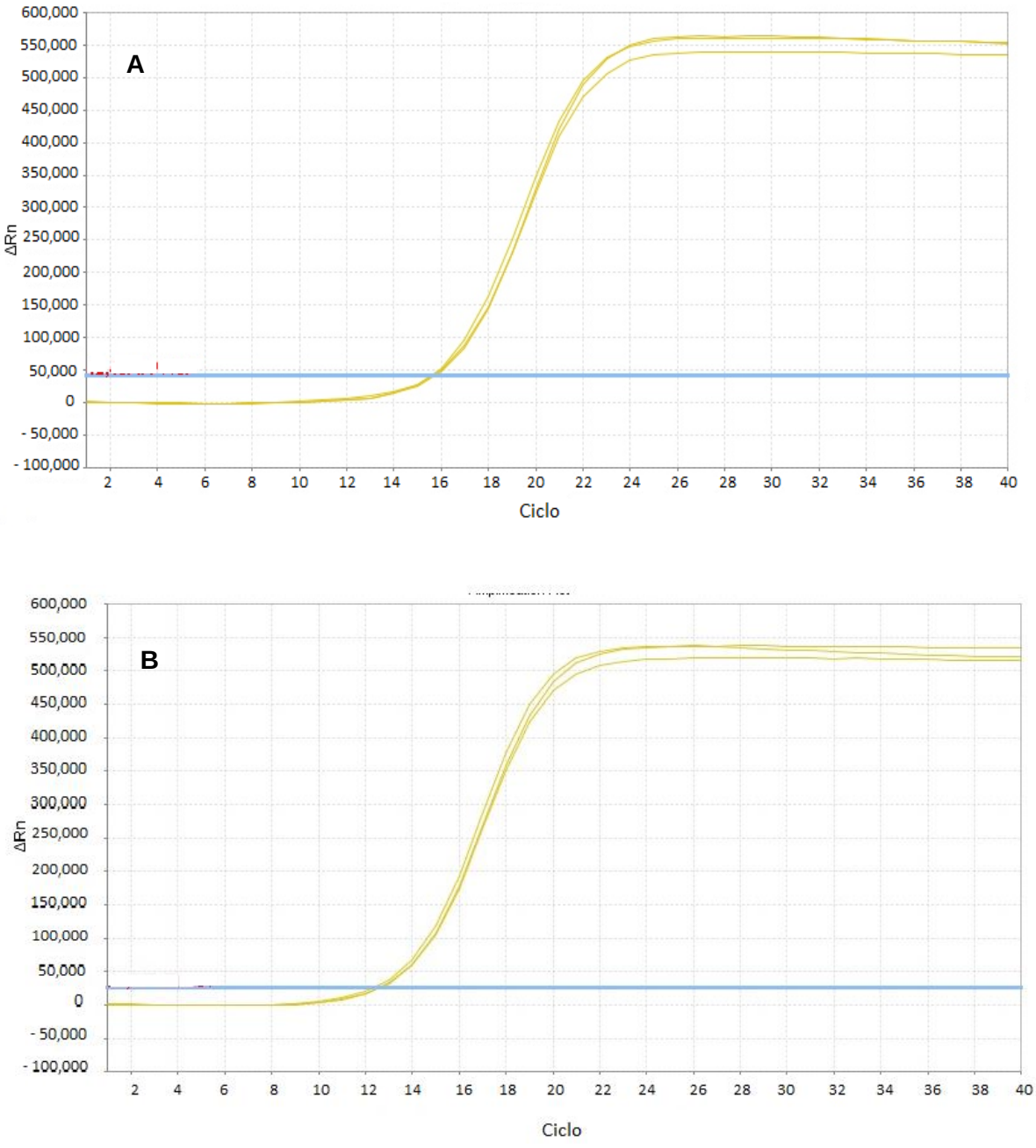
Muestra	Concentración de ARN (ng/µL), extracción 3% NaCl	A260/280	A260/A230
1	**3465.6**	**2.0**	**1.67**
1 A	2864.7	1.97	1.74
1.1	3274.35	1.98	1.61
1.1 A	3082.2	1.93	1.49
2	**2400.05**	**2.01**	**1.71**
2 A	1952.75	1.95	1.31
2.1	2866.0	1.97	1.52
2.1 A	2133.0	1.98	1.47
3	**3080.0**	**1.99**	**1.85**
3 A	2613.05	1.97	1.77
3.1	2559.8	1.95	1.57
3.1 A	2528.65	1.96	1.44

Nota: Las muestras marcadas en negritas fueron empleadas para realizar la reacción RT-qPCR

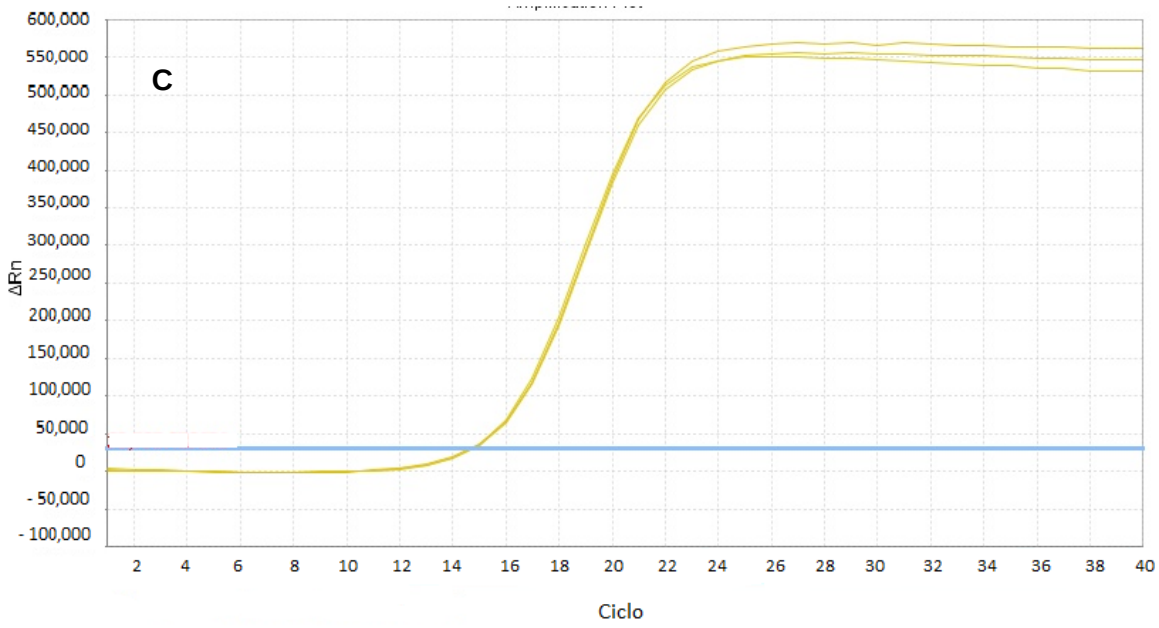
Muestra	Concentración de ARN (ng/µL), extracción 5% NaCl	A260/280	A260/A230
1	1600.4	1.97	1.67
1 A	1483.0	1.92	1.46
1.1	**1497.9**	**1.96**	**1.77**
1.1 A	1676.2	1.95	1.63
2	**1405.8**	**1.94**	**1.44**
2 A	1343.75	1.94	1.43
2.1	1040.0	1.80	0.89
2.1 A	1465.95	1.92	1.31
3	**1039.3**	**1.95**	**1.62**
3 A	859.9	1.82	0.89
3.1	1146.55	1.95	1.56
3.1 A	1051.1	1.90	1.25

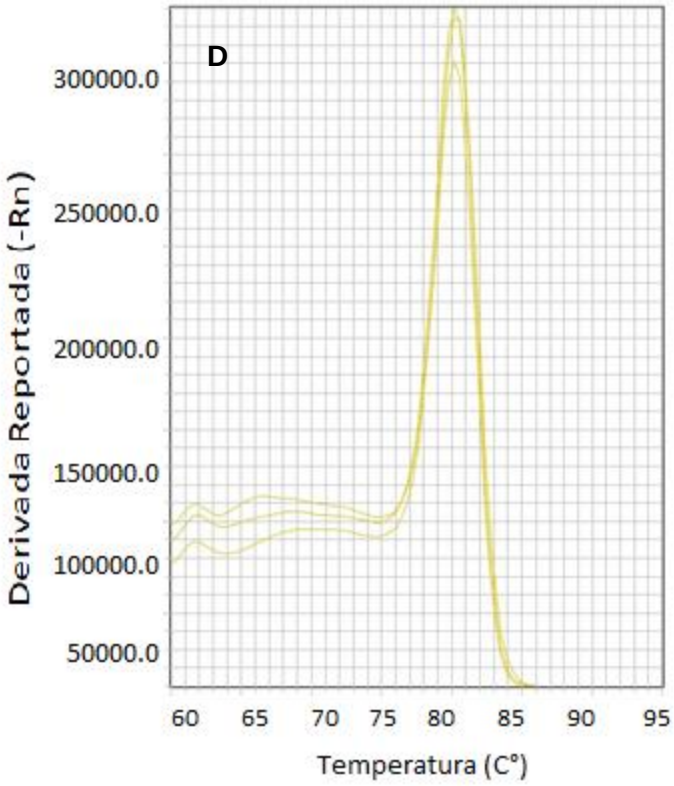
Nota: Las muestras marcadas en negritas fueron empleadas para realizar la reacción RT-qPCR

10.6 Curvas de amplificación y disociación del gen *rpoA* en diferentes concentraciones de NaCl



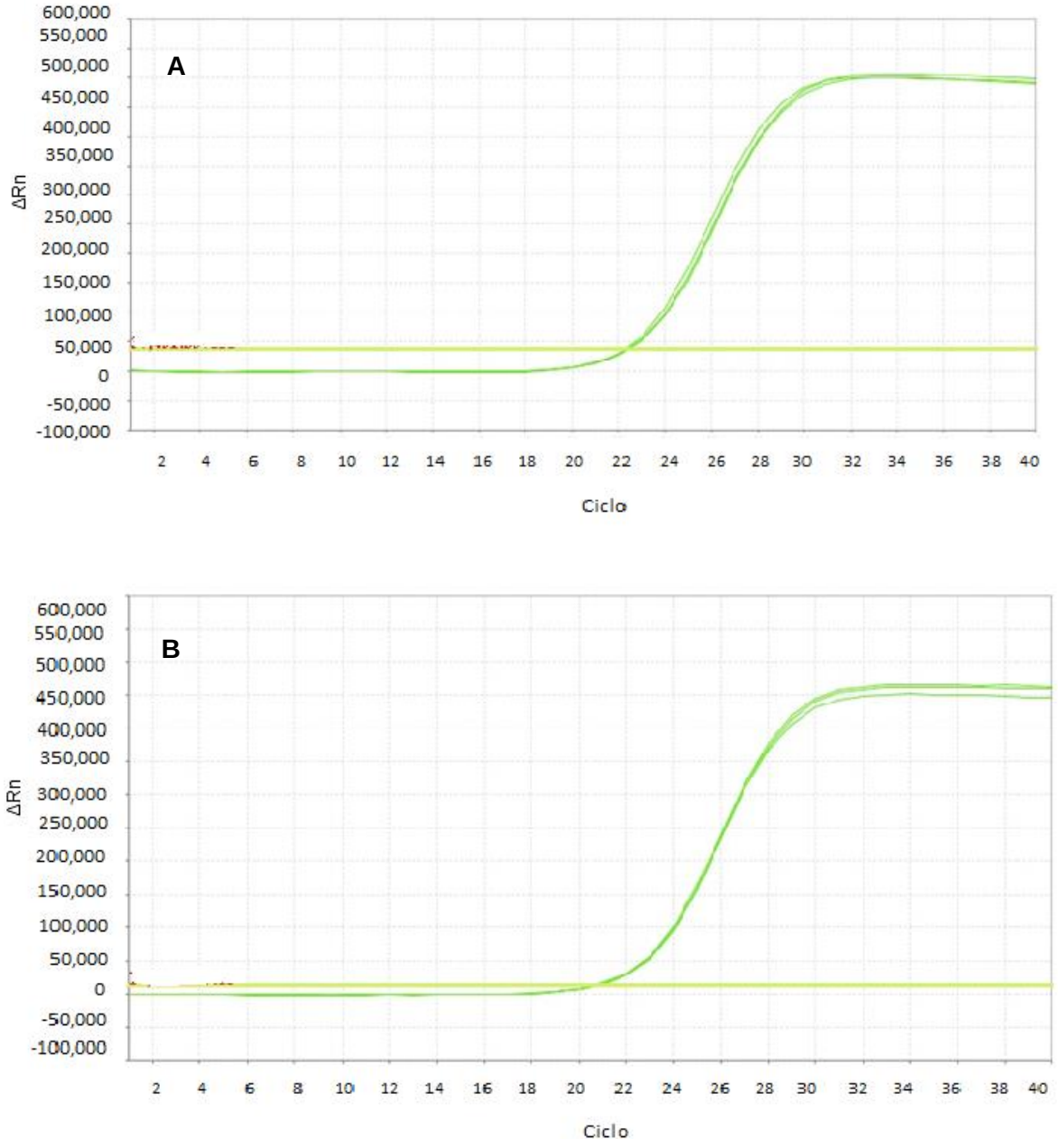
A) Curva de amplificación para la condición de 0% NaCl. **B)** Curva de amplificación para la condición de 3% NaCl



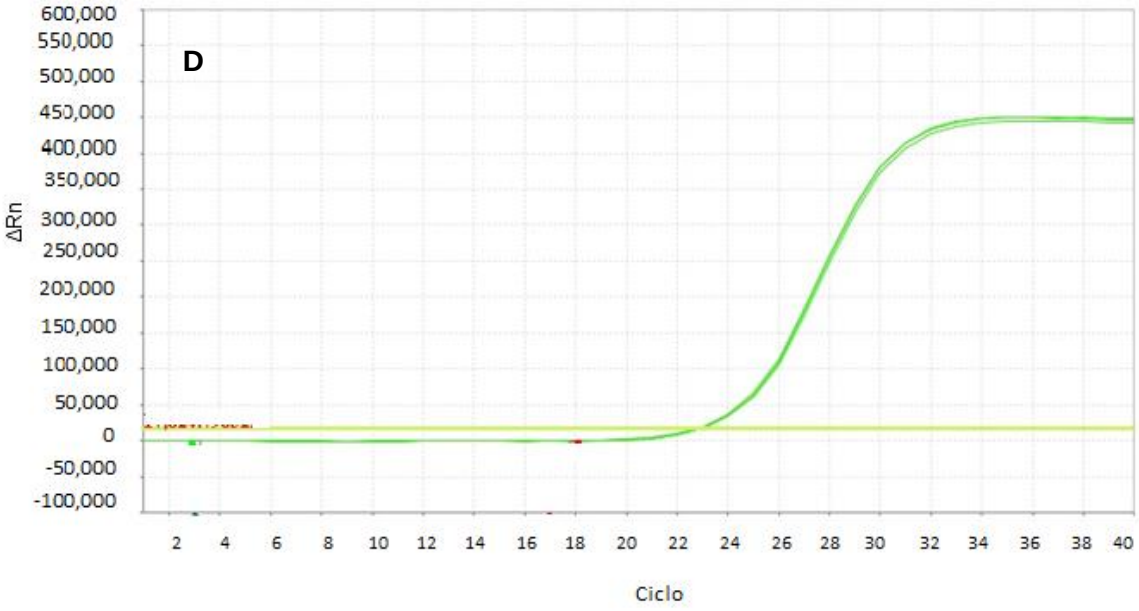


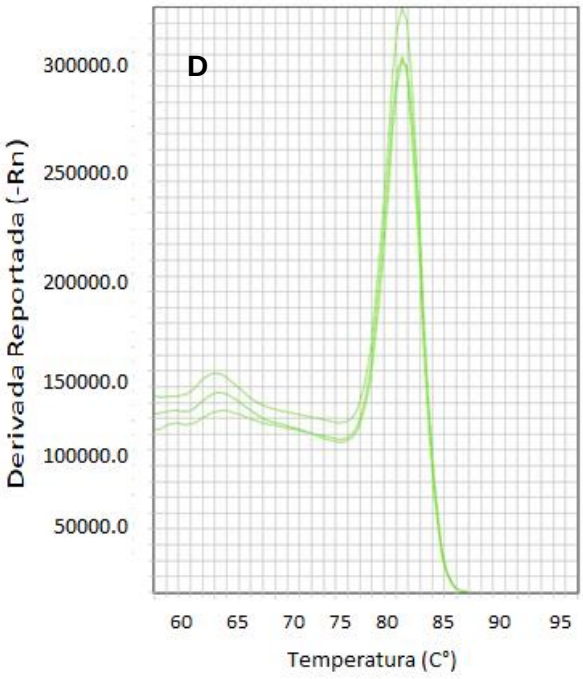
C) Curva de amplificación para la condición de 5% NaCl. **D)** Curva de disociación para la condición de 0%

10.7 Curvas de amplificación y de disociación para el ORF 621, Enterocina A, en diferentes concentraciones de NaCl



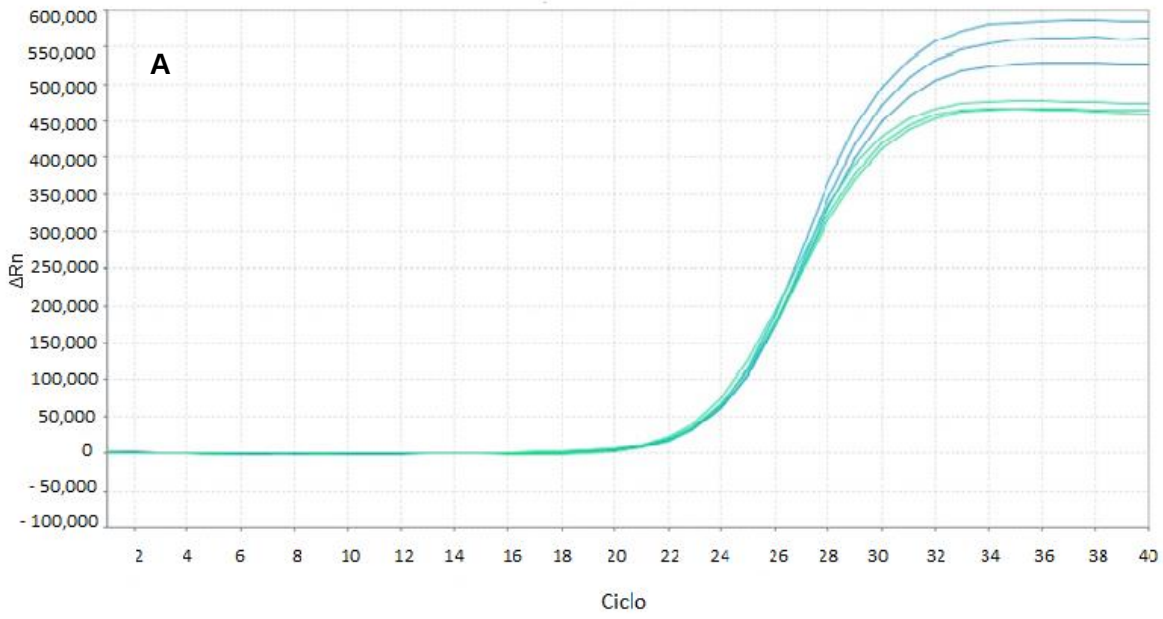
A) Curva de amplificación para la condición de 0% NaCl. **B)** Curva de amplificación para la condición de 3% NaCl

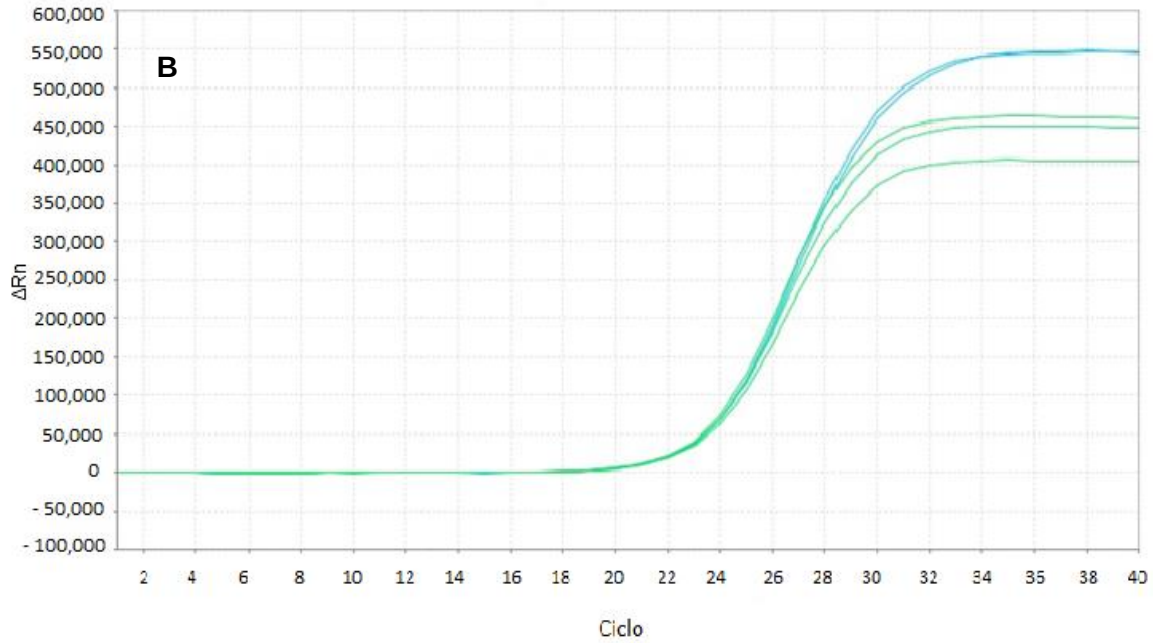




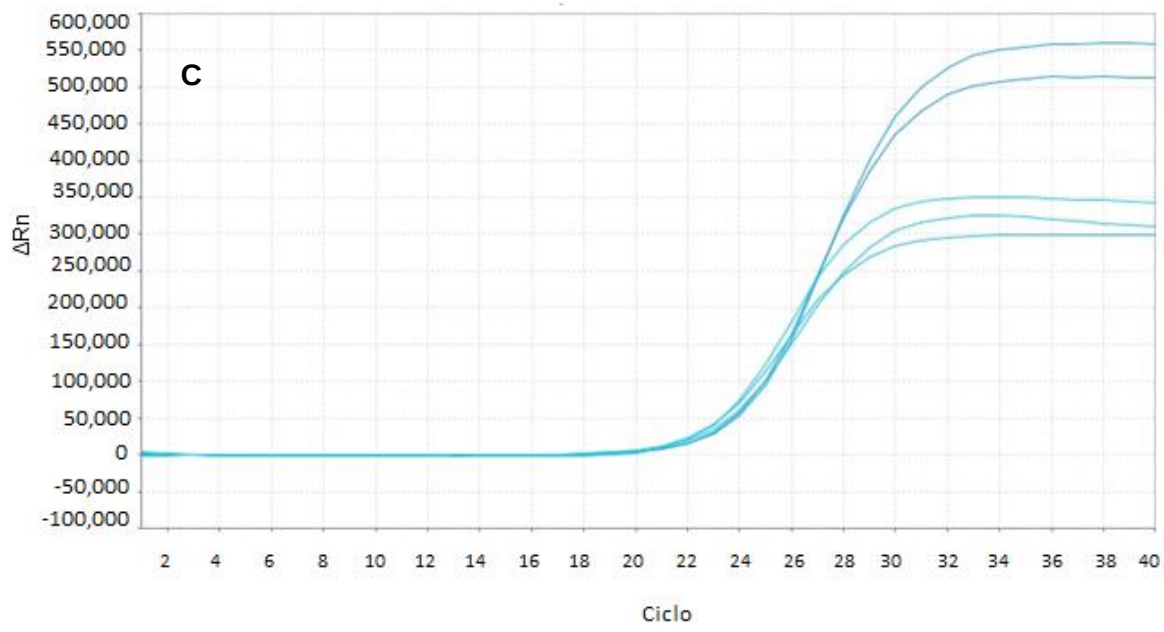
C) Curva de amplificación para la condición de 5% NaCl. **D)** Curva de disociación para la condición de 0%

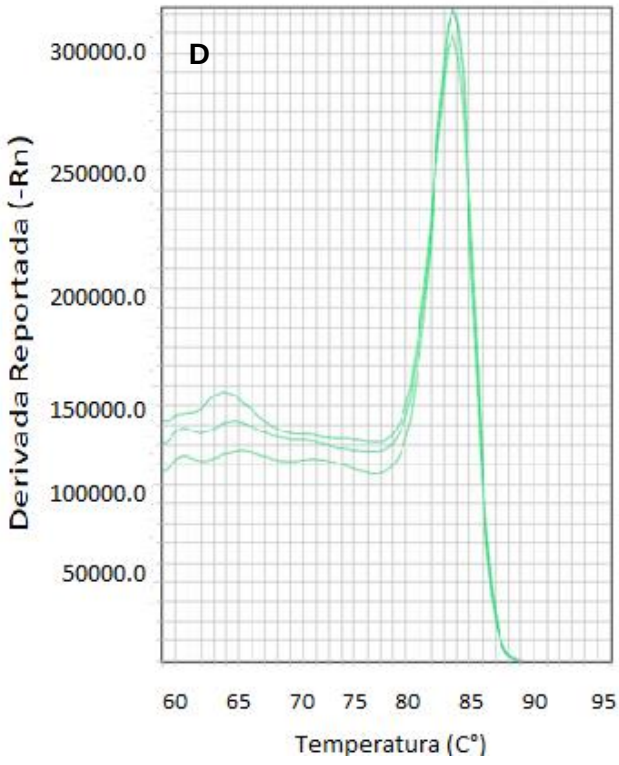
10.8 Curvas de amplificación y de disociación para los ORFs 615 y 616, Enterocinas no caracterizadas, en diferentes concentraciones de NaCl

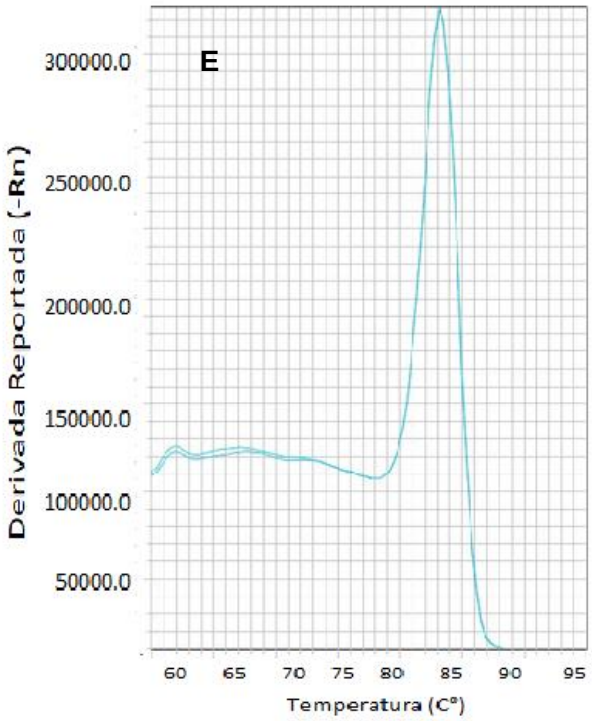




A) Curva de amplificación para la condición de 0% NaCl. **B)** Curva de amplificación para la condición de 3% NaCl

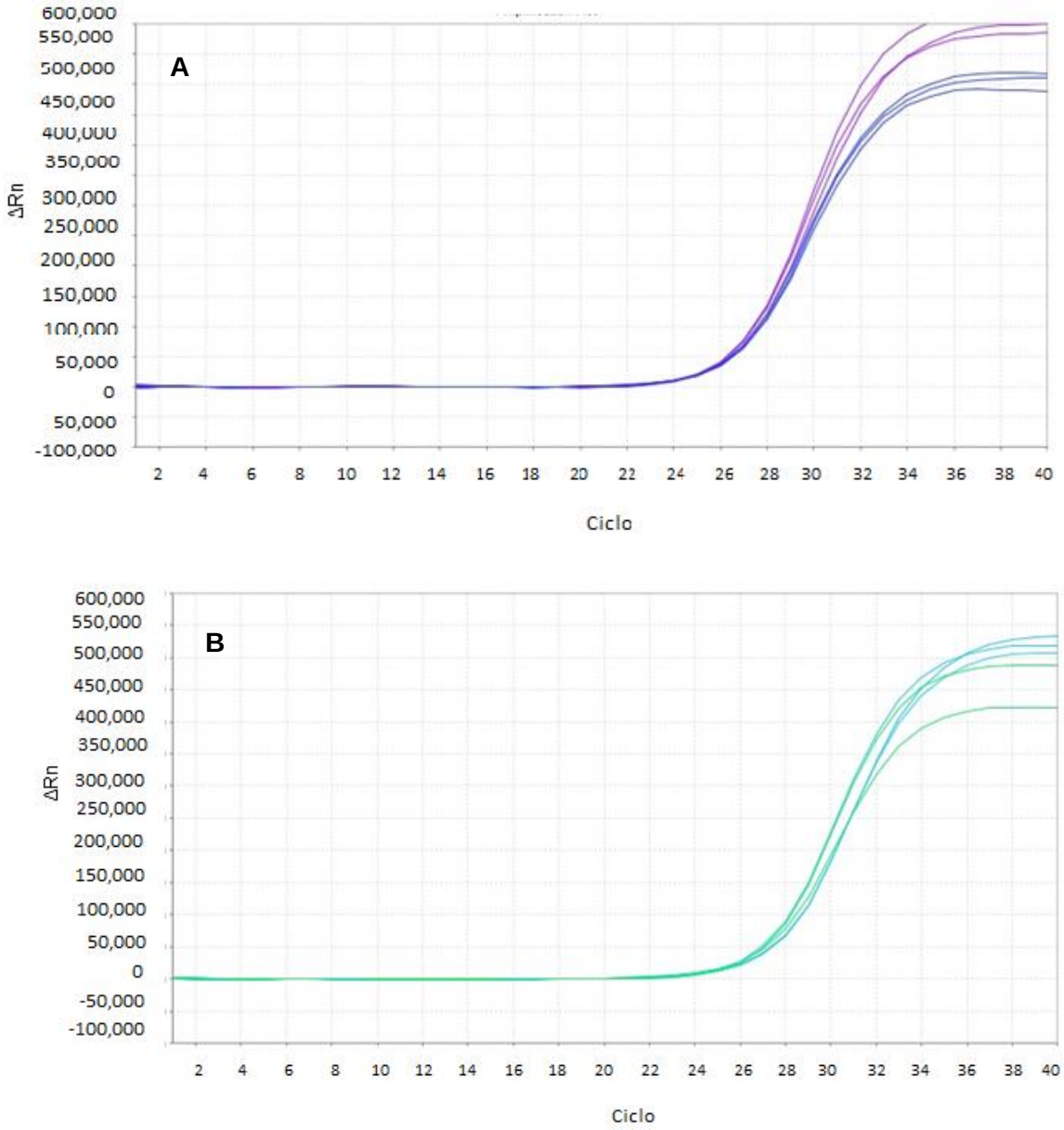




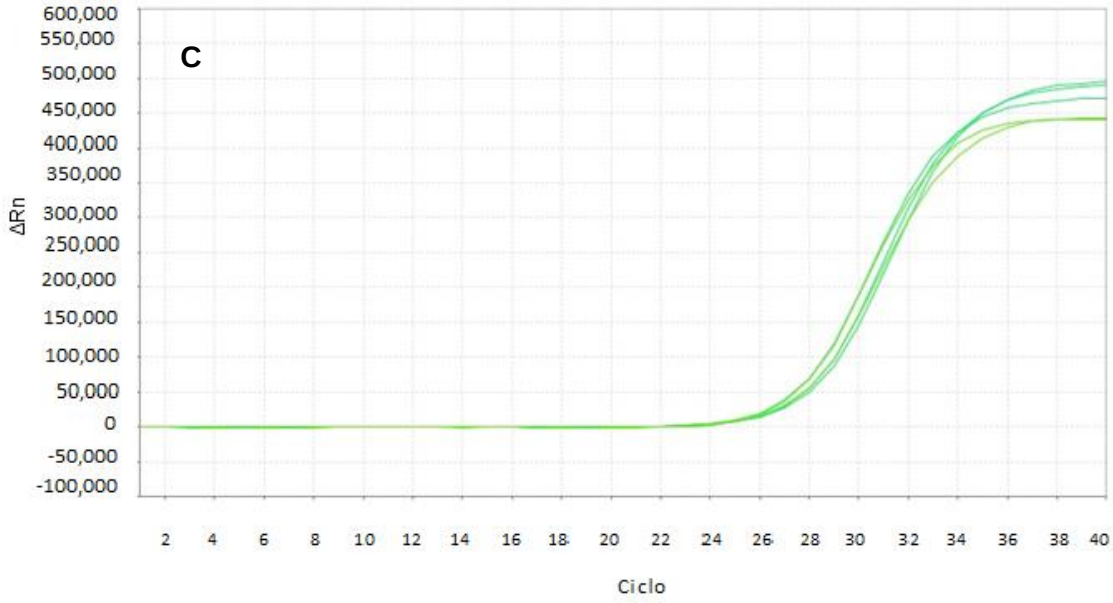


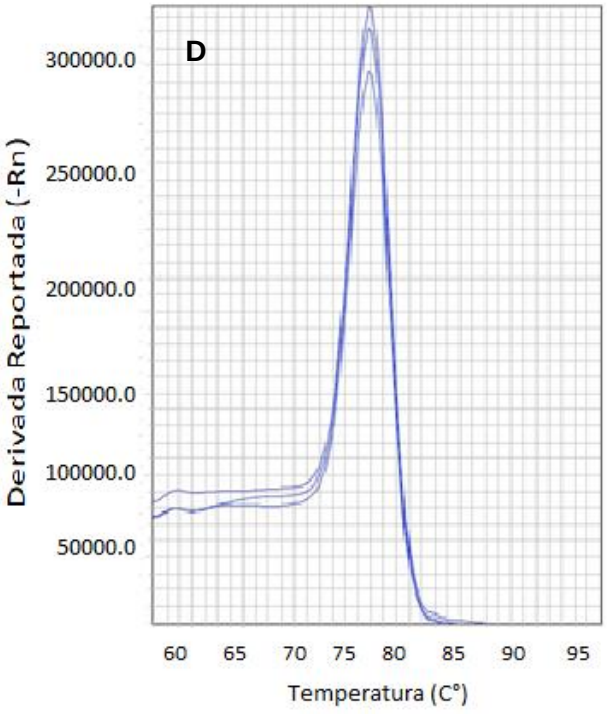
C) Curva de amplificación para la condición de 5% NaCl. **D)** Curva de disociación para el ORF 615 en la condición de 0%. **E)** Curva de disociación para el ORF 616 en la condición de 0%.

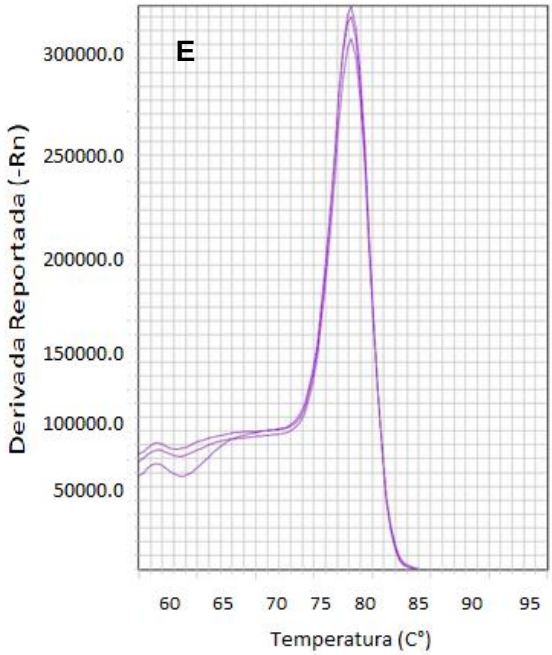
10.9 Curvas de amplificación y de disociación para los ORFs 901 y 902, Enterocina X cadena α y Enterocina X cadena β, en diferentes concentraciones de NaCl



A) Curva de amplificación para la condición de 0% NaCl. **B)** Curva de amplificación para la condición de 3% NaCl







C) Curva de amplificación para la condición de 5% NaCl. **D)** Curva de disociación para el ORF 901 en la condición de 0%. **E)** Curva de disociación para el ORF 902 en la condición de 0%