



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE TOMATE
SALADETTE PRODUCTORAS DE PÉPTIDOS
ANTIMICROBIANOS INHIBIDORES DE PATÓGENOS
ALIMENTARIOS.**

Por:

Oneyda Trejo Ibarra

TESIS APROBADA POR LA

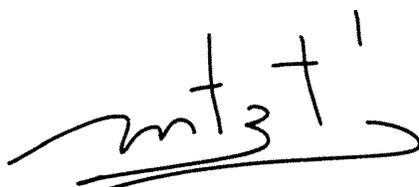
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

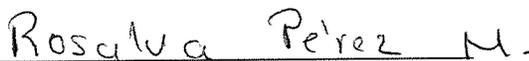
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Oneyda Trejo Ibarra, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



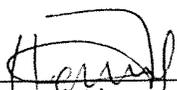
Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez
Director de tesis



Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro
Integrante del comité de tesis



M.C. Rosalva Pérez Morales
Integrante del comité de tesis



M.C. Emmanúel Aispuro Hernández
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Bacterias Ácido Lácticas Aisladas de Tomate Saladette Productoras de Péptidos Antimicrobianos Inhibidores de Patógenos Alimentarios” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Oneyda Trejo Ibarra, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.

**CIAD**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos


Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias, así como por el apoyo otorgado durante todo el posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD A.C.) por aceptarme como su alumna y brindarme su apoyo en cada etapa durante toda mi estancia.

A mi director de tesis, Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez, por aceptarme como estudiante, como parte de su equipo de trabajo, por su apoyo académico.

A los integrantes de mi comité de tesis, Dra. Irasema Vargas Arispuro, MC. Rosalva Pérez Morales y MC. Emmanuel Aispuro Hernández, por su apoyo otorgado en todo este proceso. Les agradezco, sus consejos, sus recomendaciones, sus correcciones, y su disposición para compartir sus conocimientos a lo largo de este proceso.

Al Laboratorio de Fisiología Vegetal-Molecular dirigido por el Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez y coordinado por Emmanuel Aispuro y Francisco Soto. Cada uno de ellos me mostró su apoyo académico y personal.

Al Laboratorio de Ecología Química dirigido por la Dra. Irasema Vargas Arispuro y coordinado por Consuelo Corrales y Rosalva Pérez, les agradezco toda su disposición.

Al Laboratorio de Tecnologías Emergentes dirigido por el Dr. Fernando Ayala Zavala especialmente a Melvin Tapia, por su apoyo y prestamos de equipos durante mi proyecto de investigación.

A mis compañeros de laboratorio Laura, Frida y Ezequiel, agradezco cada uno de sus consejos, anécdotas, risas, apoyo en frustraciones y por los bellos momentos que compartimos a lo largo de estos 2 años.

A mis amigos, Frida, Laura María, Ezequiel, Laura, Eileen y Gris, por sus risas, ocurrencias, anécdotas y consejos. Por la amistad que inició en la Maestría y que espero continúe por siempre, les deseo la mayor de las suertes y éxito.

A mi madre Oneyda Ibarra, quien siempre ha sido un ejemplo a seguir, me ha dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño. Siempre demostrándome su apoyo y su amor incondicional.

A mis padrinos Luis Enrique y Norma Alicia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

A mi futuro esposo, Antonio Obregón, debo agradecer por sus palabras de aliento, su confianza en mi persona, su paciencia, por siempre estar a mi lado, demostrándome su apoyo incondicional, por alentarme a crecer y por todo su amor.

A toda mi familia porque cada uno de ellos me ha enseñado algo, y me ha hecho mejorar como persona hermanos, tías y primas.

Y, por último, pero no menos importante, gracias a la vida y a Dios, por darme, salud y la oportunidad de vivir esta etapa tan linda, por siempre estar en todo lo que realizo así como, por unirme a las personas correctas durante esta y todas las etapas de mi vida, sin ellas nada sería igual.

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo a la vida por todas las personas y oportunidades maravillosas que ha puesto en mi camino.

A Dios, por darme la fuerza, inteligencia y salud para realizar este proyecto.

A mi madre Oneyda, por el gran amor y la devoción que tiene a sus hijos, por el apoyo ilimitado e incondicional que siempre me ha dado, por tener siempre la fortaleza de salir adelante sin importar los obstáculos, por haberme formado como una persona de bien, y por ser la mujer que me dio la vida y me enseñó a vivirla. Te amo mamá.

A mis padrinos Luis Enrique y Norma Alicia por su gran amor y cariño, me acompañan en todos mis sueños y metas.

Al amor de mi vida Antonio, quien es la persona que me motiva a ser mejor cada día, quien me ha enseñado a amar incondicionalmente y a nunca rendirme.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
LISTA DE CUADROS	13
LISTA DE FIGURAS	14
RESUMEN	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUCCIÓN	17
2. ANTECEDENTES	19
2.1. Inocuidad Agroalimentaria	19
2.1.1. Enfermedades Transmitidas por Alimentos de Origen Vegetal.	20
2.1.2. Brotes de <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Escherichia coli</i> O157:H7 y <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> Relacionados con el Consumo de Hortalizas.....	21
2.1.3. Medidas de Control para Evitar las ETA's Relacionadas con Alimentos de Origen Vegetal.....	22
2.1.4. Buenas Prácticas de Higiene en la Industria Hortícola.....	23
2.2. Metabolitos Extracelulares con Actividad Antibacteriana Producidos por Bacterias Ácido Lácticas (BAL)	24
2.2.1. Modo de Acción de los Metabolitos Extracelulares Producidos por Bacterias Ácido Lácticas (BAL) con Actividad Antibacteriana	25
2.3. Bacteriocinas Producidas a Partir de Bacterias Ácido Lácticas	26
2.3.1. Obtención de Bacteriocinas a partir de Bacterias Ácido Lácticas.	27
2.3.2. Clasificación de Bacteriocinas.....	27
2.3.3. Usos y Aplicaciones de las Bacteriocinas.....	28
3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo General.....	31
4.2 Objetivos Específicos	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1. Reactivación de las Cepas y Condiciones de Cultivo	32
5.2. Tinción Gram, Prueba de Catalasa y Oxidasa	33
5.3. Ensayo de Inhibición Célula -Célula.....	33
5.4. Obtención del Sobrenadante Libre de Células (SLC)	34
5.5 Búsqueda del Compuesto Antagónico del SLC	34
5.6. Pruebas de Estabilidad Térmica.	35
5.7. Identificación por Colorimetría Avanzada VITEK	35

CONTENIDO (continuación)

5.8. Análisis por PCR Punto Final y Secuenciación del Gen 16S Ribosomal	36
5.9. Identificación Microbiológica por Fermentación de Carbohidratos Específicos	37
5.10 Efecto de los SLC en los Parámetros Cinéticos de <i>Listeria monocytogenes</i> y Cuantificación de Proteína	38
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1. Reactivación y Evaluación de la Actividad Antibacteriana, de las BAL Aisladas de Tomate Saladette.....	40
6.2. Búsqueda del Compuesto Antagonista de los SLC	42
6.3 Estabilidad Térmica.....	44
6.4 Identificación por VITEK® 2 Compact	45
6.5. Identificación de los Aislados de BAL por Técnicas Moleculares	46
6.6 Evaluación del Efecto Antagónico del SLC contra <i>Listeria monocytogenes</i> y Cuantificación de Proteína	50
7. CONCLUSIÓN	53
8. RECOMEDACIONES	54
9. REFERENCIAS	55
10. ANEXOS	61
10.1. Protocolo de Cuantificación de Proteínas.....	61

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Brotos de ETA's Relacionados a la Ingesta de Hortalizas.....	18
2	Composición de la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificación del ADN.	32
3	Etapas de la PCR. Ciclos, temperaturas y tiempos para la amplificación del gen 16S ARN ribosomal.....	33
4	Formulación del medio MRS modificado sin glucosa. Formulación para 1000 mL.....	34
5	Actividad antagonista célula-célula por el método de difusión en agar suave y pruebas bioquímicas.....	37
6	Actividad antagonista célula-célula de las BAL aisladas de tomate Saladette.....	38
7	Detección de metabolitos con actividad bacteriocinogenica.....	39
8	Identificación por colorimetría avanzada VITEK® 2 Compact.....	42
9	Identificación VITEK® 2 V/s. identificación por Técnicas Moleculares.....	45
10	Fermentación diferencial de azúcares entre cepas de <i>Pediococcus</i> epífitas de tomate Saladette.....	46
11	Valores cinéticos obtenidos de la curva de crecimiento de las bacterias patógenas tratadas con 15 µL de SLC.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1 Antagonismo del Sobrenadante Libre de Células (SLC) Contra Bacterias Patógenas.....	38
2 Estabilidad térmica de los aislados bacterianos.	41
3 Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR-ADN de los aislados bacterianos.....	43
4 Árbol filogenético de los productos de amplificación de PCR.....	44
5 Inhibición del crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en microplaca.....	47

RESUMEN

La Inocuidad alimentaria es la ausencia de peligros biológicos, físicos y químicos en los alimentos que causan daños a la salud de los consumidores. La frecuencia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (*ETA's*), ocasionadas por la ingesta de frutas y hortalizas contaminadas con microorganismos patógenos es un problema global. Por lo que una estrategia para reducir los brotes por *ETA's* es la búsqueda de bacterias ácido-lácticas (BAL), las cuales producen metabolitos extracelulares antagonistas como el ácido láctico, ácidos grasos de cadena corta y sustancias proteicas denominadas bacteriocinas que inhiban el crecimiento de bacterias patógenas presentes en frutas y hortalizas. En este trabajo de investigación se logró la identificación de seis BAL aisladas de tomate Saladette, pertenecientes a los géneros bacterianos *Pediococcus pentosaceus* (T1OI 125, 221) y *Enterococcus spp* (T1OI 151, 227, 229 y 234). Capaces de producir compuestos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, debido a la presencia de compuestos de naturaleza proteica. Se determinó que una concentración ≥ 0.6 μg de proteína/ml del sobrenadante libre de células (SLC) son suficientes para reducir la densidad óptica (DO máx), e incrementar el efecto antagonista conforme se aumenta la concentración del SLC fase lag, y disminuir la tasa de crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Los compuestos de naturaleza proteica, resultaron termoestables a 100 °C, así como a un ciclo de autoclave (121°C / 15psi), son resistentes a pH ácido y sensibles a proteasas. Lo anterior indica que el tomate Saladette es una fuente de microorganismos con potencial biotecnológico en el control de patógenos en los alimentos.

Palabras clave: *Inocuidad agroalimentaria, antagonismo bacteriano, péptidos antimicrobianos, bacteriocinas.*

ABSTRACT

Food safety is the absence of biological, physical and chemical hazards in food that cause damage to the health of consumers. The frequency of outbreaks of foodborne diseases (*ETA's*), caused by the ingestion of fruits and vegetables contaminated with pathogenic microorganisms , is a global problem. Therefore, a strategy to reduce FBD outbreaks *is* the search for lactic acid bacteria (LAB), which produce antagonistic extracellular metabolites such as lactic acid, short-chain fatty acids, and protein substances called bacteriocins that inhibit the growth of bacteria pathogens present in fruits and vegetables. In this research work, the identification of six LAB isolated from Saladette tomato, belonging to the bacterial genera *Pediococcus pentosaceus* (T1OI 125, 221) and *Enterococcus spp* (T1OI 151, 227, 229 and 234) was achieved. Capable of producing antimicrobial compounds that inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* , due to the presence of compounds of a protein nature. It was determined that a concentration ≥ 0.6 μg of protein/ml of the cell-free supernatant (SLC) is sufficient to reduce the optical density (OD max), and increase the antagonistic effect as the concentration of the lag phase SLC increases, *and* decrease the growth rate of *Listeria monocytogenes* . The proteinaceous compounds were thermostable at 100 °C, as well as at an autoclave cycle (121 °C / 15 psi) , they are resistant to acidic pH and sensitive to proteases. This indicates that the Saladette tomato is a source of microorganisms with biotechnological potential in the control of pathogens in food.

Keywords: *Food safety, bacterial antagonism, antimicrobial peptides, bacteriocins*

1. INTRODUCCIÓN

Cuando dos o más personas contraen la misma enfermedad por el mismo alimento o bebida contaminada, el evento se denomina brote de enfermedad transmitida por alimentos (ETA). Más de 15 brotes por consumo de frutas y vegetales contaminados con bacterias patógenas se han documentado en los EEUU de 2010 a 2018, con más de 2500 casos de infecciones y más de 734 hospitalizaciones, incluidas 50 muertes (CDC., 2018), sin embargo, durante los últimos años se han registrado aumentos significativos de la incidencia de enfermedades provocadas el consumo de hortalizas contaminadas con microorganismos patógenos como *Salmonella spp*, *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 y *Listeria monocytogenes*. En octubre del 2020 se registró un brote multiestatal de infecciones por *E. coli* O157:H7, en el cual se determinó que la cepa tenía correlación genética con el brote de *E. coli* O157:H7, relacionado con lechuga romana en 2019, el cual enfermó a 167 personas en California EE.UU. (FDA., 2020). En diciembre del 2021 La FDA, junto con la CDC, informaron un total de 18 personas infectadas con la cepa del brote de *Listeria monocytogenes* en 13 estados de EE.UU., relacionado con las verduras de hojas verdes envasadas (FDA., 2021).

Con relación a los productos hortícolas frescos, las prácticas de producción, con higiene inadecuada de las instalaciones, el empleo de agua de riego contaminada, el uso de desechos biológicos sólidos como fertilizante con tratamiento inapropiado, la presencia de animales en las áreas de cultivo, hasta la proximidad a zonas de acumulación de aguas residuales, incrementan la probabilidad de contaminar los alimentos (Castillo y col., 2009). Aunado a esto, cuando una hortaliza está expuesta a bacterias patógenas, la capacidad que tienen estas para adherirse y sobrevivir en la superficie de las frutas y hortaliza frescas, y entrar a los sistemas de suministro de alimentos, sigue siendo un problema de salud pública (Torres Armendáriz y col., 2016).

Por otra parte, la mayoría de los países que pretenden exportar productos hortícolas para consumo humano requieren de certificaciones sanitarias que garanticen la inocuidad de sus productos y puedan asegurarles una participación competitiva y permanente en el mercado. Aunque se han establecido medidas de control para reducir o eliminar la contaminación biológica, durante la cadena de producción, cosecha y procesamiento, como el uso de agua potable en el manejo poscosecha, la desinfección de producto y cuidado en la higiene del trabajador agrícola, de las

instalaciones y el transporte (Martínez-Téllez y col., 2007), la incidencia de ETA's se continúa presentando a nivel mundial. Por consiguiente, en las últimas décadas se ha optado por la implementación de alternativas, incluyendo el uso de bacterias no patogénicas con actividad antagonista contra patógenos humanos, dentro de estas bacterias destacan las bacterias ácido lácticas (BAL) las cuales producen metabolitos extracelulares antagonistas como el ácido láctico, ácidos grasos de cadena corta y sustancias proteicas denominadas bacteriocinas. Estas últimas han sido estudiadas y aplicadas en la industria alimentaria, ya que ejercen actividad inhibitoria a patógenos que comparten su mismo hábitat (Inglis y col., 2013).

Gutiérrez y col., (2005) encontraron actividad antagónica del extracto crudo producido por *Lb. Plantarum* sobre el crecimiento *in vitro* de *Salmonella*, *E. coli* y *Listeria monocytogenes*, demostrando el potencial bactericida de estos extractos sobre microorganismos de interés en alimentos, mientras que, en 2008 Molinos y colaboradores, determinaron que la enterocina AS-48, inhibió el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en frambuesas enteras, en rodajas de fresas y moras almacenadas a bajas temperaturas. Sin embargo, solo la bacteriocina conocida como nisina ha sido comercializada y aceptada como aditivo alimentario en productos cárnicos y lácteos, por el FDA (Mondragón Preciado y col., 2013). Lo anterior sugiere que la producción de bacteriocinas por bacterias ácido láctico y su aplicación en el manejo pre y poscosecha de frutas y hortalizas podría prevenir la contaminación biológica y contribuir en el aseguramiento de la inocuidad de los productos hortofrutícolas frescos. De modo que, el objetivo de la presente investigación tiene como propósito resaltar la importancia del antagonismo de bacterias ácido lácticas y su aplicación como una alternativa sanitaria en los productos hortícolas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Inocuidad Agroalimentaria

Inocuidad es la característica que tienen los alimentos de no causar daño a la salud al ser consumidos, por efecto de algún contaminante de tipo físico, químico o microbiológico. Mientras que los sistemas de inocuidad alimentaria, brindan seguridad en todas las etapas de producción de los alimentos, en las cuales se debe evitar cualquier posibilidad de contaminar el producto, tomando medidas anticipadas de control, en procesos que van desde la producción, selección, empaque, comercialización y consumo de los mismos (SADER., 2015). La inocuidad en los alimentos, cada día adquiere mayor vigencia en los ámbitos nacional e internacional. La disponibilidad de alimentos de buena calidad sanitaria es un requerimiento generalizado, cuya demanda aumenta a medida que la población gana conciencia de la importancia para la salud de consumir alimentos no contaminados por agentes patógenos o sustancias tóxicas (Avendaño y *col.*, 2007).

Actualmente los mercados nacionales e internacionales son cada vez más exigentes en el comercio de frutas y hortalizas para consumo humano, por lo cual necesitan contar con una certificación que garantice la inocuidad de sus productos y pueda asegurarles una participación competitiva y permanente en el mercado. Para esto existen organizaciones no gubernamentales a nivel mundial que trabajan para fortalecer las reglamentaciones para mejorar el control en los alimentos y así evitar casos de contaminaciones que tengan como consecuencias enfermedades y retiros de alimentos del comercio (FAO, 2016). No obstante, a nivel mundial el sector está siendo señalado debido a la frecuente presencia de brotes de enfermedades gastrointestinales, transmitidas por alimentos (ETA's) derivadas de un manejo inadecuado de las frutas y hortalizas frescas (SENASICA, 2021) lo que requiere de mejorar las medidas de control de peligros biológicos en la producción de productos agrícolas frescos.

2.1.1. Enfermedades Transmitidas por Alimentos de Origen Vegetal.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's) reconstituyen un importante problema de salud a nivel mundial, estas pueden transmitirse por la ingestión de alimentos que contienen microorganismos perjudiciales para la salud, como virus, bacterias y parásitos, o por la ingestión de toxinas que se encuentran presentes en el alimento ingerido, producidas por hongos o bacterias. El consumo de frutas y verduras está asociado a un estilo de vida saludable, sin embargo, aunque este grupo de alimentos de origen vegetal no se considera la principal fuente de infecciones alimentarias, se ha producido en las últimas décadas un aumento de ETA's relacionadas con su consumo, (OMS., 2020) ya que en su superficie suelen presentar una carga estática o tienen una textura microrugosa, lo cual incrementa la posibilidad de contaminación bacteriana debido a que facilitan la adhesión y establecimiento de la bacteria (Rivera y col., 2009). Actualmente las frutas y hortalizas, son vistas como un riesgo potencial para la salud de los consumidores, por infección alimentarias por patógenos como *Salmonella* spp., *E. coli* O157: H7 y *Listeria monocytogenes* (CDC, 2017) entre otras.

La especie *Salmonella* spp pertenece a la familia de las Enterobacteriaceae, que son bacterias Gram negativas, intracelulares facultativas, resistentes y pueden adaptarse a las condiciones ambientales extremas (Foster y col., 1995). Las cepas de *Salmonella* se dividen en grupos que se basan en la variabilidad de antígenos superficiales que se detectan mediante serotipificación (Hansen, 2005). Hasta ahora se han identificado alrededor de 2,501 serotipos de *Salmonella*, cuyo potencial patogénico está representado por *Salmonella* entérica (Barreto, 2016). Otro microorganismo perteneciente a la misma familia de las Enterobacteriaceae, es *E. coli*, el cual es un bacilo gramnegativo, anaeróbico facultativo que forma parte de la flora intestinal normal de los humanos y otros animales de sangre caliente. *E. coli* O157:H7 es la cepa más frecuente aislada en Norteamérica, ha estado asociada a la mayoría de los grandes brotes (Bavaro, 2012, Tzschoppe y col., 2012; Reineke y col., 2015). También, es el serotipo más frecuente asociado a diarrea hemorrágica, al síndrome urémico hemolítico (HUS, por sus siglas en inglés) y colitis hemorrágica (Ferens y col., 2011). Esta bacteria fue reportada por primera vez como un patógeno gastrointestinal en 1982 (Riley y col., 1983).

Por otra parte, *Listeria monocytogenes*, pertenece a la familia Listeriaceae, existen 13 serovariedades, pero sólo tres de ellas (1/2a, 1/2b y 4b), han sido aisladas en más de 90% de los casos (Wellinghausen, 2011). Es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, no esporulado, causante de la enfermedad conocida como listeriosis, la cual, presenta síntomas similares a la gripe u otras enfermedades transmitidas por alimentos, como diarreas o fiebre que en muchos casos no suele ser diagnosticada, pero en ciertos grupos de riesgo como personas ancianas, inmunodeprimidas o mujeres embarazadas puede llegar a ser una enfermedad grave y producir septicemias o meningitis, presentando una mortalidad del 30 % (Lomonaco, 2015). En 2013, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) reportó la presencia de 1763 casos de listeriosis confirmada en humanos, en 27 estados miembros de la UE, lo que supone una incidencia de 0.44 casos por cada 100.000 habitantes (EFSA, 2015).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el informe: “Estimación de la carga mundial de las enfermedades de transmisión alimentaria 2015” indica que, en América 77 millones de personas enferman cada año al ingerir alimentos contaminados y más de 9000 mueren como consecuencia de estas enfermedades, siendo niños menores de 5 años los que corren un mayor riesgo. Mientras que a nivel mundial 1 de cada 10 personas enferman cada año y 420,000 mueren (OMS., 2015). Por lo que, la inocuidad alimentaria adquiere cada día mayor vigencia en los ámbitos nacional e internacional. La disponibilidad de alimentos de buena calidad sanitaria es un requerimiento generalizado, cuya demanda aumenta a medida que la población gana conciencia de la importancia para la salud de consumir alimentos no contaminados por agentes patógenos o sustancias tóxicas. En respuesta a estos sucesos la FDA (Food and Droug Administration de los EE.UU. por sus siglas en inglés) creo la red coordinada de evaluación y respuesta a brotes (CORE) la cual se encarga de las actividades de vigilancia y post-respuesta relacionadas con incidentes que involucran múltiples enfermedades relacionadas con alimentos para humanos (FAO., 2020).

2.1.2. Brotes de *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* Relacionados con el consumo de Hortalizas.

Callejo y col, (2012) reportaron que los brotes de enfermedades transmitidas por frutas y hortalizas

frescas siguen siendo frecuentes en la Unión Europea y en Estados Unidos. En dicha investigación se determinó que *Salmonella* fue la principal causa de brotes en productos hortícolas y agrícolas en varios estados en los Estados Unidos y fue el patógeno involucrado en la mayoría de los brotes. En el Cuadro 1 se muestran los brotes de enfermedades transmitidas hortalizas, según los reportes del Centro de Control de Enfermedades (CDC, 2021).

Cuadro 1- Brotes de ETA's relacionados a la ingesta de hortalizas. Se incluyen únicamente los brotes reportados por la CDC en los últimos 6 años en EE.UU.

Hortaliza	Fecha	Nº Casos	Patógeno	Hospitalizaciones
Germinado de alfalfa	Febrero 2016	26	<i>Salmonella</i> Kentucky	8
Germinado de alfalfa	Febrero 2016	11	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	2
Germinado de alfalfa	Agosto 2016	37	<i>Salmonella</i> Abony	7
Verduras de hoja verde	Diciembre 2017	25	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	9
Brotes crudos	Febrero 2018	10	<i>Salmonella</i> Montevideo	0
Lechuga romana	Junio 2018	210	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	96
Ensalada primavera	Julio 2018	110	<i>Salmonella</i> Sandiego	25
Melón pre-cortado	Julio 2018	77	<i>Salmonella</i> Adelaide	36
Lechuga romana	Octubre – diciembre 2018	62	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	25
Melón pre-cortado	Mayo 2019	137	<i>Salmonella</i> Carrau	38
Lechuga romana	Enero 2020	167	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	85
Brotes de trébol	Abril 2020	51	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	3
Duraznos	Agosto 2020	101	<i>Salmonella</i> Enteritidis	28
Verduras de hoja verde	Diciembre 2020	40	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	20
Ensalada de verduras	Julio 2021	31	<i>Salmonella</i> Typhimurium	4

2.1.3. Medidas de Control para Evitar las ETA's Relacionadas con Alimentos de Origen Vegetal

En 2006, el Grupo Norteamericano de Trabajo en Comercio de Tomate (NATTWG, por sus siglas en inglés) publicó la primera edición de los Lineamientos de Inocuidad de los Alimentos Específicos para Tomate Fresco en la Cadena de Suministro. Se han generado varias iniciativas y medidas de control en todos los eslabones de la cadena de suministro de tomate fresco y hortalizas. Entre ellas se incluye La Ley de Modernización de la Inocuidad de los Alimentos de la FDA (FSMA, por sus siglas en inglés), cuyo objetivo es garantizar que el suministro de alimentos de los Estados Unidos sea inocuo desplazando el enfoque dedicado a la respuesta a la contaminación

hacia la prevención (FDA, 2020).

En la etapa poscosecha se han propuesto varias estrategias desde físicas como lavados o irradiación con luz ultravioleta, hasta químicas como lavados con diferentes sales u ozono gaseoso. Además, se ha propuesto la utilización de atmosferas modificadas, agua electrolizada oxidante, estricto manejo de temperatura y tiempos de almacenamiento, e incluso ha surgido como estrategia de desinfección la utilización de bacterias benéficas como las bacterias ácido lácticas (BAL) y algunos de sus metabolitos extracelulares como los péptidos antibacterianos (Wadamori y *col.*, 2017).

2.1.4. Buenas Prácticas de Higiene en la Industria Hortícola.

Con el fin de no poner en riesgo la salud de los consumidores, los gobiernos de los países aplican regulaciones, acciones y normas estrictas para garantizar que la comercialización de productos hortícolas, cumplan con los más altos estándares de calidad e inocuidad. Las prácticas sugeridas se conocen en conjunto como Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). Las BPA junto con los principios de los programas de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP, por sus siglas en inglés), proporcionan orientación general en materia de inocuidad de los alimentos en etapas críticas de la producción en las que tal inocuidad podría verse comprometida durante el cultivo, cosecha, transporte, enfriamiento, empaque, almacenamiento de los productos frescos, uso de plaguicidas y fertilizantes, condiciones de sanidad del equipo calidad del agua e higiene del personal.

Sin embargo, cuando es necesario, la FDA trabaja con los productores de alimentos para facilitar el retiro voluntario u obligatorio de productos potencialmente contaminados, bajo la Ley de Modernización de la Seguridad Alimentaria de la FDA (FSMA, por sus siglas en inglés), (FDA, 2020). Como se mencionó anteriormente, el uso irracional de productos químicos ha causado la contaminación de suelos y aguas; los residuos de pesticidas permanecen en el medio ambiente ocasionando pérdidas de la biodiversidad debido a su acumulación, así como el uso excesivo de desinfectantes ha creado resistencia microbiana, además de intoxicaciones y otras enfermedades en los seres humanos. A pesar de las medidas de control, para eliminar la contaminación por bacterias patógenas, que se empezaron a implantar en las industrias alimentarias a partir de la

década de los 90, estas bacterias siguen siendo una causa importante de brotes transmitidos por alimentos (Buchanan, 2017).

Por lo cual, es necesario utilizar alternativas eficaces para reducir los microorganismos patógenos contaminantes en frutas y hortalizas, sin deteriorar sus propiedades nutritivas. Para esto en los últimos años el uso de microorganismos antagonistas y sus metabolitos extracelulares, han sido estudiados como una alternativa que, en combinación con las prácticas habituales, puede reducir o prevenir el crecimiento de patógenos en productos frescos, mejorando su calidad microbiológica (Alegre Vilas, 2020).

2.2. Metabolitos Extracelulares con Actividad Antibacteriana Producidos por Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Las BAL constituyen un grupo extenso y heterogéneo de microorganismos filogenéticamente relacionados, notablemente versátiles, y, ampliamente distribuidos en la naturaleza cuya característica principal es la producir ácido láctico como metabolito final mayoritario de la fermentación de carbohidratos. Se caracterizan por ser bacterias Gram-positivas, inmóviles, no esporuladas, anaerobios aerotolerantes de morfología celular cocoide o bacilar de longitud variable, dispuestos en forma individual, de a pares, en tétradas o cadenas. Su característica principal es la de ser estrictamente fermentativas y producir como compuesto final de dicha fermentación ácido láctico, como producto único o mayoritario. Carecen de la enzima catalasa debido a su incapacidad para sintetizar compuestos porfirínicos, aunque en ciertas especies se encontró una pseudo-catalasa cuando crecen en condiciones de aerobiosis (Axelsson y *col.*, 2004) y de citocromo oxidasa. Poseen peroxidasa y superóxido dismutasa que destruyen el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ión superóxido (O_2^-) respectivamente. Forman colonias color blanco lechoso debido a la ausencia de citocromos. No poseen cadena transportadora de electrones responsable de la respiración (Axelsson y *col.*, 2004)

El efecto antimicrobiano de las BAL se debe principalmente a la síntesis y acumulación en el medio externo de una amplia variedad de metabolitos primarios y secundarios con propiedades antimicrobianas, como ácidos orgánicos, etanol, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno,

diacetilo, acetaldehído, benzoatos, isómero D- de algunos aminoácidos, algunos compuestos no proteicos de pequeño tamaño molecular como la reuterina y las bacteriocinas (Ouwehand, 1998).

2.2.1. Modo de Acción de los Metabolitos Extracelulares Producidos por Bacterias Ácido Lácticas (BAL) con Actividad Antibacteriana

El antagonismo se puede clasificar en dos grandes grupos: 1) antagonismo directo, que resulta del contacto físico, donde el patógeno tiene un alto grado de selectividad por el mecanismo que exprese el agente de control biológico y, 2) el antagonismo indirecto, en el cual no se necesita un contacto físico necesariamente entre patógeno y antagonista (Gardener y Fravel, 2002).

En el caso de los ácidos orgánicos, como el láctico, acético y propiónico, la fracción no disociada de los mismos, ejerce la actividad antimicrobiana al interferir con funciones metabólicas esenciales. El dióxido de carbono es considerado un antimicrobiano de amplio espectro que actúa disminuyendo el pH extra e intracelular y desestabilizando las membranas celulares donde se acumula. Por su potente actividad antimicrobiana se utiliza como conservante de carnes, pescados, frutas, verduras y hortalizas refrigeradas, donde inhibe el crecimiento de microorganismos psicrótrofos, y en la fermentación de vegetales y ensilados para prevenir el desarrollo de mohos (Lindgren y Dobrogosz, 1990).

Por otra parte, el peróxido de hidrogeno, presenta un potente efecto antimicrobiano, el cual junto al de las bacteriocinas merece ser destacado. Las BAL en condiciones de aerobiosis son capaces de producir peróxido de hidrógeno a partir de la forma reducida de la nicotinamidaadeninucleotido (NADH), por acción de una flavoproteína NADH:H₂O₂ oxidasa, y aunque no poseen catalasa, se autoprotegen de los efectos del H₂O₂, liberándolo al medio donde se acumula (Condon, 1987). El efecto bactericida o bacteriostático del peróxido de hidrógeno es debido a su elevado poder oxidante, que provoca (i) la peroxidación de los lípidos de la membrana, incrementando de este modo la permeabilidad celular, y (ii) la inactivación de enzimas y coenzimas mediante la oxidación de sus grupos sulfhidrilo (Kong y Davidson, 1980). La elevada toxicidad de este compuesto también puede ser atribuida a su capacidad para destruir estructuras moleculares básicas como las proteínas y los ácidos nucleicos en los que es capaz de romper los enlaces

intercatenarios y de alterar las bases nitrogenadas, inhibiendo así la replicación cromosómica (Piard y Desmazaud, 1991).

La mayoría de las bacteriocinas de las BAL inhiben el crecimiento de las bacterias mediante la formación de poros en la membrana celular, lo cual 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 cargadas negativamente. Además, la naturaleza anfipática de las bacteriocinas facilita aún más su distribución a lo largo de la superficie de la membrana celular de la bacteria (Cotter y col., 2005; Nishie y col., 2012; Yusuf y col., 2013). La unión de bacteriocinas con 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, lo que resulta en la formación de poros en la membrana y como consecuencia se produce un vaciamiento intracelular, generando la pérdida de iones K, de energía en forma de ATP y en algunos casos, de aminoácidos y moléculas de bajo peso molecular (Bemena y col., 2014)

Debido a esto, se ha incrementado el interés en este fenómeno como una aplicación tecnológica para la mejora de las medidas de control de patógenos en la agricultura. (Andrews y col., 1983; Atlas, y col., 2002). Por lo que se ha tratado de aprovechar las relaciones antagonistas entre las poblaciones microbianas, para controlar patógenos vegetales.

2.3. Bacteriocinas Producidas a Partir de Bacterias Ácido Lácticas

La primera bacteriocina identificada por Gratia en el año de 1925 como una proteína antimicrobiana, fue extraída de *E.coli* y fue llamada colicina (Pinheiro y col., 2013). Para el año de 1988, otra bacteriocina llamada nisina, fue lanzada comercialmente, como un aditivo considerado seguro y aprobado por la FDA. En los años 90 se prestó atención hacia el desarrollo de alternativas para la sustitución de antibióticos, sobre todo tomando en cuenta el aumento de resistencia que se sigue presentando con el uso de antibióticos (Snyder y Worobo, 2014). Para el año de 1995, ya se conocían más de 100 bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (BAL).

Durante las últimas décadas, una gran cantidad de estudios se han enfocado a la detección, producción, forma de acción, caracterización bioquímica, propiedades bactericidas y microorganismos inhibidos por las bacteriocinas. A consecuencia de los resultados de estos estudios, es que surgió el término de bacteriogenicidad el cual se define como la capacidad bacteriana de sintetizar y secretar proteínas de actividad antagonica sobre otros microorganismos que comparten el mismo nicho biológico y están en constante competencia por nutrientes y espacio (Vásquez y col., 2009).

2.3.1. Obtención de Bacteriocinas a partir de Bacterias Ácido Lácticas.

Tras la fermentación de carbohidratos, las bacterias ácido lácticas producen sustancias antimicrobianas como el ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno y péptidos de bajo peso molecular, llamados bacteriocinas (Casas y Dobrogosz, 2000). Estas sustancias pueden generar un cambio en la microbiota intestinal por la inhibición de patógenos. Las bacteriocinas de las BAL contienen residuos de aminoácidos tales como lisina, arginina e histidina, los cuales les confieren un carácter catiónico (pH neutro), y también contienen residuos de alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina y triptófano, lo que les proporciona su naturaleza hidrofóbica; además, las bacteriocinas también son de carácter anfipático (Diep y Nes, 2002; Yusuf, 2013).

2.3.2. Clasificación de Bacteriocinas

Las bacteriocinas han sido agrupadas en cinco clases por Alvarez-Sieiro y colaboradores, 2016: Dentro de la clase I se encuentran proteínas con un peso molecular inferior a 10 kDa con modificaciones postraduccionales. Esta clase incluye aquellas proteínas que son propensas a sufrir algunas modificaciones a través de su biosíntesis, debido a la presencia de una secuencia de péptido señal que permitirá el reconocimiento, transporte y mantenimiento del péptido inactivo. Estas

bacteriocinas también se caracterizan por su termoestabilidad. En la clase II se encuentran proteínas con un peso molecular inferior a 10 kDa sin modificaciones postraduccionales. Esta clase está formada por proteínas que no tienen modificaciones inusuales y no requieren ningún efector para su transporte. Al igual que la clase I, estas bacteriocinas también son termoestables.

Mientras que en la clase III se encuentran proteínas con un peso molecular superior a 10 kDa sin modificaciones postraduccionales. Estos pueden ejercer un mecanismo de acción lítico y no lítico. A diferencia de las bacteriocinas de clase I y II, las de clase III son termolábiles.

Dentro de la clase IV están los péptidos grandes y de estructura compleja, ya que se encuentran asociados a carbohidratos (glicoproteínas) o lípidos (lipoproteínas), siendo la lactocina S una de las bacteriocinas de esta clase. Por último en la clase V se encuentran péptidos con una estructura circular que no posee modificaciones postraduccionales, siendo la enterocina AS-48 un ejemplo de esta clase (Nes y col., 2007; Monroy y col., 2009; Zacharof y Lovitt, 2012; Balciunas y col., 2013).

2.3.3. Usos y Aplicaciones De Las Bacteriocinas.

De las bacteriocinas sintetizadas por bacterias ácido lácticas, la nisina es la única aplicada a nivel comercial, la cual se ha utilizado como bioconservador de alimentos en más de 50 países con una efectividad comprobada y además, es considerada como producto seguro con nivel GRAS (Generally Recognized As Safe por sus siglas en ingles) y con autorización para su aplicación por la FDA (Chen y Hoover, 2004). La adición de bacteriocinas en los alimentos representa una excelente estrategia para el control de bacterias patógenas perjudiciales para la salud humana como son *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolítica*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Salmonella Typhimurium* y *Bacillus cereus*, entre otras (De la Fuente y col., 2010). Por otra parte, las características óptimas que debe poseer un antagonista microbiano útil en cultivos vegetales son las siguientes: ser genéticamente estable, eficaz a bajas concentraciones, hábil para sobrevivir condiciones adversas del medio ambiente, incluyendo refrigeración y almacenamiento controlado, efectivo para una amplia gama de microorganismos patógenos en una variedad de frutas y hortalizas, fácil de producir en medios de bajo costo, resistente a desinfectantes, compatible con procedimientos de procesos comerciales, poder establecerse con

rapidez para minimizar la destrucción realizada por la plaga, no ser patogénico en el hospedero y que no produzca metabolitos secundarios dañinos a la salud humana (Bautista, 2006).

3. HIPÓTESIS

Algunas bacterias ácido lácticas aisladas de la microbiota epífita de tomate Saladette secretan metabolitos extracelulares con actividad antibacteriana contra *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Identificar bacterias ácido lácticas aisladas de tomate con actividad antibacteriana sobre *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*.

4.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la actividad antibacteriana en placa, de metabolitos extracelulares de bacterias ácido lácticas aisladas de tomate Saladette contra *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*.
2. Determinar si el compuesto antagonista de las bacterias ácido lácticas con actividad antibacteriana es por la producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno o compuestos proteicos.
3. Identificar las cepas de bacterias ácido lácticas productoras de metabolitos extracelulares aisladas de tomate Saladette mediante análisis por PCR y secuenciación del gen 16S ribosomal.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Fisiología Vegetal del Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo (CIAD), ubicado en Hermosillo, Sonora, México. Las bacterias ácido lácticas (BAL) conservadas en glicerol al 80% a -80°C fueron aisladas previamente de tomate, el cual fue muestreado en las temporadas primavera e invierno 2012 en tres distintas localidades de Sonora: Guaymas, Benito Juárez y Costa de Hermosillo.

Para evaluar la actividad bacteriocinogénica en placa, de bacterias ácido lácticas aisladas de tomate Saladette, se utilizaron los siguientes medios de cultivo comerciales: caldo y agar de Man Rogosa & Sharpe (MRS) y caldo de infusión cerebro-corazón (BHI), todos estos de Difco™ (Beckton Dickinson, E.U.A.). Además, de las enzimas comerciales: catalasa, proteinasa K, proteasa y tripsina (Sigma-Aldrich, E.U.A.).

5.1. Reactivación de las Cepas y Condiciones de Cultivo

Se descongelaron 180 aislados bacterianos obtenidos de tomate y conservados en glicerol a -80 °C y se sembraron en caldo tripticosa soya (TSB) y en caldo MRS y se incubaron durante 24 h para su óptimo desarrollo. Las bacterias patógenas *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella entérica* subsp. *entérica* serovariedad Typhimurium ATCC 14028 fueron donadas por el Laboratorio de Tecnologías Emergentes de la Coordinación de Tecnologías de Alimentos de Origen Vegetal del CIAD, A.C. *Escherichia coli* O157:H7 K3999 fue proporcionada por el Doctor Alejandro Castillo de la Universidad de Texas A&M. Para el crecimiento de las bacterias ácido lácticas se usó el medio de cultivo Man Rogosa & Sharpe (MRS) con una incubación a 37 °C por 18-24 horas y para las bacterias patógenas se utilizó caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) a 37 °C por 18-24 horas.

5.2. Tinción Gram, Prueba de Catalasa y Oxidasa

Posteriormente, se realizó tinción Gram para la identificación morfológica de los aislados antagonistas, donde se seleccionaron aquellos aislados bacterianos que presentaron tinción Gram positiva (cocos o bacilos color azul), ya que esta es una de las características principales de las BAL (Carr y *col.*, 2002).

La prueba de catalasa, consistió en colocar una gota de H₂O₂ al 3% sobre un portaobjetos y luego se transferir una porción de colonia sobre el H₂O₂ realizando una emulsión. La prueba se reportó positiva al observarse la producción de burbujas en la emulsión (Seija, 2002). Mientras que para la prueba de oxidasa se tomó una colonia aislada con el asa y se colocó en un portaobjetos, donde se le agregó una gota de reactivo de Kovacs (5 g de pdimetilaminobenzaldehído en 75 mL de alcohol amílico además de 25 mL de 25 HCl concentrado) (Bailón y Cervantes, 2003). Esta prueba se utiliza para conocer si el microorganismo es productor de la enzima citocromo-c-oxidasa. Un resultado negativo (en el cual la biomasa bacteriana no presenta cambio de color a azul,) es esperado para las BAL ya que carecen de citocromos (Ramírez y *col.*, 2011).

5.3. Ensayo de Inhibición Célula -Célula

La actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas aisladas de tomate Saladette se evaluó utilizando la técnica de difusión en agar BHI suave (Hernandez *et al.*, 2005), las bacterias patógenas indicadoras mencionadas en el punto 5.1 se reactivaron en caldo tripticasa de soya (TSB) a 37 °C por 16 horas, pasado este tiempo se recuperó el pellet bacteriano mediante centrifugación por 10 minutos a 10,000 x g a 4 °C. El pellet bacteriano se lavó en dos ocasiones con una solución amortiguadora de fosfatos de sodio 20 mM pH 6.5 ± 02, y se recuperó por centrifugación a las mismas condiciones anteriores. El pellet bacteriano lavado se homogeneizó en la solución amortiguadora ya mencionada y se ajustó a una DO_{600nm} = 0.1 (DO_{600nm}=0.1 equivale a 1x10⁶ UFC/mL determinado mediante una gráfica de relación DO vs UFC/mL) en un espectrofotómetro UV-visible BioSpec-1601 (Shimadzu, Japón). Cada una de las bacterias patógenas indicadoras se

inocularon a una concentración final de 1×10^5 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL. Cada bacteria se mezcló por separado con el agar suave BHI y después se vaciaron 20 mL de la mezcla en placas Petri (90 mm de diámetro) alcanzando una altura de 5 mm al solidificarse el agar suave, después las placas se refrigeraron por 30 min a 4 °C. Posterior a la refrigeración, se procedió a realizar pocillos con un diámetro de 6 mm, los cuales se realizaron con pipetas Pasteur estériles, en cada uno de los pocillos se colocaron 30 μ L de las cepas ácido lácticas aisladas de tomate Saladette, previamente ajustadas a una $DO_{600nm} = 0.1$ ($DO_{600nm}=0.1$ equivale a 1×10^6 UFC/mm) y se incubó a 37°C por 18-20 horas. La actividad antimicrobiana fue determinada por la medición en milímetros de la zona clara alrededor del pocillo con un vernier.

5.4. Obtención del Sobrenadante Libre de Células (SLC)

Se obtuvo el SLC de las bacterias ácido lácticas aisladas de tomate Saladette mediante centrifugación (10,000 x g, 10 min, 4°C), descartando el pellet bacteriano, y posteriormente el SLC se filtró a través 0.22 μ m (Durapore® Merck Millipore, Irlanda). El SLC filtrado se liofilizó utilizando un liofilizador Labconco Freezone 4.5 (EEUU). El SLC liofilizado se disolvió en una proporción de 1:10 p/v en buffer de fosfatos de sodio 20 mM pH 6.5 ± 0.2 , en los momentos que sería utilizado.

5.5 Búsqueda del Compuesto Antagónico del SLC

Para la identificación de los compuestos antagonistas que son producidos por BAL y que están presentes en el Sobrenadante Libre de Células (SLC), se llevó a cabo con la técnica realizada por Cruz-Guerrero y *col.*, (2014). La técnica se basa en la búsqueda de tres componentes: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y compuestos proteínicos (bacteriocinas y/o péptidos antimicrobianos:

Con el fin de encontrar si el antagonismo es por ácidos orgánicos se neutralizó el pH de 500 μ L

del SLC utilizando hidróxido de sodio 0.1 M (NaOH 0.1 M).

Para descartar el antagonismo por peróxido de hidrógeno, el pH del sobrenadante se neutralizó, se le adicionó catalasa e incubó por 90 minutos a 25 °C y 10 minutos a 65 °C. Cuando el antagonismo se mantuvo, al procedimiento anterior se agregó un paso donde se añadió proteinasa K, proteasa y tripsina (1 mg/mL), se incubó por 2 horas a 37 °C, y después se incubó 10 min a 65°C. Para evaluar cada SLC sometido a los diferentes tratamientos se siguió la técnica de difusión en agar suave con pocillos utilizando a *Listeria monocytogenes* como bacteria indicadora.

5.6. Pruebas de Estabilidad Térmica.

Se realizaron pruebas de estabilidad térmica a los SLC que contenían compuestos de naturaleza proteínica con actividad antibacteriana de acuerdo al método de Vaillancourt y *col.*, (2015), con pequeñas modificaciones. Se tomaron alícuotas de 100 µL del SLC, los cuales se expusieron a 30, 55, 65, 80, 100 °C durante 30 min, así como a un ciclo de autoclave (121°C / 15psi) por 15 min. Pasado el tiempo establecido, se realizó la prueba de antagonismo en placa frente a *Listeria monocytogenes*, aplicando 30 µL del patógeno en agar suave BHI y 30 µL del compuesto tipo bacteriocina en cada pocillo. Finalmente se tomó lectura de los halos de inhibición a las 24 horas. El procedimiento se realizó por triplicado.

5.7. Identificación por Colorimetría Avanzada VITEK

La identificación bacteriana de los aislados de tomate Saladette seleccionados, se llevó a cabo con el equipo VITEK® 2 Compact mediante servicio externo en el Laboratorio Bioquímico San José, Hermosillo Sonora. La identificación de las bacterias se basa en la inoculación de una suspensión de microorganismos en tarjetas con determinados paneles de reacciones bioquímicas. La sensibilidad antimicrobiana se lleva a cabo en forma similar a través de tarjetas que contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos correspondientes a los puntos de corte de

sensibilidad establecidos por el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), por sus siglas en inglés (Jordá Vargas y *col.*, 2005).

5.8. Análisis por PCR Punto Final y Secuenciación del Gen 16S Ribosomal

Se realizó la extracción de ADN genómico de los aislados THIO 125, 151, 221, 226, 229, 234 y 266 utilizando los reactivos comerciales QIA amp DNA mini kit, donde se siguieron las instrucciones del fabricante. El ADN genómico extraído fue utilizado como templado en una reacción en cadena de la polimerasa con los iniciadores universales sentido 519FW (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y antisentido 1492RV (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'), además de los componentes mostrados en el cuadro 2.

Cuadro 2- Composición de la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificación del ADN.

Componente	Cantidad en μL
MgCl ₂ 25 mM	4
dNTP's	1
Buffer 5X	10
Got Taq DNA polimerasa	0.25
Templado	18.34
FW (iniciador)	1.5
RV (antisentido)	1.5
Agua estéril	13.41
Volumen final	50

Cantidades utilizadas para una concentración de 200 ng de ADN

*Dependerá de los μL 's de templado necesarios para tener la concentración de 200 ng de ADN.

**Dependerá de la cantidad final del templado calculado.

Las mezclas realizadas se colocaron en un termociclador Perkin-Elmer P15389 (Waltham, MA), programado con las condiciones necesarias para la amplificación de un fragmento aproximado de 973 pb del gen 16S ARN ribosomal. Las condiciones del programa están descritas en el cuadro 3.

Cuadro 3- Etapas de la PCR. Ciclos, temperaturas y tiempos para la amplificación del gen 16S ARN ribosomal.

Etapa	Ciclo de PCR	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	Desnaturalización inicial	95	5
2	Desnaturalización	95	1
3	Alineación	55	1
4	Extensión	72	2
5	Extensión final	72	10
6	Conservación	4	*

* Repetir las etapas 2, 3 y 4 por 30 ciclos de reacción.

Los productos de PCR obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Sigma Aldrich) durante 60 min a 60 volts constantes en una cámara de electroforesis (BIO-RAD Power Pac 300) utilizando un buffer TBE 0.5X. Pasado el tiempo se tiñó con Gel Red 3X (BIOTIUM) y se observó en un transluminador de luz ultravioleta UV (UVP).

Por último, para la purificación de los productos de PCR se utilizó un juego de columnas comerciales ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) siguiendo las indicaciones del fabricante, después, se cuantificó la concentración de los productos en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 y la pureza se determinó mediante la relación 260/280. Los productos de PCR purificados se secuenciaron en Macrogen Inc. (Seúl, Corea) y la identidad de las secuencias se determinó mediante comparación con las secuencias disponibles en el banco de genes GenBank (NCBI) utilizando la herramienta informática BLAST.

5.9. Identificación Microbiológica por Fermentación de Carbohidratos Específicos

La diferenciación entre dos cepas de bacterias ácido lácticas del mismo género y especie se llevó a cabo mediante la fermentación diferencial de azúcares. Se utilizaron 10 mL de caldo MRS basal sin glucosa, para lo cual se reformuló el contenido de acuerdo a lo descrito por Saarella y *col*, (2003), suplementado al 1 % por los azúcares sacarosa, trehalosa y ramnosa (Cuadro 4). Se utilizó el indicador púrpura de bromocresol para comprobar la producción de ácido, ya que esta vira de color azul a amarillo cuando se detecta la presencia de ácidos. El tubo con el caldo preparado

adicionado con el azúcar al 1% y el indicador se inoculó con la bacteria correspondiente y se incubó a 37 °C por 24 h. Se tomó como positivo aquel tubo que virara del color azul a amarillo y que además presentara turbidez por el crecimiento bacteriano (Aguilar y *col.*, 2016). Los tubos que presentaron turbidez por el crecimiento bacteriano pero que no fueron amarillos se tomaron como negativos.

Cuadro 4. Formulación del medio MRS modificado sin glucosa. Formulación para 1000 mL

Reactivo/Medio	Cantidad	Marca
Peptona	10 g	Oxoid Ltd
Extracto de levadura	5 g	Oxoid Ltd
Acetato de sodio	5 g	Oxoid Ltd
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	2 g	Sigma Aldrich
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g	Sigma Aldrich
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.05 g	Sigma Aldrich
Tween 80	1 mL	Merk Darmstadt

5.10 Efecto de los SLC en los Parámetros Cinéticos de *Listeria monocytogenes* y Cuantificación de Proteína

El ensayo de inhibición de crecimiento en microplaca se realizó de acuerdo a de Lima Marques y *col.*, (2017). Se utilizó una microplaca COSTAR de 96 pocillos. Cinco μ L de una solución de *Listeria monocytogenes* a una concentración de 1×10^6 UFC/mL (0.1 unidades de absorbancia a 600 nm determinado mediante una gráfica de relación DO vs UFC/mL) fueron utilizados para inocular el caldo BHI con 15, 30 y 45 μ L del SLC para un volumen final de 300 μ L en cada pocillo. Después de añadir cada solución en los pocillos, la microplaca fue colocada en un lector de microplaca FLUOstar Omega (BMG LabTech, Alemania) con una incubación de 37 °C, se realizaron lecturas de densidad óptica (DO) a 600 nm cada 30 min, con 10 segundos de agitación antes de cada lectura, por 24 horas. Para verificar la esterilidad, 3 pocillos fueron llenados con caldo BHI sin inocular y 3 pocillos con caldo BHI y SLC sin inocular. Los valores de densidad óptica fueron graficados contra el tiempo utilizando el software Sigma Plot 12.0 (Systat software, E.U.A.).

La cuantificación de proteína se llevó a cabo utilizando un kit comercial del método del ácido bicinconínico de Thermo Fisher Scientific (Pierce® BCA Protein Assay Kit) (anexo 1), teniendo una curva de albumina sérica (0-2000 $\mu\text{g/mL}$) como referencia para extrapolar los valores de densidad óptica previamente obtenidas de las muestras evaluadas.

Los valores de tasa de crecimiento (expresado como h^{-1}), densidad óptica máxima de cultivo (DO_{max}), tiempo de duplicación (min) y la duración de la fase lag de crecimiento, fueron calculados con el software GrowthRates 3.0 (Hall y *col.*, 2014).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Reactivación y Evaluación de la Actividad Antibacteriana, de las BAL Aisladas de Tomate Saladette.

Se reactivaron 170 aislados bacterianos del tomate Saladette previamente almacenados a -80°C . Con el objetivo de favorecer el crecimiento de BAL se utilizó medio MRS. Cuarenta aislados de los 170 mostraron actividad antagonista célula-célula por el método de difusión en agar suave contra *Listeria monocytogenes* (Cuadro 5), considerando como positivos aquellos que produjeron un halo de inhibición mayor a 0.7 cm de diámetro (Figura 1), esto coincide con lo reportado por González y colaboradores, 2021, quienes obtuvieron antagonismo por metabolitos extracelulares de *Pediococcus pentosaceus* CM175 por el método de difusión en agar suave frente a *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, para la actividad antagonista célula-célula contra *Salmonella* Typhimurium y *Escherichia coli* O157:H7, no se registró antagonismo célula-célula en el presente trabajo (cuadro 6).

El efecto antagonista de los aislados bacterianos se debe a la producción de sustancias antimicrobianas, estas sustancias pueden ser peróxido de hidrogeno, ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y ácido láctico, por lo cual disminuyen el pH del medio provocando la muerte de la bacteria patógena; además también pueden competir por nutrientes (Casas y Dobrogosz, 2000; Hudault y col., 1997; Lievin y col., 2000), y producir péptidos antimicrobianos de bajo peso molecular y bacteriocinas.

Cuadro 5. Actividad antagonista célula-célula por el método de difusión en agar suave y pruebas bioquímicas.

Identificación del aislado bacteriano	Halo de Inhibición (mm) frente a <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	Halo de Inhibición (mm) <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	Halo de Inhibición (mm) <i>Escherichia coli</i> O157:H7 K3999	Tinción Gram	Oxidasa	Catalasa
BAL TOMATE 01 OTOÑO- INVIERNO						
19	9	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
21	9	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
31	9	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
59	12	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
125	14	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
138	14	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
139	14	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
145	9	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
151	15	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
157	14	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
160	7	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
190	11	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
221	15	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
223	10	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
225	14	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
226	8	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
227	21	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
229	15	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
234	16	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
235	11	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
251	10	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
266	11	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
295	11	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
BAL TOMATE 02 PRIMAVERA- VERANO						
3	11	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
30	8	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
56	11	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
101	10	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
110	14	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
112	9	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
129	7	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
130	10	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
133	8	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
135	10	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
145	14	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
BAL 01 Benito Juárez PRIMAVERA- VERANO						
135	7	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
139	11	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
155	9	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)

184	10	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
187	10	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)
239	11	Nd	Nd	(+)	(-)	(-)

Nd = halo de inhibición no detectado

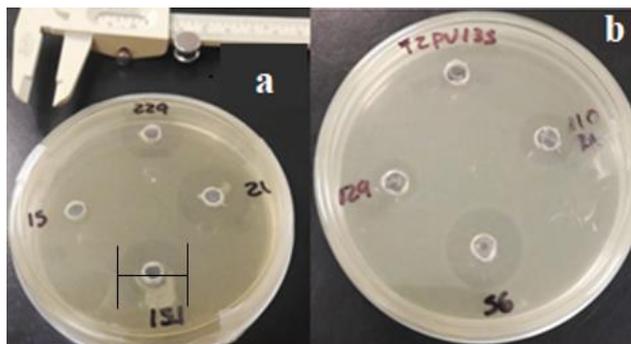


Figura 1. Antagonismo del Sobrenadante Libre de Células (SLC) Contra Bacterias Patógenas. A) Ensayo de antagonismo de BAL T10I frente a *Listeria monocytogenes*. B) Ensayo de antagonismo de BAL T2PV frente a *Listeria monocytogenes*.

Cuadro 6. Actividad antagonista célula-célula de las BAL aisladas de tomate Saladette

BAL aisladas de tomate Saladette	Halo de Inhibición (mm) <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	Halo de Inhibición (mm) <i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	Halo de Inhibición (mm) <i>Escherichia coli</i> O157:H7 K3999
BAL TOMATE 01 OTOÑO- INVIERNO	11.68± 3.52	Nd	Nd
BAL TOMATE 02 PRIMAVERA- VERANO	9.83± 2.48	Nd	Nd
BAL TOMATE 01 PRIMAVERA- VERANO	9.66± 1.50	Nd	Nd
BAL TOMATE 02 OTOÑO- INVIERNO	Nd	Nd	Nd

Los resultados están representados como media ± desviación estándar de 3 réplicas. Nd = halo de inhibición no detectado

6.2. Búsqueda del Compuesto Antagonista de los SLC

Para la identificación de los compuestos antagonistas que son producidos por BAL y que están

presentes en el sobrenadante libre de células (SLC), se procedió a determinar la naturaleza de los compuestos con actividad antagonista de los SLC obtenidos, frente a *Listeria monocytogenes*. Se realizó el ensayo de difusión en agar suave y se obtuvieron los resultados para los componentes ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y compuestos proteínicos (bacteriocinas y/o péptidos antimicrobianos).

Después de neutralizar el pH de los 40 SLC para eliminar el efecto de los ácidos orgánicos, 24 SLC conservaron la actividad inhibitoria frente a *Listeria monocytogenes*, y mantuvieron halos de inhibición alrededor de 15 ± 2 mm. Al descartar la presencia de ácidos orgánicos, se realizó el ensayo para eliminar al peróxido de hidrógeno y se obtuvieron 11 SLC que conservaron su actividad inhibitoria frente a *Listeria monocytogenes*, con halos de inhibición alrededor de 10 ± 2 mm. Posteriormente se llevó a cabo la detección de aquellos aislados productores de compuestos antagonistas de naturaleza proteica, para lo cual se agregó proteinasa K, proteasa y tripsina. Los resultados de esta etapa mostraron que los 11 SLC evaluados perdieron su actividad antibacteriana contra *Listeria monocytogenes* por efecto del tratamiento con enzimas proteolíticas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Detección de metabolitos con actividad antagonista

Clave de identificación del aislado	Detección de ácidos orgánicos (Halo de Inhibición en mm)	Detección de Peróxidos (Halo de Inhibición en mm)	Detección de Compuestos Proteicos (Halo de Inhibición en mm)
BAL 01 Benito Juárez (otoño- invierno)			
125	14 ± 2.3	14 ± 2.3	0
151	9 ± 1	10 ± 1	0
221	15	10 ± 1	0
226	14 ± 2.3	12 ± 2.3	0
227	10 ± 0.1	10 ± 10	0
229	16 ± 2.3	15 ± 2.3	0
234	12 ± 1	10 ± 10	0
266	7 ± 1	6 ± 1	0
BAL 02 Costa de Hermosillo (primavera-verano)			
110	10 ± 0	7 ± 0	0
145	10 ± 0	10 ± 0.1	0
BAL 01 Guaymas (primavera- verano)			
239	15 ± 2.3	9 ± 1	0

Los resultados están representados como media ± desviación estándar de 3 réplicas.

Algunas bacteriocinas producidas por *L. graminis* son estables ante distintos factores físicos y químicos como: solventes, metales, temperaturas extremas e hidrólisis por enzimas proteolíticas como proteinasa K (Aguirre y col., 2016). Por otra parte, Zapata y col., (2009) reportaron la caracterización de la cepa de *Lactobacillus plantarum* LPBM10, aislada de leche fermentada, que presenta propiedades probióticas y es productora de bacteriocinas. El sobrenadante libre de células de LPBM10 presenta actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, presenta mayor actividad a pH ácido y su actividad no se ve afectada por la presencia de proteinasa K, ni por agentes quelantes y detergentes.

Como se mencionó anteriormente, las bacterias ácido lácticas T1OI 125, 151, 221, 226, 227, 229, 234, 266, T2PV 110 y 145 y T1PV 239, aisladas de tomate Saladette presentaron una tinción Gram positiva con catalasa y oxidasa negativas y susceptibilidad a proteasas. Dentro de los géneros de BAL asociados a los alimentos se encuentran: *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Pal Singh., 2018).

6.3 Estabilidad Térmica

Los compuestos de naturaleza proteínica con actividad antibacteriana producidos por los aislados T1OI 125, 221, 226, 151, 227, 229 y 234 después de su exposición a los tratamientos térmicos, mantuvieron una actividad inhibitoria máxima del 80% y una mínima del 40% inversamente proporcional a la temperatura de la evaluación. En la Figura 2 se observa en el eje de las Y el porcentaje de inhibición que mantuvieron los SLC después de ser sometidas a 30 55, 65 80, 100 °C durante 30 min, así como a un ciclo de autoclave (121°C / 15psi) por 15 min. Se observó un efecto antagonista frente a *Listeria monocytogenes*, es importante señalar que se logró mantener su actividad inhibitoria en un 50% después de haber sido sometidas a 100 y 121 °C.

No obstante, los criterios de termoestabilidad de las bacteriocinas son difíciles de definir, pues dependen de su purificación y de factores tales como pH, fuerza iónica y presencia de moléculas protectoras (Moreira, 1993). Se descartaron los aislados T2PV 110 y 145 y T1PV 239 debido a que perdieron su efecto antagonista frente a *Listeria monocytogenes* después de ser sometidos a los tratamientos térmicos.

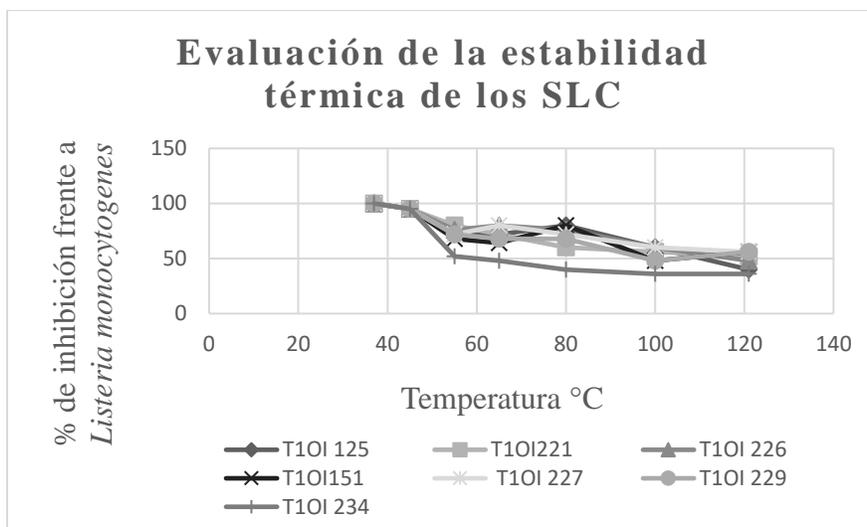


Figura 2. Estabilidad térmica de la actividad antibacteriana de los SLC de los aislados bacterianos T10I 125, 221 226 151, 227, 229 y 234 frente a *Listeria monocytogenes*

Generalmente las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son termo resistentes, esto indica que su actividad puede recaer en estructuras pequeñas y poco complejas, con una alta probabilidad de carecer de una estructura terciaria (Sen y Nilsson 2012; Moreira., 1993).

Al-Holy y col., 2012 demostraron que el tratamiento con calor más la adición de nisina presentó un efecto sinérgico contra *Listeria innocua*, logrando eliminarla por completo después de seis días de almacenamiento. La resistencia térmica es una característica que hace de las bacteriocinas compuestos con potencial aplicación para la industria alimentaria como bioconservadores (Heredia y col., 2015),

6.4 Identificación por VITEK® 2 Compact

El análisis de las pruebas permitió identificar los 7 aislados antagonistas; 2 pertenecientes a *Pediococcus pentosaceus*, 1 perteneciente a *Pediococcus acidilactici*, 4 pertenecientes a *Enterococcus faecium* y (Cuadro 8). Se descartaron aquellos géneros no asociados a bacterias ácido lácticas.

Vallejo y col., 2013 lograron la caracterización parcial de enterocinas producidas por una cepa

de *Enterococcus faecium* aislada de leche ovina, *E. faecium* Tw6 mostró la mayor actividad antimicrobiana entre las cepas estudiadas frente a *Listeria innocua* ATCC 33090. Dentro de las BAL el género *Enterococcus*, se caracteriza por la alta producción de bacteriocinas, conocidas en forma general como enterocinas estos péptidos exhiben actividad antimicrobiana frente a especies de bacterias Gram positivas relacionadas, tanto de patógenas como de contaminantes de alimentos (Foulquié Moreno y col., 2001 y Ghrairi y col., 2008). Los resultados de la actividad antagónica obtenidos con los aislados bacterianos T1OI 151, 221, 229 y 234 son bastantes prometedores, ya que la actividad antagonista se presentó contra *Listeria monocytogenes* y fueron identificados dentro del género *Enterococcus*.

Por otra parte, González y col 2021, aislaron e identificaron a *Pediococcus pentosaceus* CM175, una BAL epífita de melón cantaloupe, que inhibe el crecimiento de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 y *Listeria monocytogenes*.

Cuadro 8. Identificación por colorimetría avanzada VITEK® 2 Compact

<i>Pediococcus pentosaceus</i>		<i>Pediococcus acidilactici</i>		<i>Enterococcus faecium</i>	
T1OI	125	T1OI	226	T1OI	151
T1OI	227			T1OI	221
				T1OI	229
				T1OI	234

6.5. Identificación de los Aislados de BAL por Técnicas Moleculares

Los aislados bacterianos T1OI 125, 221, 226, 151, 227, 229 y 234 fueron utilizados para construir un árbol filogenético con base en las secuencias del gen 16S ribosomal. El gen 16S ARNr se amplificó por PCR utilizando iniciadores específicos (Figura 4). Los productos de amplificación de aproximadamente 700 pb fueron secuenciados por MacroGen Inc., y las secuencias de los aislados bacterianos fueron analizadas y comparadas con las secuencias en la base de datos del GenBank para asignar su identidad (Figura 5).

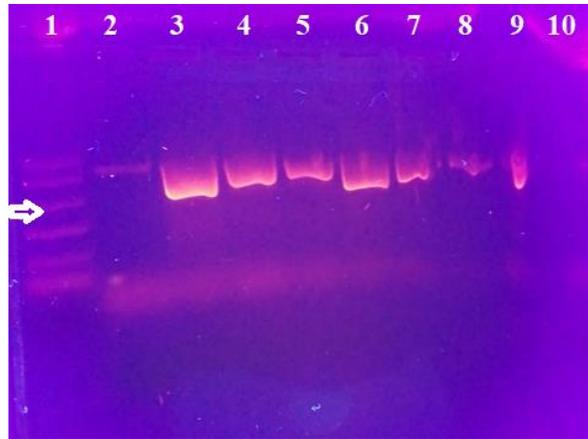


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR-ADN de los aislados bacterianos. 1= Marcador de peso molecular, 2= aislado T1OI 227, 3= aislado T1OI 226, 4= aislado T1OI 125, 5= aislado T1OI 221, 6= aislado T1OI 234, 7= aislado T1OI 229, 8= aislado T1OI 151, 9= Control - , 10= Control +

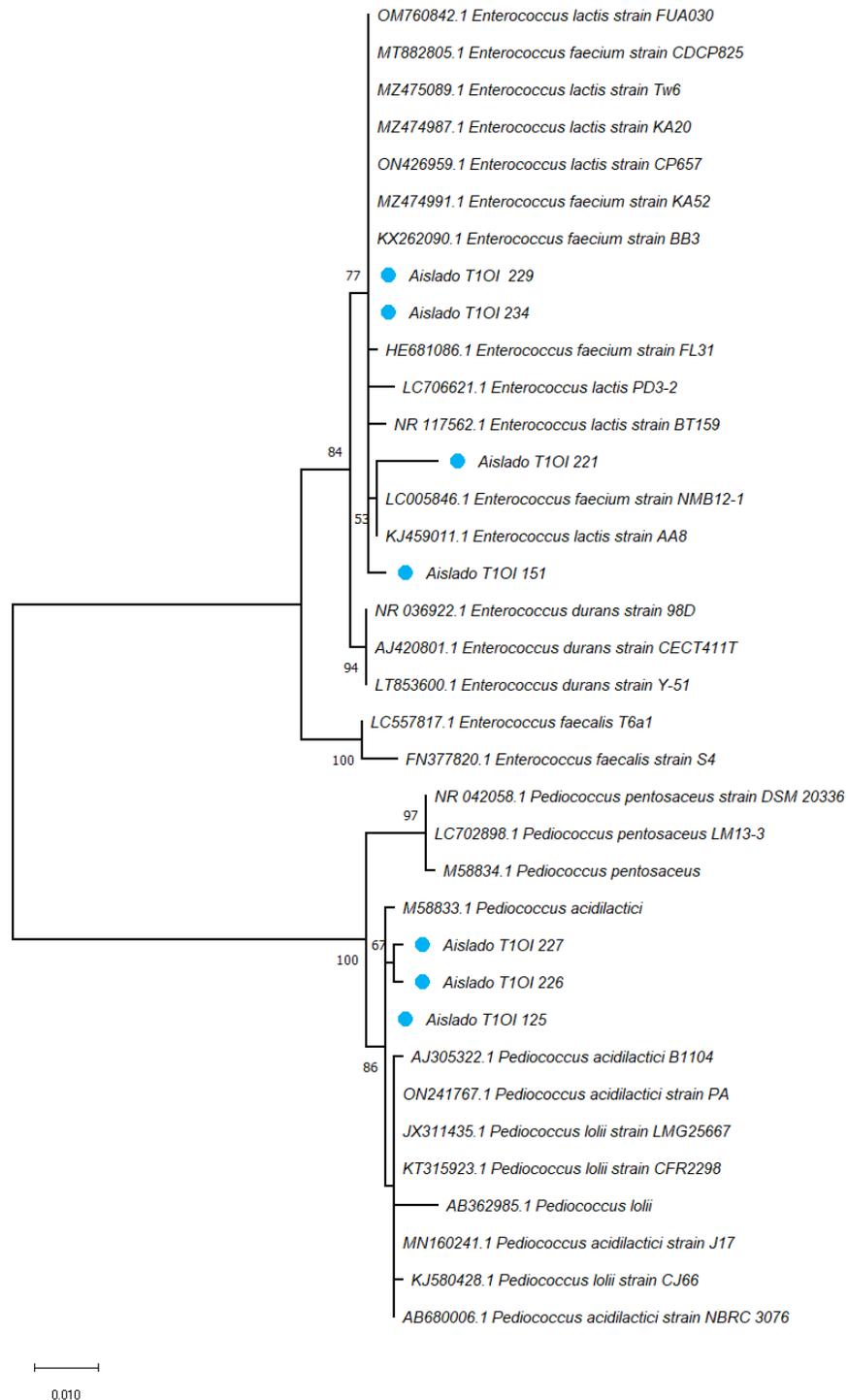


Figura 4. Árbol filogenético de los productos de amplificación de PCR del gen 16S ARN ribosomal.

El análisis filogenético a partir del gen 16S ARNr de los aislados bacterianos permitió corroborar el género de las BAL, separando los aislados en dos principales ramas correspondientes a los

géneros *Enterococcus spp* (T1OI 229, 234, 151 y 221) y *Pediococcus spp* (T1OI 226, 227 y 125), de acuerdo con la alta identidad de las secuencias de estos aislados con las reportadas para estas especies en el banco de genes del NCBI. Pero no fue adecuado para conocer las especies, las cuales, podrían tratarse de *E. faecium* o *E. lactis* y *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* o *P. lolli*, (Cuadro 9). Se ha reportado el aislamiento de cepas de *P. pentosaceus* en superficies de diferentes frutos y vegetales como ejote, tomates, pepinos, alcaparras, cerezas y repollo (Di Cagno y col., 2013). Debido a lo anterior, se llevó a cabo una fermentación diferencial de azúcares específicos (Doi y col., 2009), a pesar de que las diferentes especies de *Pediococcus* tienen características muy conservadas, estas difieren en la capacidad de metabolizar diferentes carbohidratos. Estas particularidades metabólicas se deben a la presencia o ausencia de algunas enzimas del grupo pectolíticas y/o pectinasas (Davila-Zambrano, 1996).

Los aislados T1OI 125 y 227 del presente estudio mostraron un comportamiento idéntico en la capacidad fermentativa de sacarosa, trehalosa y ramnosa (Cuadro 10), el cual coincide al reportado para *P. pentosaceus* y difiere a los de *P. acidilactici* y *P. lolli* (Doi y col., 2009), por lo que se asume que ambos aislados corresponden al microorganismo del género y especie *Pediococcus pentosaceus*. Por otra parte, el aislado bacteriano T1OI 226 presentó la capacidad de fermentar la sacarosa, trehalosa y ramnosa por lo que podría tratarse de otra especie cuyo perfil de fermentación selectiva de carbohidratos aún no haya sido caracterizado o de una posible transferencia horizontal de genes que haya permitido al aislado 226 tener una capacidad fermentativa inusual.

Cuadro 9. Identificación VITEK® 2 V/s. identificación por Técnicas Moleculares

Identificación por colorimetría avanzada VITEK® 2 Compact					
<i>Pediococcus pentosaceus</i>		<i>Pediococcus acidilactici</i>		<i>Enterococcus faecium</i>	
T1OI	125	T1OI	226	T1OI	151
T1OI	227			T1OI	221
				T1OI	229
				T1OI	234
Identificación de los aislados de BAL por Técnicas Moleculares					
<i>Pediococcus spp.</i>			<i>Enterococcus spp.</i>		
T1OI	125	T1OI	151		
T1OI	226	T1OI	221		
T1OI	227	T1OI	229		
		T1OI	234		

Cuadro 10. Fermentación diferencial de azúcares entre cepas de *Pediococcus* epífitas de tomate Saladette.

Azúcar/Bacteria	T1OI 125	T1OI 226	T1OI 227	<i>P. pentosaceus</i> CM 175 control	<i>P. lolii</i> sp	<i>P. acidilactici</i>
Sacarosa	+	+	+	+	-	-
Trehalosa	+	+	+	+	-	+
Ramnosa	-	+	-	-	+	-

+: Positivo, -: Negativo, a las fermentaciones de cada azúcar

Los resultados de la actividad antagónica obtenidos con los aislados bacterianos T1OI 151, 221, 229 y 234 son bastantes prometedores, ya que la actividad antagonista se presentó contra *Listeria monocytogenes* y fueron identificados dentro del género *Enterococcus*. En la actualidad, la clasificación más aceptada es la publicada por Franz y col., 2007, donde las enterocinas se agrupan en 4 clases principales. Las enterocinas de clase II son las más frecuentemente halladas en cepas de enterococos y se dividen en 2 subclases: las enterocinas relacionadas con la pediocina y las que se sintetizan sin péptido líder.

Por otra parte, los aislados bacterianos T1OI 125 y 227 identificados como *Pediococcus pentosaceus*, también presentaron actividad antagonista contra *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, existen pocos estudios de obtención y caracterización de péptidos antimicrobianos de BAL de vegetales.

6.6 Evaluación del efecto antagónico del SLC contra *Listeria monocytogenes* y cuantificación de proteína

Con el fin de comprobar la actividad antagonista de los SLC y su efecto sobre los parámetros de crecimiento de *Listeria monocytogenes*, se realizó la prueba de inhibición de crecimiento en microplaca de los SLC de *Pediococcus pentosaceus* (T1OI 125, 221) y *Enterococcus faecium* (T1OI 151, 227, 229 y 234). En la figura 3, se observa el efecto de los SLC sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, las líneas con rombos representan las curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* sin la adición de los SLC, mientras que las otras líneas representan las curvas de

crecimiento con 15, 30 y 45 μL del SLC. En el Cuadro 11 se observó que a una concentración ≥ 0.6 μg de proteína/ml son suficientes para disminuir la DO máx, incrementar el efecto antagonista conforme se aumenta la concentración de los SLC (fase lag) y disminuir la tasa de crecimiento de *Listeria monocytogenes* hasta 5 horas.

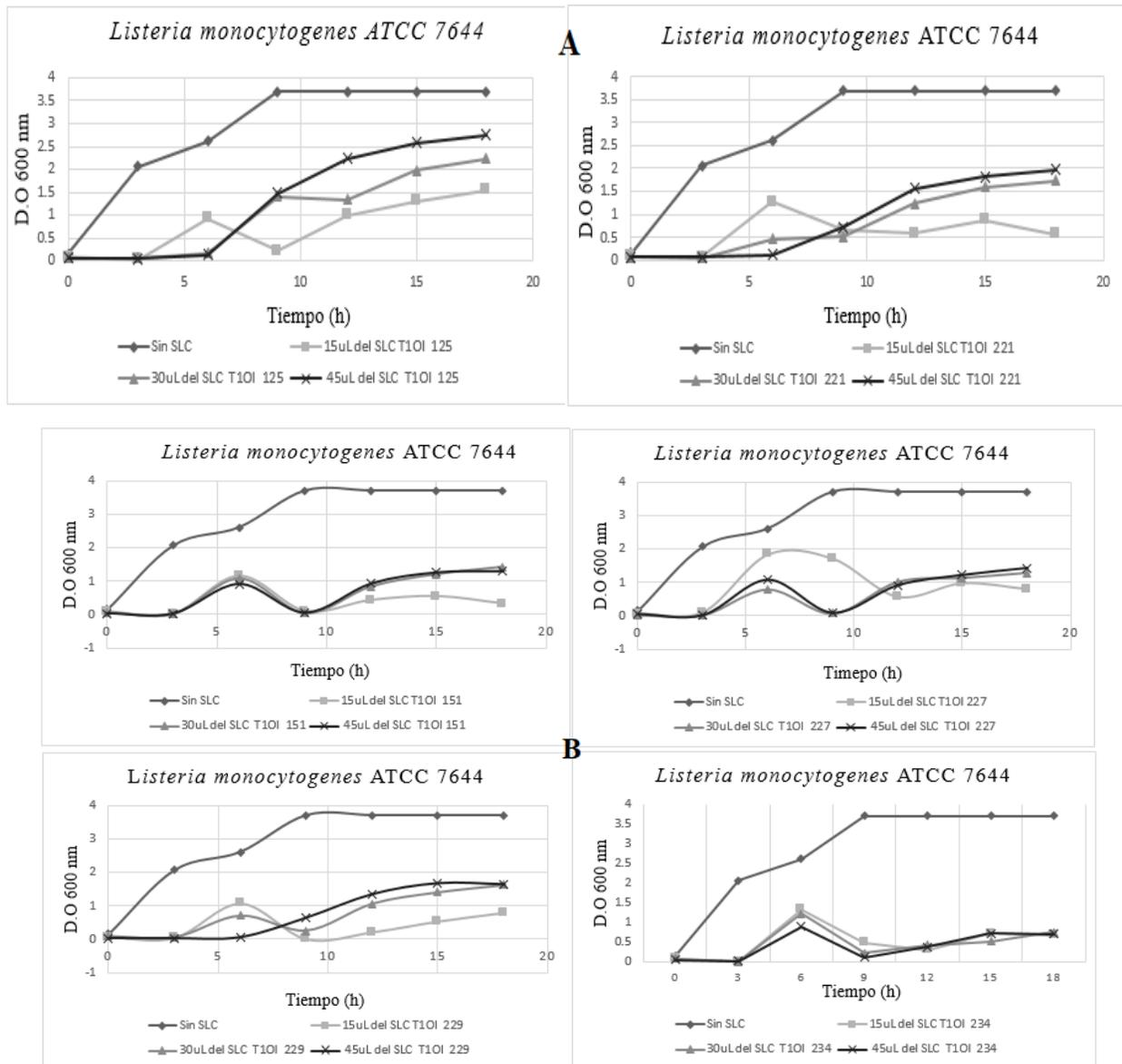


Figura 5. Inhibición del crecimiento de *Listeria monocytogenes* en microplaca. A) *Pediococcus pentosaceus* (T1OI 125, 221), B) *Enterococcus faecium* (T1OI 151, 227, 229 y 234)

Cuadro 11. Valores cinéticos obtenidos de la curva de crecimiento de las bacterias patógenas tratadas con 15 μ L de SLC

Muestra	Fase Lag (min)	Tasa de crecimiento (h^{-1})	D.O. max (λ 600 nm)	μg de proteína/ml
<i>L. monocytogenes</i>	58.6	1.69	3.696	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i> T10I 221	360	0.37	1.274	0.8
<i>Pediococcus pentosaceus</i> T10I 125	540	0.371	1.543	0.9
<i>Enterococcus faecium</i> T10I 151	540	0.371	1.142	0.9
<i>Enterococcus faecium</i> T10I 227	360	0.477	1.84	0.6
<i>Enterococcus faecium</i> T10I 229	360	0.701	1.069	0.6
<i>Enterococcus faecium</i> T10I 234	360	0.919	1.338	0.6

7. CONCLUSIÓN

Los aislados de bacterias ácido lácticas de tomate Saladette, T1OI 125, 221, 151, 227, 229 y 234, presentaron actividad antagonista célula-célula frente a *Listeria monocytogenes*. Además, se identificaron siete aislados de BAL de los géneros *Pediococcus* y *Enterococcus* capaces de producir péptidos antimicrobianos y/o bacteriocinas que inhiben el crecimiento de este patógeno indicador. Lo anterior indica que el tomate Saladette es una fuente de microorganismos con potencial biotecnológico para las áreas de tecnología y microbiología de los alimentos.

8. RECOMEDACIONES

Existen pocos estudios de obtención y caracterización de péptidos antimicrobianos de BAL de vegetales. Sin embargo, con la finalidad de maximizar el potencial de los antagonistas microbianos, aún falta profundizar en aspectos tales como el modo de acción, su compatibilidad con las prácticas comerciales poscosecha y el efecto en la fisiología del hospedero. (Bautista, 2006).

9. REFERENCIAS

- Aguilar, C. (2016). Estimulación con oligosacáridos de la capacidad antagónica de bacterias ácido lácticas epífitas de melón cantaloupe contra *Salmonella Typhimurium* (Tesis Maestría en Ciencias). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. México.
- Alegre Vilas, I., Abadias Seró, M., Colás Medà, P., Collazo Cordero, C., & Viñas Almenar, I. (2020). Bioconservación frente a patógenos de transmisión alimentaria en frutas y hortalizas mínimamente procesadas. *Arbor*, 196(795), a543. <https://doi.org/10.3989/arbor.2020.795n1007>
- Alvarez-Siero, P., Montalbán-López, M., Mu, D., Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology Biotechnology*. 100, 2939-2951.
- Andrews John H, Berbee Flora. M. and Nordheim Erik V., Microbial Antagonism to the Imperfect Stage of the Apple Scab Pathogen, *Venturia inaequalis*, *Phytopathology* 73:228-234, 1983
- Atlas, R.M. y Bartha, R., *Ecología microbiana y Microbiología ambiental* Pearson Educación, S. A. Madrid, 4ta edición, 2002
- Avendaño Belem Dolores Ruiz Rita Schwentesius Rindermann Sonia Lugo Morones La Inocuidad Alimentaria en la Exportación De Hortalizas Mexicanas a Estados Unidos, enero de 2007 Comercio Exterior, VOL. 57, NÚM. 1, Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. *Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker*, 139, 1-66.
- Balciunas, E. M., Castillo Martinez, F. A., Dimitrov Todorov, S., Gombossy de Melo Franco, B. D., Converti, A., Pinheiro de Souza Oliveira, R. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*. 32, 134-142.
- Bemena LD, Mohamed LA, Fernandes AM, Lee BH (2014) Applications of bacteriocins in food, livestock health and medicine. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3: 924-949.
- Barreto, Marlen, Castillo-Ruiz, Mario, & Retamal, Patricio. (2016). *Salmonella enterica*: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Revista chilena de infectología*, 33(5), 547-557. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000500010>
- Bautista Baños S., El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagónicos, *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, Julio, vol.8, número 001, Hermosillo Sonora, México, 2006.
- Bavaro MF. 2012. *E. coli* O157: H7 and other toxigenic strains: the curse of global food distribution. *Current Gastroenterology Reports* 14:317-323. <http://dx.doi.org/10.1007/s11894-012-0264-6>
- Buchanan R.L., Gorris L.G.M., Hayman M.M., Jackson T.C., Whiting R.C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*. 2017, 75, 1-13.
- Callejo 2012 Reported Foodborne Outbreaks Due to Fresh Produce in the United States and

- European Union: Trends and Causes Raquel M. Callejo'n,1 M. Isabel Rodríguez-Naranjo,1 Carr F. J., Chill D. y Maida N. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28(4): 281-370.
- Castillo A., Martínez-Tellez M., y Rodríguez-García M. 2009. Melons. In C. P. Gerba, K. R. Matthews, G. M. Sapers (Eds.), *The produce contamination problem: Causes and solutions* (2a. ed., pp. 208–229). California, EEUU.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2017a, *Seguridad alimentaria*. <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/keep-food-safe-es.html>
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention, 2018b. Lista de inversiones seleccionadas en brotes de transmisión alimentaria en varios estados. Disponible en <https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreaks-list.html>.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2021c. Obtenido de: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/>
- Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Reviews*, 3(3), 269-280
- Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. 2005 Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* 3: 777-788
- Chen, C. M., Sebranek, J. G., Dickson, J. S., Mendonca, A. F. (2004). Combining pediocin with post-packaging irradiation for control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters. *Journal of Food Protection*. 67, 1866–1875.
- Cruz-Guerrero, A., Hernández-Sánchez, H., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M. and Figueroa-González, I. 2014. Commercial probiotic bacteria and prebiotic carbohydrates: a fundamental study on prebiotics uptake, antimicrobials production and inhibition of pathogens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(11), 2246-2252.
- De la Fuente Norma Margarita Salcido y José Eleazar Barboza Corona Inocuidad y bioconservación de alimentos, 2010
- De Lima Marques, J., Funck, G. D., da Silva Dannenberg, G., dos Santos Cruxen, C. E., El Halal, S. L. M., Dias, A. R. G., Fiorentini, Â. M. and da Silva, W. P. 2017. Bacteriocin-like substances of *Lactobacillus curvatus* P99: characterization and application in biodegradable films for control of *Listeria monocytogenes* in cheese. *Food Microbiology*, 63, 159-163.
- Diep, D. B., Godager, L., Brede, D. and Nes, I. F. 2006. Data mining and characterization of a novel pediocin-like bacteriocin system from the genome of *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745. *Microbiology*, 152(6), 1649-1659.
- Doi K., Nishizaki Y., Fujino Y., Ohshima T., Ohmomo S. y Ogata S. 2009 *Pediococcus lolii* sp. nov., isolated from ryegrass silage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59 (5): 1007-1010.
- EFSA, ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*. 2015, 13(1), 3991.

- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016).
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, (2020). Ayuda Humanitaria de Asistencia y Recuperación para Comunidades Afectadas por la Sequía en el Chaco Bolivia. [fecha de Consulta 15 de febrero de 2021]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/as972s/as972s.pdf>
- FDA. 2020a. Food & Drug Administration. Outbreaks of Foodborne Illness. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/recalls-outbreaks-emergencies/outbreaks-foodborne-illness> FDA. 2020b. Full Text of the Food Safety Modernization Act (FSMA). Disponible en: <https://www.fda.gov/food/food-safety-modernization-act-fsma/full-text-food-safety-modernization-act-fsma>. Último acceso el 14 de enero del 2021.
- Foulquié, Moreno., Callewaert, R., De Vuyst, L. (2001). Isolation of bacteriocins through expanded bed adsorption using a hydrophobic interaction medium. *Bioseparation*, 10(1-3): 45-50.
- Foster, J.W., and Spector, M.P. 1995. How Salmonella survives against the odds. *Ann. Rev. Microbiol.* 49, 145–174.
- Gardener y Fravel, *Ecología microbiana y Microbiología ambiental* Pearson Educación, S. A. Madrid, 4ta edición, 2002.
- González-Pérez CJ, Aispuro-Hernández E, Vargas-Arispuro I and Martínez-Téllez MA Induction of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria; a Strategy to Improve the Safety of Fresh Fruits and Vegetables Article · March 2018 DOI: 10.19080/ARTOAJ.2018.14.555927
- Gutierrez Ramírez, Luz Adriana, & Montoya Campuzano, Olga Ines, & Ruiz Villadiego, Orlando Simon (2005). Evaluación del potencial bactericida de los extractos de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento in vitro de *E. coli*, *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes*. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 36. [fecha de Consulta 7 de octubre de 2021]. ISSN: 0253-5688. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181220525062>
- Hall, B. G., Acar, H., Nandipati, A. and Barlow, M. 2014. Growth rates made easy. *Molecular Biology and Evolution*, 31(1), 232-238.
- Hansen. SJ, Jenabian MS, 2005. Molecular serotyping of Salmonella; identification of the phase 1 H antigen based partial sequencing of the fliC gene. Pag. 113: 340-348.
- Heredia-Castro Priscilia Y, Hernández-Mendoza Adrian, González-Córdova Aarón F., Vallejo-Cordoba Belinda , 2017. Bacteriocinas De Bacterias Ácido Lácticas: Mecanismos De Acción Y Actividad Antimicrobiana Contra Patógenos En Quesos *Interciencia*, vol. 42, núm. 6, pp. 340-346
- Hernandez, D., Cardell, E. and Zarate, V. 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology*, 99(1), 77-84.
- Inglis RF, Bayramoglu B, Gillor O, Ackermann M. The role of bacteriocins as selfish genetic elements. *Biol Lett.* 2013 Apr 24;9(3):20121173. doi: 10.1098/rsbl.2012.1173. PMID: 23616642; PMCID: PMC3645024.
- Kong, S. y Davidson, A.J. (1980). The role of the interactions between O₂, H₂O₂, OH. and *O₂ in the free radical damage to biological systems. *Journal of Biological Chemistry*, 204, 18-29.

- Lindgren, S.E., y Dobrogosz, W.J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS microbiology reviews*, 7(1-2), 149-163.
- Lomonaco S., Nucera D., Filipello V. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infection, Genetics, and Evolution*. 2015, 35, 172-183.
- Martínez-Téllez M.A., Vargas-Arispuro I., Silva-Bielenberg H.K., Espinoza- Medina I.E., Rodríguez-Leyva, F.J. y González-Aguilar, G. 2007. Buenas prácticas en la producción de alimentos, Editorial Trillas. primera edición. México, D.F.460p.
- Molinos A, Abriouel H, Lucas López R, Ben Omar N, Valdivia E, Gálvez A. Inhibition of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* in raw vegetables by application of washing solutions containing enterocin AS-48 alone and in combination with other antimicrobials. *Food Microbiol*. 2008. doi: 10.1016/j.fm.2008.05.001. Epub 2008 May 13. PMID: 18620967.
- Mondragón Preciado, Guadalupe, & EscalanteMinakata, Pilar, & Osuna Castro, Juan Alberto, & Ibarra Junquera, Vrani, & Morlett Chávez, Jesús Antonio, & Aguilar González, Cristóbal Noé, & Rodríguez Herrera, Raúl 2013. Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*, [fecha de Consulta 15 de febrero de 2021]. ISSN: 1665-4412. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=674/67430113008>
- Monroy, M., Castro, T., Fernández, F. J., Mayorga, L. (2009). Revisión Bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS*, 73: 63-72.
- Moreira, W.L. (1993). Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producidas por *Pediococcus* sp 347, de origen cárnico [Tesis Ph.D]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 70 p. Disponible en: biblioteca.universia.net.
- Nes IF, Yoon SS, Diep DB (2007) Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Sci. Biotechnol*. 16: 675-690.
- Nishie M, Nagao J, Sonomoto K (2012) Antibacterial peptides “bacteriocins”: An overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci*. 17: 1-16.
- OMS. Organización Mundial de la Salud. Inocuidad de los alimentos., 2020 <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- OMS. Organización Mundial de la Salud. Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) en la Región de las Américas 2015 https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/amro_es.pdf?ua=1
- Ouwehand, A.C. (1998). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen, S. and Von Wright A. (Ed.), *lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects*, 2 edition (edited by). Marcel nd Dekker Inc, New York, 139-159.
- Pal Singh, V. (2018). Recent approaches in food bio-preservation- a review. *Open Veterinary Journal*. 8 (1), 104-111.
- Piard, J.C., y Desmazeaud, M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Le lait*, 71(5), 525-541.
- Ramírez J. C. R., Ulloa P. R., Velázquez M. Y., González J. A. U., y Romero F. A. 2011. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Disponible en <http://dspace.uan.mx:8080/jspui/handle/123456789/436>.

- Reineke K, Sevenich R, Hertwig C, Janßen T, Fröhling A, Knorr D, Wieler LH and Schlüter O. 2015. Comparative study on the high pressure inactivation behavior of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104: H4 and O157: H7 outbreak strains and a non-pathogenic surrogate. *Food Microbiology* 46:184-194. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.017>
- Riley LW, Remis RS and Helgerson D. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *The New England Journal of Medicine* 308:681-685. <http://dx.doi.org/10.1056/nejm198303243081203>
- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2021. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/direccion-general-de-inocuidad-agroalimentaria-acuicola-y-pesquera>
- Seija V. 2002. Cocos Gram positivos aspectos prácticos. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2019.pdf>.
- Snyder AB, Worobo RW (2014) Química y caracterización genética de bacteriocinas: péptidos antimicrobianos para la seguridad alimentaria. *J Sci Food Agriculture.*, 2014.
- Snyder, A. B. and Worobo, R. W. 2014. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(1), 28-44. doi: 10.1002/jsfa.6293
- Torres Armendáriz, V., Manjarrez Domínguez, C. B., Acosta-Muñiz, C. H., Guerrero-Prieto, V. M., Parra-Quezada, R. Á., Noriega Orozco, L. O., & Ávila-Quezada, G.D.. (2016). Interacciones entre *Escherichia coli* O157:H7 y plantas comestibles. ¿Se han desarrollado mecanismos de internalización bacteriana? *Revista mexicana de fitopatología*, 34(1), 64-83. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.15074>
- Todorov SD, Ho P, Vaz-Velho M, Dicks LM. Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. *Meat Sci.* 2010 Mar;84(3):334-43. doi: 10.1016/j.meatsci.2009.08.053. Epub 2009 Sep 6. PMID: 20374794.
- Vallejo, Marisol, Ledesma, Pablo y Marguet, Emilio Rogelio. (2013). Caracterización parcial de enterocinas producidas por una cepa de *Enterococcus faecium* aislada de leche de oveja. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* , 33 (1), 28-34. Recuperado el 31 de julio de 2022, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562013000100007&lng=es&tlng=es
- Vaillancourt, K., LeBel, G., Frenette, M., Fittipaldi, N., Gottschalk, M., and Grenier, D. 2015. Purification and characterization of suicin 65, a novel class I type B lantibiotic produced by *Streptococcus suis*. *PloS One*, 10(12), e0145854.
- Vásquez, S.M., Suárez, H., Zapata, B.S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(1): 64-71.
- Wadamori, Y., Gooneratne, R. and Hussain, M. A. 2017. Outbreaks and factors influencing microbiological contamination of fresh produce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(5), 1396-1403.
- Wellinghausen N. *Listeria y Erysipelotrix*. En: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen J H,

Landry M L, Warnock D W. (eds). Manual of Clinical Microbiology, 10th edition. 2011. ASM, Washington, DC, pág. 403-12.

Yusuf MA (2013) Lactic Acid Bacteria: Bacteriocin producer: A mini review. IOSR J. Pharm. 3: 44-50

Zacharof MP, Lovitt RW (2012) Bacteriocins produced by Lactic Acid Bacteria. A review article. *APCBEE Procedia* 2: 50-56.

Zapata, Sandra, MUÑOZ, Juliana, RUIZ, Orlando S, MONTOYA, Olga I, & GUTIÉRREZ, Pablo A. (2009). Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. *Vitae*, 16(1), 75-82.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012140042009000100009&lng=en&tlng=es.

10. ANEXOS

10.1. Anexo 1: Protocolo de Cuantificación de Proteínas

thermoscientific

USER GUIDE

Pierce™ BCA Protein Assay Kit

Catalog Numbers 23225 and 23227

Doc. Part No. 2161296 Pub. No. MAN0011430 Rev. B.0

 **WARNING!** Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves. Safety Data Sheets (SDSs) are available from thermofisher.com/support.

Introduction

The Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit is a detergent-compatible formulation based on bicinchoninic acid (BCA) for the colorimetric detection and quantitation of total protein. This method combines the well-known reduction of Cu^{2+} to Cu^{+} by protein in an alkaline medium (the biuret reaction) with the highly sensitive and selective colorimetric detection of the cuprous cation (Cu^{+}) using a unique reagent containing bicinchoninic acid (see reference 1 on page 4). The purple-colored reaction product of this assay is formed by the chelation of two molecules of BCA with one cuprous ion. This water-soluble complex exhibits a strong absorbance at 562 nm that is nearly linear with increasing protein concentrations over a broad working range (20–2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The BCA method is not a true end-point method; that is, the final color continues to develop. However, following incubation, the rate of continued color development is sufficiently slow to allow large numbers of samples to be assayed together.

The macromolecular structure of protein, the number of peptide bonds and the presence of four particular amino acids (cysteine, cystine, tryptophan and tyrosine) are reported to be responsible for color formation with BCA (see reference 2 on page 4). Studies with di-, tri- and tetrapeptides suggest that the extent of color formation caused by more than the mere sum of individual color-producing functional groups (see reference 2 on page 4). Accordingly, protein concentrations generally are determined and reported with reference to standards of a common protein such as bovine serum albumin (BSA). A series of dilutions of known concentration are prepared from the protein and assayed alongside the unknowns before the concentration of each unknown is determined based on the standard curve. If precise quantitation of an unknown protein is

required, it is advisable to select a protein standard that is similar in quality to the unknown; for example, a bovine gamma globulin (BGG) standard (see "Related products" on page 3) may be used when assaying immunoglobulin samples.

Two assay procedures are presented. Of these, the Test Tube Procedure requires a larger volume (0.1 mL) of protein sample; however, because it uses a sample to working reagent ratio of 1:20 (v/v), the effect of interfering substances is minimized. The Microplate Procedure affords the sample handling ease of a microplate and requires a smaller volume (10–25 μL) of protein sample; however, because the sample to working reagent ratio is 1:8 (v/v), it offers less flexibility in overcoming interfering substance concentrations and obtaining low levels of detection.

Note: For peptide sample concentration measurements, use the Thermo Scientific™ Pierce™ Quantitative Fluorometric Peptide Assay or the Pierce™ Quantitative Colorimetric Peptide Assay Kit (see Related Thermo Scientific™ Products).

Preparation of standards and working reagent (required for both assay procedures)

Preparation of diluted albumin (BSA) standards

Dilute the contents of one Albumin Standard (BSA) ampule into several clean vials, preferably using the same diluent as the samples.

Use the following table as a guide to prepare a set of protein standards. Each 1 mL ampule of 2 mg/mL Albumin Standard is sufficient to prepare a set of diluted standards for either working range suggested in the table. There will be sufficient volume for three replications of each diluted standard.

Table 1 Preparation of diluted albumin (BSA) standards

Dilution Scheme for Standard Test Tube Protocol and Microplate Procedure (Working Range = 20–2,000 µg/mL)			
Vial	Volume of Diluent (µL)	Volume and Source of BSA (µL)	Final BSA Concentration (µg/mL)
A	0	300 of Stock	2000
B	125	375 of Stock	1500
C	325	325 of Stock	1000
D	175	175 of vial B dilution	750
E	325	325 of vial C dilution	500
F	325	325 of vial E dilution	250
G	325	325 of vial F dilution	125
H	400	100 of vial G dilution	25
I	400	0	0 = Blank

Dilution Scheme for Enhanced Test Tube Protocol (Working Range = 5–250 µg/mL)			
Vial	Volume of Diluent (µL)	Volume and Source of BSA (µL)	Final BSA Concentration (µg/mL)
A	700	100 of Stock	250
B	400	400 of vial A dilution	125
C	450	300 of vial B dilution	50
D	400	400 of vial C dilution	25
E	400	100 of vial D dilution	5
F	400	0	0 = Blank

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

30 January 2020



Preparation of the BCA working reagent (WR)

- Use the following formula to determine the total volume of WR required:
 $(\# \text{ standards} + \# \text{ unknowns}) \times (\# \text{ replicates}) \times (\text{volume of WR per sample}) = \text{total volume WR required}$
 Example: for the standard test-tube procedure with 3 unknowns and 2 replicates of each sample:
 $(9 \text{ standards} + 3 \text{ unknowns}) \times (2 \text{ replicates}) \times (2 \text{ mL}) = 48 \text{ mL WR required}$
Note: 2.0 mL of the WR is required for each sample in the test-tube procedure, while only 200 µL of WR reagent is required for each sample in the microplate procedure.
- Prepare WR by mixing 50 parts of BCA Reagent A with 1 part of BCA Reagent B (50:1, Reagent A:B). For the above example, combine 50 mL of Reagent A with 1 mL of Reagent B.
Note: When Reagent B is first added to Reagent A, turbidity is observed that quickly disappears upon mixing to yield a clear, green WR. Prepare sufficient volume of WR based on the number of samples to be assayed. The WR is stable for several days when stored in a closed container at room temperature (RT).

Procedure summary (test-tube procedure, standard protocol)

