



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

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA
BACTERIOCINA PRODUCIDA POR *Pediococcus pentosaceus*
CM175 EPÍFITA DE MELÓN CANTALOUPE**

Por:

Cristóbal Joel González Pérez

TESIS APROBADA POR LA

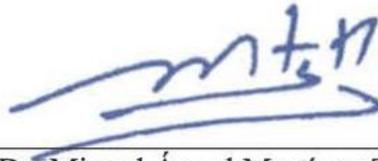
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Cristóbal Joel González Pérez, lo han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez
Director de tesis



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



Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala
Integrante del comité de tesis



Dr. Adrián Hernández Mendoza
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Purificación y Caracterización de una Bacteriocina Producida por *Pediococcus pentosaceus* CM175 Epífita de Melón Cantaloupe” 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 del autor Cristóbal Joel González Pérez, 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 manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

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


Dr. Pablo Wong Gonzalez
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado 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 alumno y brindarme su apoyo en cada etapa durante toda mi estancia.

Al proyecto de ciencia de frontera FON.INST/30/2017, número de proyecto 4325 “Tecnología para la reducción de la contaminación biológica e incremento de vida de anaquel de frutas y hortalizas” por financiar la presente investigación.

A la Coordinación de Programas Académicos por el apoyo proporcionado para la asistencia y participación en el “XX Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos” y “XXXV Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de Alimentos” llevada a cabo en Nuevo Vallarta, Nayarit, del 1 al 3 de Noviembre del 2018.

A mi Director de Tesis, Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez, por aceptarme como estudiante, como parte de su equipo de trabajo, por todo su apoyo académico y personal, por todas sus enseñanzas académicas y personales, por su paciencia, por su disposición en aceptar mis ideas, por sus consejos y por guiarme en todo este trayecto.

A los integrantes de mi comité de tesis, Dra. Irasema Vargas, Dr. Adrián Hernández y Dr. Fernando Ayala, por su apoyo otorgado en todo este proceso. Cada uno de ellos fue muy importante para que esta investigación llegará hasta su conclusión. Les agradezco su paciencia, sus consejos, sus recomendaciones, sus correcciones, sus palabras de aliento, su disposición para compartir sus conocimientos y por todo su tiempo otorgado para que este proyecto llegará hasta su finalización.

Al Laboratorio de Fisiología Vegetal-Molecular dirigido por el Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez y coordinado por Emmanuel Aispuro, Olivia Briseño y Francisco Soto. Cada uno de ellos es un pilar para que este laboratorio funcione de la manera en la que lo hace. Cada uno de ellos me deja conocimientos más allá de lo académico. Cada uno de ellos me mostró su apoyo académico y personal en cada una de las etapas buenas y no tan buenas que pase durante este trayecto. Agradezco haber pertenecido a este Gran Equipo de Trabajo.

Al Laboratorio de Ecología Química dirigido por la Dra. Irasema Vargas Arispuro y coordinado

por Consuelo Corrales (Cony) y Rosalva Pérez (Rosalvita), y tiempo atrás también por Socorro Vallejo (Soco), les agradezco toda su disposición por siempre ofrecerme su apoyo incondicional. Al Laboratorio de Tecnologías Emergentes dirigido por el Dr. Fernando Ayala Zavala y coordinado por Brenda Silva y Reynaldo Cruz, por todo su apoyo y prestamos de equipos durante mi proyecto de investigación.

Al Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del que forma parte el Dr. Adrián Hernández Mendoza y la Dra. Lourdes Santiago (Lulu), por su apoyo en la realización de la microscopía de fluorescencia, por su apoyo técnico y académico.

Al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión de la Universidad de Sonora dirigido por la Dra. Judith Tanori y coordinado por la Dra. Sarai Rochin, por todo su apoyo, sus consejos y enseñanza acerca de Microscopía Electrónica de Transmisión.

A la Dra. Carmen Contreras por todo su apoyo a lo largo de mi estancia en CIAD, por siempre estar dispuesta a dar un consejo o una charla, tanto académica como personal.

Al Dr. José Ángel Huerta por su apoyo, enseñanzas, consejos y su tiempo brindado durante este proyecto de investigación.

Al personal de la CPA por todo su invaluable apoyo durante mi estancia en CIAD: Argelia Marín Pacheco, Laura García Cruz, Verónica Araiza Sánchez, Aurora Vidal Martínez, Héctor Galindo Murrieta y el resto del personal que a veces no vemos pero que ocupamos de ellos en gran manera. Al personal de la CTAOV por todo su apoyo, por sus charlas, por sus convivios, por su compañerismo, por su disposición de ayudar sin esperar nada a cambio, de verdad creo que es de las mejores coordinaciones de CIAD.

A mis compañeras de laboratorio Armida, Albani y Yessica que fueron con las que más tiempo conviví, con las que las pláticas se hacían cotidianas y a veces los silencios, con las que compartí frustraciones y buenos momentos. A mis compañeros actuales Alex y Laura que les deseo la mayor de las suertes y éxito.

A mis amigos Deyanira, Yuri, Cynthia, Rocío y Víctor, por la amistad que inició en la Maestría y que espero continúe por siempre.

A mis examigos de la UNISON: Víctor, Astrid, María, Paola Armenta, Paola Rivera, Samuel, Rocío y Fernando Rocha, por siempre realizar las mejores posadas y discadas.

A los amigos de trabajo y posadas (Yuri, Deyanira, Armida, Coni, Cynthia, Deme, Emma, Gaby, Irlanda, Oli, Soco, Vane, Victor, Vale, Paola y Araceli) por su amistad, cariño y apoyo.

A mis amigos Melvin, Ale Preciado, Ale Amavizca, Ale Chavez, Nacho, Leo, Bruno, Alfredo, por sus risas, bromas, ocurrencias y por hacer olvidar malos ratos.

A mis suegros y cuñado quienes me han aceptado como un integrante de su familia, así como a toda la familia de mi esposa que me han recibido con los brazos abiertos y siempre me han hecho sentir su apoyo y cariño.

A mi hermano, su esposa y mis 3 hermosos sobrinos que me han apoyado, que han estado conmigo en buenos y no tan buenos momentos y me han echado porras.

A mis hermanitos, Michelle y Daniel que, aunque no tenemos mucho contacto siempre me demuestran su cariño y apoyo.

A mi padre quien me ha enseñado más de lo que él piensa, y que siempre ha estado para darme una palabra de apoyo y de cariño.

A mi madre quien siempre ha sido un ejemplo a seguir, y que gracias a ella soy lo que soy, siempre demostrándome su apoyo y su amor incondicional.

A toda mi familia porque cada uno de ellos me ha enseñado algo, y me ha hecho mejorar como persona abuelos, tíos y primos.

A la persona a la que debo agradecer estar en esta etapa, a la que debo agradecer por toda su paciencia, por todas sus enseñanzas, por siempre estar a mi lado, por todo su apoyo incondicional, aunque a veces no piense igual que yo, por todo su amor, por darme la dicha de ser padre, y sobre todo por ser mi esposa y mi compañera de toda una vida por delante, a Deyanira Fimbres.

A la personita que, sin saber, ha sido de las que más me ha motivado en esta etapa final, a la que veo y desaparecen mis frustraciones y mi cansancio, a la que me impulsa por dar lo máximo de mí, a la que amo desde el día que supe que venía a nuestras vidas, a Matías.

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

DEDICATORIA

A Dios, ya que por él somos lo que somos y estamos donde estamos, además por darme la fuerza, inteligencia, salud para realizar este proyecto, así como, por regalarme todos los momentos bellos y la valentía para sobrepasar todos los momentos malos de esta etapa tan importante.

A mi madre, ya que es un apoyo inmenso e invaluable y que esta sea una forma de decirle que su lucha y sus sacrificios no han sido en vano y que todo lo que ha sembrado algún día lo cosechará y con creces, cfD.

A mi padre, quien me ha apoyado incondicionalmente y quien también un día podrá cosechar todo lo bueno que ha sembrado.

A mi hermano y su familia, por su apoyo incondicional y para demostrarles que todos los momentos que no he estado a su lado hoy tienen una justificación.

A mi esposa, quien es la persona que me motivo para iniciar en la investigación, que poco a poco se ha convertido: en mi gran motor, en mi motivación, en la razón para llegar a ser más y más, en la persona que me ha colmado de dicha y felicidad, en la madre de mi hermoso y amado hijo, en la persona que no podría imaginarme mi futuro sin ella, en mi vida. Te amo Deyanira Fimbres!

A mi bebe, quien a pesar de ser una personita tan pequeña ha logrado despertar sentimientos tan enormes que a veces pudieran ser increíbles. Quien a pesar de su corta edad se ha convertido en una de mis mayores motivaciones, junto a su mamá, para superarme día a día y ser el mejor padre y su mejor ejemplo a seguir. Te amo Matías!

Y por último, a mi abuelo donde quiera que esté! Lo extrañamos!

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	7
CONTENIDO	8
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE CUADROS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
RESUMEN	14
ABSTRACT	16
1. INTRODUCCIÓN	18
2. ANTECEDENTES	20
2.1. Enfermedades Transmitidas por Alimentos.....	20
2.2. Microorganismos Causantes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos	21
2.3. Principales Alimentos Relacionados con Enfermedades Transmitidas por Alimentos.....	22
2.4. Brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos Causadas por Consumo de Frutas y Hortalizas	23
2.5. Fuentes de Contaminación de Frutas y Hortalizas.....	24
2.6. Estrategias para Combatir Enfermedades Transmitidas por Alimentos Relacionadas con Frutas y Hortalizas.....	25
2.7. Antagonismo de Bacterias Ácido Lácticas Epífitas de Hortalizas.....	26
2.8. Bacteriocinas Producidas por Bacterias Ácido Lácticas.....	29
2.8.1. Características de Bacteriocinas Producidas por Bacterias Ácido Lácticas.....	30
2.8.2. Clasificación de Bacteriocinas Producidas por Bacterias Ácido Lácticas.....	31
2.8.3. Modo de Acción de Bacteriocinas.....	32
2.9. Pregunta de Investigación.....	34
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVOS	36
4.1. Objetivo General.....	36
4.2. Objetivos Específicos.....	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS	37
5.1. Medios de Cultivo, Enzimas y Reactivos Utilizados.....	37
5.2. Cepas Bacterianas y Condiciones de Cultivo.....	37
5.3. Obtención del Sobrenadante Libre de Células de <i>Pediococcus pentosaceus</i> CM175.....	38

CONTENIDO (continuación)

5.4. Antagonismo del Sobrenadante Libre de Células Contra Bacterias Patógenas de Humanos.....	38
5.5. Parámetros Cinéticos de Inhibición de Crecimiento.....	39
5.6. Naturaleza del Compuesto Antagonista del Sobrenadante Libre de Células.....	40
5.7. Identificación de Genes Estructurales de Bacteriocinas.....	40
5.8. Purificación del Compuesto Tipo Bacteriocina.....	41
5.8.1. Cromatografía de Intercambio Catiónico y Separación de Proteínas por Tamaño.....	41
5.8.2. Cuantificación de Proteína.....	42
5.8.3. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	42
5.9. Pruebas de Estabilidad del Compuesto Tipo Bacteriocina: Temperatura, pH y Proteasas	42
5.9.1 Pruebas de Estabilidad a Diferente Temperatura.....	43
5.9.2 Prueba de Estabilidad a Diferente pH.....	43
5.9.3 Prueba de Estabilidad a Diferentes Proteasas.....	43
5.10. Efecto de Sustancia Inhibitoria Tipo Bacteriocina Sobre <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	44
5.10.1 Microscopía de Fluorescencia.....	44
5.10.2 Microscopía Electrónica de Transmisión.....	45
5.11 Identificación de la Sustancia Inhibitoria Tipo Bacteriocina Mediante Espectrometría de Masas.....	46
5.12 Diseño y Análisis Estadístico.....	46
5.12.1 Técnica de Difusión en Agar Suave.....	46
5.12.2 Ensayos de Inhibición de Crecimiento en Microplaca.....	47
5.12.3 Análisis de Datos Obtenidos de la Curva de Crecimiento Bacteriano.....	47
5.12.4 Estabilidad de Sustancia Inhibitoria Tipo Bacteriocina.....	47
6. RESULTADOS.....	48
6.1 Perfil Antagónico del Sobrenadante Libre de Células de <i>Pediococcus pentosaceus</i> CM175.....	48
6.2 Naturaleza del Compuesto del Sobrenadante Libre de Células con Actividad Antagónica.....	51
6.3 Purificación de Sustancia Inhibitoria Tipo Bacteriocina, su Estabilidad y su Secuencia Aminoacídica.....	54
6.4 Efecto de Sustancia Inhibitoria Tipo Bacteriocina Sobre <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	57
7. DISCUSIÓN.....	61
8. CONCLUSIÓN.....	67
9. RECOMENDACIONES.....	68

CONTENIDO (continuación)

10. REFERENCIAS.....	69
11. ANEXOS.....	76
11.1. Protocolo de Extracción de ADN.....	76
11.2. Protocolo de Cuantificación de Proteínas.....	82
11.3. Datos de Secuenciación de Genes.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ejemplos de fuentes de contaminación de frutas y hortalizas.....	25
2	Modos de acción de las bacteriocinas.....	34
3	Curvas de crecimiento de bacterias patógenas sometidas a tratamientos con sobrenadante libre de células de <i>Pediococcus pentosaceus</i> CM175.....	49
4	Efecto de los metabolitos presentes en el sobrenadante libre de células de <i>Pediococcus pentosaceus</i> CM175 sobre <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	53
5	Purificación de compuesto proteínico contenido en el sobrenadante libre de células de <i>Pediococcus pentosaceus</i> CM175.....	54
6	Estabilidad de sustancia inhibitoria tipo bacteriocina producida por <i>Pediococcus pentosaceus</i> CM175.....	56
7	Gel de electroforesis teñido con azul de Coomasie.....	57
8	Micrografías de fluorescencia de <i>Listeria monocytogenes</i> con y sin sustancia inhibitoria tipo bacteriocina.....	58
9	Micrografías de fluorescencia de <i>Salmonella</i> Typhimurium con y sin sustancia inhibitoria tipo bacteriocina.....	59
10	Micrografías electrónicas de transmisión de <i>Listeria monocytogenes</i>	60

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Brotos de enfermedades transmitidas por alimentos.....	22
2	Mecanismos de acción de metabolitos antibacterianos producidos por bacterias ácido lácticas.....	27
3	Bacteriocinas y bacterias que las producen.....	29
4	Antagonismo del sobrenadante libre de células de <i>Pediococcus pentosaceus</i> CM175 por el método de difusión en agar suave.....	48
5	Valores cinéticos obtenidos de la curva de crecimiento de las bacterias patógenas tratadas con 15 μ L de sobrenadante libre de células de <i>Pediococcus pentosaceus</i> CM175.....	50
6	Efecto de los metabolitos presentes en el sobrenadante libre de células de <i>Pediococcus pentosaceus</i> CM175 sobre el crecimiento de dos bacterias indicadoras (<i>L. monocytogenes</i> y <i>S. Typhimurium</i>) mediante la técnica de difusión en agar suave.....	52
7	Datos del análisis por LC-MS/MS para la identificación de la proteína de <i>Pediococcus pentosaceus</i> CM175 y búsqueda en la base de datos por homología.....	56
8	Bacteriocinas producidas por diferentes cepas de <i>Pediococcus pentosaceus</i> ..	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AO: Ácidos orgánicos
BAL: Bacterias ácido lácticas
BHI: Brain, Heart Infusion
BLIS: Bacteriocin-like inhibitory substance
CDC: Centers for disease control and prevention
CFS: Cell-free supernatant
CP: Compuestos proteínicos
DO: Densidad óptica
DO Max: Densidad óptica máxima
EFSA: European Food Safety Authority
E.U.A: Estados Unidos de América
ETAs: Enfermedades transmitidas por alimentos
FDA: Food and Drug Administration
FSMA: Food Safety Modernization Act
FPLC: Fast protein liquid chromatography
FyH: Frutas y hortalizas
LAB: Lactic acid bacteria
LC-MS/MS: Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry
MRS: deMan, Rogosa and Sharpe
NC: No crecimiento
OMS: Organización Mundial de la Salud
PH: Peróxido de hidrógeno
pH: Potencial de hidrógeno
SLC: Sobrenadante libre de células
TSB: Trypticase soy broth
UFC: Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) se presentan al consumir alimentos contaminados con agentes químicos o biológicos, siendo estos últimos los de mayor relevancia, ya que han provocado graves brotes de ETAs a nivel mundial. Una de las estrategias para reducir la contaminación de los alimentos, es el uso de bacterias ácido lácticas (BAL) o sus metabolitos como agentes antibacterianos, un ejemplo son las bacteriocinas, que han demostrado tener un uso potencial en alimentos para humanos y/o animales.

En nuestro grupo de trabajo se logró aislar e identificar a *Pediococcus pentosaceus* CM175, una BAL epífita de melón cantaloupe, ésta inhibe el crecimiento de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, pero se desconoce el mecanismo que utiliza para inhibir el crecimiento de esta enterobacteria. Aunque existen trabajos previos acerca de bacteriocinas producidas por bacterias del género *Pediococcus*, hasta ahora no se ha reportado ninguna que presente antagonismo contra *Salmonella* Typhimurium, por lo que comprobar que la cepa CM175 es bacteriocinogénica, caracterizar esta bacteriocina y comprobar su antagonismo contra este patógeno sería novedoso.

Se determinó el espectro antagónico del sobrenadante libre de células (SLC) producido por CM175, para después establecer la naturaleza del compuesto antagonista, purificarlo y caracterizarlo fisicoquímica y bioquímicamente. Después de la purificación del compuesto antagonista, se evaluó su efecto sobre la membrana de bacterias Gram positivas y negativas. Por último, se realizó la identificación del compuesto antagonista, mediante espectrometría de masas.

Los resultados muestran que el SLC de CM175 inhibió el crecimiento de bacterias Gram positivas y negativas, este antagonismo se debe a la presencia de compuestos de naturaleza ácida y proteínica. El componente proteínico se purificó y caracterizó, siendo termoestable a 100 °C, resistente a pH ácidos y neutros, y sensible a proteasas. Además, se comprobó, mediante microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión, que tiene capacidad de ejercer daño a la membrana sin causar lisis celular. La identificación de la molécula antagónica muestra una proteína idéntica a una perteneciente a un fago específico de *P. pentosaceus*. Se han reportado bacteriocinas ligadas a fagos, pero, ésta sería la primera reportada en el grupo de BAL.

En conclusión, *Pediococcus pentosaceus* CM175 produce una proteína derivada de fagos, la cual

no ha sido reportada, ni caracterizada. Esta proteína resultó antagonista contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, estable a pH ácidos, termoestable y susceptible a proteasas que dañan la membrana de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Typhimurium*.

Palabras clave: Bacteriocinas ligadas a fagos, compuesto antibacteriano, termoestabilidad, microscopía electrónica de transmisión, microscopía de fluorescencia.

ABSTRACT

Foodborne diseases occur when consuming food contaminated with chemical or biological agents, the latter being the most relevant, since they have caused serious outbreaks of these diseases worldwide. One of the strategies to reduce food contamination is the use of lactic acid bacteria (LAB) or their metabolites as antibacterial agents, an example, are bacteriocins, which have shown potential use in food for humans and/or animals.

In our work group, it was possible to isolate and identify *Pediococcus pentosaceus* CM175, an epiphytic LAB of cantaloupe melon, which inhibits the growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, but the mechanism used to inhibit the growth of this enterobacterium is unknown. Although there are previous studies on bacteriocins produced by bacteria of the *Pediococcus* genus, until now none have been reported that present antagonism against *Salmonella* Typhimurium, so verifying that the CM175 strain is bacteriocinogenic, characterizing this bacteriocin and verifying its antagonism against this pathogen would be novel.

The antagonistic spectrum of the cell-free supernatant (CFS) produced by CM175 was determined, in order to later establish the nature of the antagonist compound, purify it and characterize it physicochemically and biochemically. After purification of the antagonist compound, its effect on the membrane of Gram positive and negative bacteria was evaluated. Finally, the antagonist compound was identified by mass spectrometry.

The results show that CFS of CM175 inhibited the growth of Gram positive and negative bacteria, this antagonism is due to the presence of compounds of acid and protein nature. The protein component was purified and characterized, being thermostable to 100 °C, resistant to acidic and neutral pH, and sensitive to proteases. Furthermore, it was verified by fluorescence microscopy and transmission electron microscopy that it can exert damage to the membrane without causing cell lysis. The identification of the antagonistic molecule shows a protein identical to that belonging to a specific phage of *P. pentosaceus*. Phage-linked bacteriocins have been reported, but this would be the first reported in the LAB group.

In conclusion, *Pediococcus pentosaceus* CM175 produces a protein derived from phages, which has not been reported or characterized. This protein was antagonistic against Gram positive and negative bacteria, stable at acidic pH, thermostable and susceptible to proteases that damage the

membrane of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium.

Keywords: Phage-linked bacteriocins, antibacterial compound, thermostability, transmission electron microscopy, fluorescence microscopy.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) aquejan a la población mundial, éstas se presentan cuando se ingieren alimentos contaminados con componentes químicos o microbiológicos (Ford *et al.*, 2015). De estos contaminantes, los de origen microbiológico toman gran relevancia debido a que son los que causan un mayor número de brotes de ETAs a nivel mundial (Tack *et al.*, 2019).

Los principales microorganismos ligados con brotes de ETAs son agentes bacterianos, entre los que destacan *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Campylobacter* spp (Gallo *et al.*, 2020). Estas bacterias se han relacionado al consumo de alimentos frescos como lo son frutas y hortalizas (FyH), las cuales han provocado varios brotes multiestatales en los Estados Unidos de América (CDC, 2020a).

Las fuentes de contaminación por microorganismos en FyH pueden ser muchas a lo largo de la cadena productiva, del campo al consumidor. Desde el agua que se utiliza para el riego de las plantas, el manejo poscosecha, los fertilizantes, los plaguicidas, la higiene de las instalaciones y del personal, el transporte de FyH (Martínez-Téllez *et al.*, 2007) e incluso hasta el mismo consumidor preparando sus alimentos son potenciales fuentes de microorganismos que pueden llegar a contaminar estos alimentos (Nerin *et al.*, 2016), algunas de estas fuentes se encuentran en la figura 1. Todas estas vías de contaminación suponen que se deben de seguir las buenas prácticas agrícolas, de higiene y desinfección con el fin de evitar los brotes que a la fecha se siguen presentando.

En la actualidad, los métodos que se utilizan para desinfección de FyH no han sido tan eficaces como se esperaría, y esa es la principal razón de la búsqueda de nuevas estrategias para la desinfección de estos alimentos. En todas las etapas de producción de FyH se debe de contar con estrategias eficientes, entre ellas está la capacitación de los trabajadores hasta la desinfección directa de estos alimentos. Una de las estrategias propuestas que ha llamado la atención de nuestro grupo de investigación, es la utilización de bacterias ácido lácticas (BAL) o de sus metabolitos secretados como agentes antimicrobianos que controlen el crecimiento de bacterias patógenas (Wadamori *et al.*, 2017). En trabajos previos, se logró el aislamiento de una BAL identificada como *Pediococcus pentosaceus* CM175, la cual logró ejercer un efecto antagónico en contra de

Salmonella enterica serovar Typhimurium ATCC 14028 (Aguilar, 2016). Sin embargo, no se identificó el agente responsable del efecto antibacteriano, pudiendo ser un componente secretado por la bacteria o a un antagonismo célula-célula, lo cual es el inicio de una potencial investigación para identificar compuestos antagonistas contra bacterias patógenas. Dentro de los compuestos antibacterianos secretados por BAL están los ácidos orgánicos, el peróxido de hidrógeno y las bacteriocinas.

Las bacteriocinas son proteínas secretadas por bacterias que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias (Jordan *et al.*, 2014). Estas moléculas tienen características importantes de termoestabilidad, resistencia a diferentes pH y susceptibilidad a proteasas que le permitirían ser utilizadas en diversas áreas, como en tecnología de alimentos, así como en otras actividades de la vida diaria. Dentro del género *Pediococcus*, se han caracterizado algunas bacteriocinas con antagonismo sobre bacterias Gram positivas (Albano *et al.*, 2007), sin que alguna de ellas presente antagonismo contra bacterias del género *Salmonella*. Por lo que hipotetizamos que el antagonismo que *P. pentosaceus* CM175 presentó contra *S. Typhimurium*, puede deberse a una bacteriocina que será diferente de las que se han caracterizado a la fecha.

Debido a lo anterior, esta investigación tiene como objetivo principal purificar y caracterizar fisicoquímicamente al menos una bacteriocina antagonista contra bacterias Gram positivas o Gram negativas, producida por *Pediococcus pentosaceus* CM175, así como definir su secuencia aminoacídica y su efecto en la membrana de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Typhimurium*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedades Transmitidas por Alimentos

En la actualidad, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son un problema para la población mundial. Estas enfermedades se presentan por el consumo de alimentos contaminados con agentes químicos o biológicos, causando infecciones o intoxicaciones (Ford *et al.*, 2015). Esta contaminación se puede presentar en cualquier parte del proceso de la cadena de producción, que abarca desde el campo hasta la mesa (Nerin *et al.*, 2016). Estos datos revelan la necesidad de mejorar la inocuidad en cada una de las etapas de producción y procesamiento de alimentos, con el fin de reducir su posible contaminación y sus respectivas ETAs.

Las ETAs son definidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos o productos alimenticios contaminados con parásitos, agentes químicos o patógenos (Ford *et al.*, 2015). De tal manera, que pueden ser varios los agentes causantes de estas enfermedades y éstos pueden ser incorporados involuntariamente en los alimentos en cualquier parte del proceso de producción y manejo, así como en el procesamiento de los mismos. Para que una ETA se presente por causas de contaminación microbiana y se convierta en una enfermedad infecciosa deben de presentarse condiciones muy específicas. Las condiciones que propician una infección son: 1) alta virulencia del microorganismo presente en el alimento; 2) alta carga microbiana en el alimento; 3) condiciones de respuesta no aptas del sistema inmune del consumidor (Gallo *et al.*, 2020).

En el año 2019, en Estados Unidos de América se presentaron 19 brotes multiestatales, debidos únicamente a agentes biológicos, que presentaron 1163 casos y 5 muertes (CDC, 2020a). En México, desde el año 2010 al 2015 se reportaron más de 28 millones de personas con enfermedades intestinales atribuibles al consumo de alimentos (Cofepris, 2015). Estos valores son un reflejo de la necesidad de mejorar las medidas de control de los riesgos de contaminación para asegurar la inocuidad de los alimentos. A pesar de que las ETAs no son exclusivamente causadas por microorganismos, estos agentes son los que más ETAs generan y los que son reportados mayoritariamente por las agencias gubernamentales correspondientes (CDC, 2020b).

2.2 Microorganismos Causantes de ETAs

Los principales microorganismos ligados con las ETAs son virus, parásitos y bacterias. Los virus mayormente involucrados incluyen a norovirus y al virus causante de hepatitis A. En cuanto a parásitos, los más relevantes en este tema son *Cyclospora cayetanensis* y *Cryptosporidium parvum*. Las bacterias causantes de ETAs con más relevancia son: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp y *Escherichia coli*, no obstante, otras bacterias también se han presentado en infecciones debidas a consumo de alimentos, por ejemplo, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* (Gallo *et al.*, 2020). Los virus y los parásitos suelen presentar bajos porcentajes de hospitalización (<0.1%), por lo tanto, muchos de los síntomas causados por estos microorganismos son leves y sin gravedad, siendo los alimentos frescos o alimentos procesados con malas prácticas de higiene los principales vehículos (FDA, 2012; Scallan *et al.*, 2011). A diferencia de los virus y parásitos, las bacterias causan un gran número de brotes de ETAs y suelen causar problemas más graves debido a que su infección debe ser tratada con antibióticos, ya que las consecuencias pueden variar desde una diarrea leve e incluso hasta la sepsis bacteriana por mal manejo de la enfermedad (FDA, 2012).

Las bacterias *Salmonella* spp y *E.coli* patogénica, son patógenos que han tomado importancia ya que han provocado muchos problemas en los últimos años, lo cual queda de manifiesto con la gran cantidad de brotes de ETAs que han provocado. Estas bacterias provocan más del 90% de los brotes que reportan los centros de control y prevención de enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) y la administración de alimentos y medicamentos (FDA por sus siglas en inglés), y se han ligado con una gran variedad de alimentos donde destacan alimentos frescos o mal cocinados (CDC, 2020b; FDA, 2012). En México, *Salmonella* spp. ha provocado más de medio millón de casos en el periodo 2010-2015, donde también se han relacionado los alimentos preparados con estos casos de ETAs pero los reportes acerca de infecciones por *E. coli* no se encuentran especificados (Cofepris, 2015).

2.3 Principales Alimentos Relacionados con ETAs

Los alimentos proporcionan a los seres vivos los componentes necesarios para vivir, sin embargo, éstos también pueden ser transporte para diversos organismos que causan enfermedades en humanos. Todos los alimentos pueden ser causantes de ETAs, tanto alimentos de origen animal como de origen vegetal se han relacionado con diversos brotes de estas enfermedades (Cuadro 1) (CDC, 2020a). Aquellos alimentos que se consumen crudos o sin un tratamiento térmico son los que mayormente se han implicado con estos brotes en Estados Unidos, aunque, no son los únicos responsables de estas afecciones (CDC, 2020b).

Cuadro 1. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos.

Alimento	Agente etiológico	Año del brote
Embutidos	<i>Listeria monocytogenes</i>	2020
Duraznos	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2020
Seta de oreja de madera	<i>Salmonella</i> Stanley	2020
Cebollas	<i>Salmonella</i> Newport	2020
Huevos cocidos	<i>Listeria monocytogenes</i>	2019
Melón pre-cortado	<i>Salmonella</i> Carrau	2019
Lechuga romana	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	2019
Carne molida	<i>Salmonella</i> Dublin	2019
Harina	<i>Escherichia coli</i> O26	2019
Papaya	<i>Salmonella</i> Uganda	2019
Atún crudo congelado	<i>Salmonella</i> Newport	2019
Embutidos y quesos	<i>Listeria monocytogenes</i>	2019
Papaya	<i>Salmonella</i> Uganda	2019
Almejas crudas	Múltiples agentes	2019

En el mercado actual ha surgido un nuevo tipo de alimentos llamado alimentos listos para ser consumidos, estos alimentos están tomando gran poder, no obstante, también han causado diversos problemas. Los alimentos listos para ser consumidos son alimentos que ya han sido procesados y/o

preparados y el consumidor solo los compra y los ingiere sin realizar ningún procedimiento (Makinde *et al.*, 2020). El consumo de este tipo de alimentos se encuentra al alza debido a su disponibilidad, fácil preparación, y comodidad; pero, la falta de higiene al prepararlos y consumirlos sin ningún tipo de procesamiento posterior pueden ser las causas de ETAs (Al Mamun *et al.*, 2013).

Las frutas y hortalizas (FyH) son alimentos cuya ingesta, al igual que los alimentos listos para su consumo, se encuentra al alza, debido a su fácil acceso y a su asociación con la vida saludable. La OMS recomienda un consumo de 400 g diarios de FyH para prevenir diversas enfermedades crónicas como diabetes, cáncer, entre otras (OMS, 2003). Sin embargo, estos alimentos también tienen una tendencia a causar ETAs debido a su alto consumo sin tener una cocción previa (Callejón *et al.*, 2015). Las FyH generalmente se consumen frescas, lo cual las hace alimentos que, si se encuentran contaminados, fácilmente provocarán una ETA, esto es una parte de las razones que puede explicar la gran cantidad de brotes alimentarios debido al consumo de estos alimentos.

2.4 Brotes de ETAs Causadas por Consumo de Frutas y Hortalizas

Como se mencionó anteriormente, el consumo de FyH se ha relacionado con un estilo de vida saludable, por lo que a partir de finales del siglo pasado existe una tendencia a elevar su consumo; sin embargo, como consecuencia también se ha elevado el número de brotes relacionados con estos alimentos (Carstens *et al.*, 2019). En el periodo de 2004-2012 la CDC reportó 377 brotes debido únicamente al consumo de FyH en E.U.A., mientras que, en Europa, la Autoridad de la Seguridad Alimentaria Europea (EFSA por sus siglas en inglés) reportó en este mismo periodo 197 brotes debidos al consumo de FyH (Callejón *et al.*, 2015). Además, en el periodo 2010-2017 la CDC reportó 85 brotes multiestatales de ETAs que fueron provocados por este tipo de alimentos (Carstens *et al.*, 2019). Estos brotes multiestatales representaron más de 4500 personas enfermas con más de 1100 hospitalizaciones, de las cuales 55 personas perdieron la vida. Estos números alarmantes dan una muestra clara de que la inocuidad en estos alimentos no está siendo la indicada, que están fallando los sistemas de vigilancia y que las fuentes de contaminación no están siendo monitoreadas como se debiera.

Una de las causas principales del gran número de brotes de ETAs causados por FyH, es que estos pueden ser consumidos frescos o mínimamente procesados. Al ser alimentos que no se cocinan, se deben de cuidar todas las etapas, desde su producción en el campo, hasta el momento en que se sirve al consumidor final, trayecto por el cual el alimento puede ser fácilmente contaminado.

2.5 Fuentes de Contaminación de FyH

Las fuentes de contaminación de FyH puede ser muy variada, éstas se pueden encontrar en cualquier etapa de la cadena de producción de una fruta u hortaliza, como lo puede ser pre-cosecha, cosecha o poscosecha. La contaminación en precosecha se puede deber básicamente a que la gran mayoría de FyH tienen contacto con el suelo, agua de riego (contaminada), otras plantas, infestación por insectos, contacto con heces de animales, compostas mal tratadas, así como algunos fertilizantes, durante su crecimiento y maduración (Alegbeleye *et al.*, 2018). La contaminación en cosecha se puede presentar debido al contacto de FyH con equipo contaminado, contenedores de transporte y herramientas contaminados, e incluso por manos o guantes del personal que se encuentren contaminados (Carstens *et al.*, 2019; Wadamori *et al.*, 2017). Por último, la contaminación poscosecha puede ocurrir durante el transporte, almacenamiento o manejo de la fruta u hortaliza, esto puede ocurrir por contaminación cruzada, por equipo contaminado o por el manejo inadecuado por parte del personal que va a manejar el alimento (Carstens *et al.*, 2019; Mir *et al.*, 2018). Las FyH generalmente no son procesadas o tienen un mínimo procesamiento, que va desde lavado, secado y corte de la fruta, en cualquier parte de este proceso puede ocurrir una contaminación por alguna de las maneras antes mencionada. Debido a la diversidad de las fuentes de contaminación que existen durante todo el proceso de la cadena de producción de una fruta y/u hortaliza (figura 1), las estrategias para evitar contaminaciones deben ser estrictas y eficientes. Actualmente, las estrategias que se utilizan no son 100 % efectivas, lo que queda de manifiesto al ver el gran número de ETAs que se presentan año tras año, por lo cual es una prioridad la búsqueda de estrategias novedosas que permitan asegurar la inocuidad de FyH.

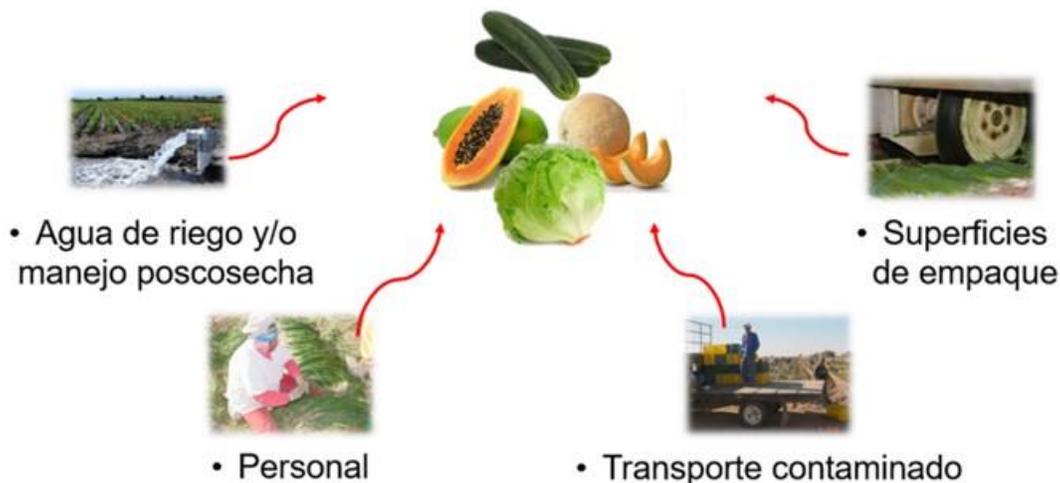


Figura 1. Ejemplos de fuentes de contaminación de frutas y hortalizas. Imagen adaptada de Mir *et al.* (2018).

2.6 Estrategias para Combatir ETAs Relacionadas con FyH

A pesar de que en la actualidad se practican diversas técnicas de desinfección para FyH, no se ha logrado obtener los resultados deseados, impulsando la búsqueda de alternativas que se ha convertido en un punto importante de los productores de estos alimentos y con ello, de los investigadores dentro de este campo (Nithya *et al.*, 2014). Dentro de los riesgos en la etapa precosecha, el suelo ocupa los primeros lugares de contaminación, por lo que se ha propuesto cuidar y hacer un análisis de suelos donde se va a sembrar una fruta u hortaliza, agregar barreras físicas para que animales no tengan contacto con el cultivo y se recomienda realizar análisis periódicos de la calidad microbiológica del agua utilizada en riegos, así como instruir de manera adecuada a los trabajadores del campo y desinfectar todos los utensilios y equipo que se va a utilizar en el cultivo (Alegbeleye *et al.*, 2018). Estas especificaciones fueron incluidas en la nueva ley de modernización de la inocuidad de los alimentos (FSMA por sus siglas en inglés) emitida por la FDA y puesta en vigor a partir del 2018 para todos los productores nacionales e internacionales interesados en comercializar su producto en los E.U.A (FDA, 2020). En la etapa poscosecha se han propuesto varias estrategias desde físicas como lavados con agua a altas temperaturas 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 productos secretados como las bacteriocinas (Wadamori *et al.*, 2017).

En cuanto al uso de BAL, nuestro grupo de trabajo logró aislar e identificar una BAL de melón cantaloupe antagonista del crecimiento de *Salmonella* Typhimurium, bacteria patógena altamente ligada con brotes de ETAs. Esta BAL se identificó como *Pediococcus pentosaceus* CM175 (Aguilar, 2016). En este trabajo no se demostró el mecanismo que esta bacteria utiliza para ejercer la actividad antagónica. En este sentido, se ha reportado que las BAL pueden utilizar diferentes estrategias para ser antagonistas de otras bacterias, incluidas, pero no limitadas a la producción de ácidos orgánicos y producción de bacteriocinas. Una hipótesis interesante que se generó en nuestro grupo de trabajo es que la actividad antagónica de esta bacteria este mediada por algún compuesto antagonista secretado, entre los que pueden estar ácidos orgánicos o bacteriocinas, causando un gran interés la caracterización de esta hipotética proteína.

2.7 Antagonismo de Bacterias Ácido Lácticas

El antagonismo bacteriano se refiere a la acción que una bacteria puede ejercer contra otra para impedir su proliferación o eliminarla. Esta acción esta mediada por diversos mecanismos como son: competencia por nutrientes o espacio, producción de enzimas líticas, péptidos antimicrobianos o sustancias tóxicas como ácidos y peróxido de hidrógeno (Janisiewicz y Korsten, 2002; Jordan *et al.*, 2014). Kim *et al.* (2003) reportaron que diferentes especies de *Lactobacillus* presentaron antagonismo frente a *Helicobacter pylori*, dicha actividad fue mediada por la producción de ácidos orgánicos y bacteriocinas.

La producción de compuestos antagonistas es una característica que se ha propuesto para ser aprovechada de gran manera, ya que estos metabolitos pueden actuar de manera negativa contra diversos patógenos, por ejemplo, detener la proliferación e incluso eliminar al patógeno. Este efecto negativo es independiente de la superficie en la que se encuentre el patógeno y si la bacteria productora de compuestos antagonistas no se encuentre cercana a la patógena. Algunos metabolitos producidos por bacterias antagonistas han sido relacionados directamente con su capacidad para

eliminar otras bacterias. Los principales metabolitos relacionados con la actividad antagónica ejercida por bacterias son: peróxido de hidrógeno, ácidos grasos de cadena corta, ácido láctico y bacteriocinas (Cuadro 2) (Ben Said, *et al.*, 2019).

Cuadro 2. Mecanismos de acción de metabolitos antibacterianos producidos por bacterias ácido lácticas. Adaptada de Ben Said, *et al.*, 2019.

Metabolito antibacteriano producido por bacterias ácido lácticas	Modo de acción
Ácidos orgánicos	Disminución de pH intracelular que resulta en inhibir actividad enzimática y dañar proteínas y ADN.
Peróxido de hidrógeno	Producción de radicales libres que dañan el ADN.
Dióxido de carbono	Inhibición de la transcripción de genes y expresión de proteínas.
Diacetilo	Interfiere con la utilización de arginina.
Reuterina	Induce estrés oxidativo por interacción con grupos tiol.
Bacteriocinas	Inhibición de síntesis de pared celular y formación de poros.

El peróxido de hidrógeno es un compuesto altamente reactivo formado por dos oxígenos unidos entre sí y que cada uno tiene un hidrógeno enlazado, además, tiene un alto poder oxidante. Este compuesto tiene la capacidad de producir iones hidroxilo (OH⁻) que pueden reaccionar directamente con compuestos que están presentes en las membranas celulares de otras bacterias como los lípidos y las proteínas. Algunas bacterias tienen la capacidad de actuar en contra de este compuesto mediante la producción de catalasas, las cuales son enzimas que se encargan de la descomposición de este compuesto en oxígeno y agua, esto como un sistema de defensa (Tortora *et al.*, 2007).

Aunque, estudios *in vitro* han demostrado que *Lactobacillus* spp. productores de peróxido de hidrógeno, logran inhibir el desarrollo de *Neisseria gonorrhoeae*, bacteria Gram negativa causante de gonorrea. Otros estudios *in vivo* han presentado resultados contradictorios (Muench *et al.*, 2009). Estos resultados muestran la variabilidad de resultados que se pueden obtener en experimentos *in vitro* comparándolos con experimentos *in vivo*, debido principalmente a factores, en estos últimos,

que no se pueden replicar de una manera exacta en los laboratorios. En este sentido, existen bacterias muy sensibles al peróxido de hidrógeno y otras en las que este compuesto no provoca ningún daño, esta sensibilidad puede deberse a la naturaleza propia de la bacteria y a las condiciones del medio en el que se encuentran (Muench *et al.*, 2009).

Las bacterias que tienen la capacidad de producir ácidos grasos de cadena corta presentan antagonismo debido a que modifican el pH del medio en el que se encuentran. Los ácidos grasos de cadena corta que pueden llegar a ser mayormente producidos son ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico. Estos ácidos disminuyen el pH de manera que las bacterias susceptibles a pH ácidos no resistirán y morirán, ejemplos de estas bacterias susceptibles son *Salmonella* spp (Duncan *et al.*, 2009). El ácido propiónico y el ácido butírico han logrado inhibir el crecimiento de *Salmonella* sp y *Escherichia coli* en intestino delgado (Ricke, 2003). No obstante, estos metabolitos no son los únicos que han demostrado su actividad antagónica contra bacterias patógenas, entre estos metabolitos se encuentran ácido láctico y bacteriocinas.

Las bacterias que producen ácido láctico como principal producto de fermentación, son ampliamente estudiadas por sus características particulares, debido a que ejercen antagonismo bacteriano por diversas vías. Bacterias Gram negativas en el colon humano, como bacterias del filo de Bacteroidetes y *Escherichia coli*, han decaído en número cuando el pH baja de 6.5, pero existen cepas del filo antes mencionado que pueden sobrevivir a este rango de pH (Duncan *et al.*, 2009). Además, bacterias productoras de ácido láctico también tienen la capacidad de secretar otros metabolitos antimicrobianos como bacteriocinas (Ahlberg *et al.*, 2015; Cano-Garrido *et al.*, 2015; Vásquez *et al.*, 2009).

2.8 Bacteriocinas Producidas por BAL

Las bacteriocinas son péptidos secretados por una bacteria que tiene la capacidad de actuar de manera selectiva sobre otras bacterias (Jordan *et al.*, 2014). Las bacteriocinas están catalogadas como compuestos antimicrobianos, así como lo son las defensinas (producidas por mamíferos) y las tioninas (producidas por plantas) (Karpiński y Szkaradkiewicz, 2013). Existe un gran número de bacteriocinas que han sido estudiadas, entre las que se encuentran: nisina, pediocina, piscicolina

y enterocina. Estas bacteriocinas pueden actuar de manera selectiva contra bacterias Gram positivas y/o Gram negativas (Abee *et al.*, 1994; Miller y McMullen, 2014; Perez *et al.*, 2016; Venema *et al.*, 1995).

Las BAL son importantes productoras de bacteriocinas. Dentro de este grupo de bacterias, existen muchas que son capaces de producir una bacteriocina, incluso puede haber algunas que producen de 1 a 3 bacteriocinas (Snyder y Worobo, 2014). Estas bacterias, así como las bacteriocinas que producen, han sido ampliamente estudiadas, pero los mecanismos por los cuales son producidas, modificadas o inmunizadas no han sido elucidados del todo (Gabrielsen *et al.*, 2014; Perez *et al.*, 2016). El Cuadro 3 presenta cepas de BAL productoras de bacteriocinas, así como la bacteriocina que producen.

Cuadro 3. Bacteriocinas y bacterias que las producen.

Bacteriocina (Peso molecular)	Peso molecular	Bacteria	Referencia
Nisina	<5 kDa	<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	(Li y O'Sullivan, 2002)
Pediocina	<5 kDa	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC1.0	(Venema <i>et al.</i> , 1995)
Plantaricina E/F y J/K	≈5 kDa	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11	(Anderssen <i>et al.</i> , 1998)
Divergicina	<5 kDa	<i>Caernobacterium divergens</i> LV13	(Worobo <i>et al.</i> , 1995)
Enterocina NKR-5-3B (6.3 kDa)	6.3 kDa	<i>Enterococcus faecium</i> NKR-5-3B	(Perez <i>et al.</i> , 2016)

2.8.1 Características de Bacteriocinas Producidas por BAL

Muchas BAL son capaces de producir bacteriocinas, estas moléculas pueden ser muy diferentes dependiendo de la bacteria productora; sin embargo, existen características que comparten la mayoría de estas moléculas. La característica principal que poseen es su capacidad de impedir la proliferación e incluso ocasionar la muerte de algunas bacterias susceptibles. Otras características que comparten estas proteínas son su susceptibilidad a proteasas, su punto isoeléctrico básico,

generalmente de 9 o más, y su carga superficial positiva a pH neutro. Además, la mayoría de bacteriocinas son termoestables y pueden ejercer su actividad en un amplio rango de pH, la gran mayoría tienen pesos moleculares pequeños, menos de 10 kDa en muchos de los casos, aunque están reportadas bacteriocinas con un peso molecular mayor a 50 kDa (O'Connor *et al.*, 2020), incluso hay dos bacteriocinas reportadas con pesos moleculares mayores a 75 kDa pertenecientes a *Enterococcus faecalis* YI714 (Tomita *et al.*, 2008) y *Pediococcus pentosaceus* FBB61 (Piva y Headon, 1994).

Así como hay características que comparten la mayoría de bacteriocinas, existen otras con las que podemos diferenciarlas, como es la secuencia aminoacídica, la cual tiene una gran utilidad sobre todo para poder clasificar las bacteriocinas que a la fecha han sido estudiadas. Otra característica con la cual se pueden diferenciar las bacteriocinas producidas por las BAL son los diferentes modos de acción que utilizan para ejercer su actividad antagónica (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016).

Bacteriocinas que han sido ampliamente estudiadas de manera molecular han demostrado que sus genes están en operones específicos para cada una de ellas, es decir, genes que se encuentran agrupados y que codifican para proteínas que se involucran en su procesamiento y maduración, así como de la bacteriocina misma (Macwana y Muriana, 2012). Dentro de las bacteriocinas más estudiadas con estas características se encuentran la nisina y la pediocina, las cuales poseen genes estructurales *NisA* y *papA* respectivamente (Macwana y Muriana, 2012). Tomando en cuenta las características que diferencian unas de otras, han surgido algunas clasificaciones de bacteriocinas producidas por BAL.

2.8.2 Clasificación de Bacteriocinas Producidas por BAL

La cantidad y variedad de bacteriocinas que han ido descubriéndose desde la colicina (primer bacteriocina descubierta) generó la necesidad de crear una clasificación de las mismas, no obstante, varias clasificaciones se han generado (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016; Cotter *et al.*, 2005). Alvarez-Sieiro *et al.* (2016) presentaron una clasificación para bacteriocinas producidas por BAL, la cual es una clasificación muy completa y que analiza desde secuencia aminoacídica hasta modos de acción.

La clasificación propone 3 clases de bacteriocinas. Clase I, bacteriocinas con un peso molecular menor a 10 kDa con modificaciones posttraduccionales. Clase II, bacteriocinas con un peso molecular menor a 10 kDa sin modificaciones posttraduccionales. Clase III, bacteriocinas con peso molecular mayor a 10 kDa sin modificaciones posttraduccionales con mecanismos de acción lítico o no lítico.

La clase I, se encuentra dividida en 6 subclases, que van desde la clase Ia a la clase If. La clase Ia pertenece a los lantipeptidos, los cuales son bacteriocinas que poseen aminoácidos inusuales como la lantionina y la metil-lantionina. La clase Ib o péptidos cíclicos cabeza-cola, como su nombre lo indica, son péptidos cíclicos, los cuales poseen un enlace peptídico entre su amino terminal y su carboxilo terminal. La clase Ic o sactibioticos, son aquellos péptidos que contienen un azufre en el carbono α . La clase Id o péptidos con grupo azol lineal, son péptidos que poseen varios anillos heterocíclicos de tiazoles y metil oxazoles, relacionados con cisteína, serina y treonina. La clase Ie o glicocinas, son aquellos péptidos que poseen una glicosilación en algún residuo. La clase If o lassopeptidos, son péptidos que poseen una unión amida entre el residuo de un aminoácido del núcleo de la cadena y el residuo cargado de manera negativa en posiciones +7 o +9 en referencia al primero, generando un anillo que abraza la parte lineal del carboxilo terminal. Algunos ejemplos de bacteriocinas pertenecientes a la clase I son: nisina, bovicina HC5, bificina C6165 y termofilina 1277 (Teixeira-Barbosa *et al.*, 2017).

La clase II, se divide en 4 subclases, de la “a” a la “d”. La clase IIa o bacteriocinas tipo pediocinas, son péptidos que tienen alta actividad antagónica contra *Listeria* y poseen un motivo conservado en su amino terminal “YGNGVXC”. La clase IIb o bacteriocinas dos-peptidos, son aquellas bacteriocinas compuestas por dos péptidos totalmente diferentes. La clase IIc o bacteriocinas sintetizados sin péptido señal. La clase IId o bacteriocinas no tipo pediocina es un grupo heterogéneo no relacionado, que no encaja en las otras subclases. Bacteriocinas representantes de esta clase son: pediocina, enterocina, lactocina y sakacina (Teixeira-Barbosa *et al.*, 2017).

La clase III está compuesta de proteínas antimicrobianas de alto peso molecular, termolábiles, que contienen varios dominios a lo largo de su estructura. Dentro de esta clase de bacteriocinas se encuentran pocos ejemplares. Algunas bacteriocinas pertenecientes a esta clase son: zoocina A Y Helveticina J (Alvarez-Sieiro, *et al.*, 2016).

En general, esta clasificación agrupa de una manera concreta las bacteriocinas conocidas que son secretadas por BAL. Es importante mencionar que todas las bacteriocinas que faltan de ser

descubiertas deberían de encajar en alguna de las clases mencionadas anteriormente. Al poder colocar una bacteriocina dentro de la clase correspondiente, se podrían inferir algunas características, las cuales deberían ser comprobadas en algún momento. A pesar de que este texto no menciona los diferentes modos de acción que utilizan las bacteriocinas para llevar a cabo su actividad antagonista, esta característica sí fue tomada en cuenta al realizar la clasificación aquí mencionada.

2.8.3 Modo de Acción de Bacteriocinas

Las bacteriocinas pueden ejercer su función antimicrobiana de diversas maneras, entre las cuales están la formación de poros, daño a la membrana, lisis celular, inhibición de la formación de la pared celular, de enzimas y de expresión de genes (Cotter *et al.*, 2013). La gran mayoría de las bacteriocinas reportadas presentan un solo mecanismo de acción en contra de la célula diana, siendo estas bacterias Gram positivas en su mayoría para la clase I y II, y Gram positivas y negativas para la clase III. Por otro lado, existen bacteriocinas que pueden ejercer una combinación de estos mecanismos, un ejemplo es la nisina. Esta bacteriocina puede formar poros en la bacteria susceptible, así como, inhibir la síntesis de la pared celular (Snyder y Worobo, 2014) ocasionando su muerte celular.

La formación de poros en la membrana es el mecanismo de acción que ejercen la mayoría de las bacteriocinas pertenecientes a la clase Ia (lactibioticos), como lo son nisina (Abbe *et al.*, 1994) y penisina (Baindara *et al.*, 2016). Este mecanismo inicia con la unión de la bacteriocina a la molécula de lípido II que se encuentra en la célula diana, después, mediante atracciones y repulsiones electrostáticas la bacteriocina se inserta en la membrana, esto sucede con varias unidades de la bacteriocina lo que ocasiona la formación de poros (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016; Cotter *et al.*, 2013). Otro mecanismo por el cual las bacteriocinas pueden producir un poro en la membrana bacteriana susceptible es dependiente de voltaje y se da con la unión al sistema transportador de manosa. Estos mecanismos son de los más reportados, por lo tanto, más estudiados y mayormente elucidados.

La inhibición de la formación de la pared celular se da cuando la bacteriocina es capaz de interactuar y unirse al lípido II, responsable de la formación de la pared celular, interrumpiendo la

biosíntesis de este organelo. Además, las bacteriocinas también pueden dañar paredes celulares bacterianas que ya se encuentran sintetizadas, esto mediante la hidrólisis de los enlaces de peptidoglicano (Snyder y Worobo, 2014).

Otro de los modos de acción de las bacteriocinas es la inhibición enzimática, este mecanismo se ha estudiado en varias microcinas, bacteriocinas no producidas por BAL, que actúan contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Duquesne *et al.*, 2007). Debido a la inhibición de enzimas importantes en la bioquímica bacteriana se puede inhibir la transcripción, la elongación del ARN y la síntesis proteínica, procesos que son vitales, ejemplos de bacteriocinas que poseen este mecanismo son algunas microcinas y lasomicina (Bechinger y Gorr, 2017; Snyder y Worobo, 2014).

Las bacteriocinas de la clase III pueden ser líticas o no líticas. Las bacteriocinas líticas poseen una actividad de peptidasa, la cual le permite degradar la capa de peptidoglicano en la pared celular, lo que promueve la lisis celular. Por otro lado, las bacteriocinas no líticas pueden causar daño a la membrana sin llegar a lisis a la célula, así como inhibir la síntesis de ADN o de proteínas esenciales en el metabolismo de la bacteria (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016).

Los diferentes modos de acción que poseen las bacteriocinas quedan esquematizados en la Figura 2. En esta figura también se muestra la dualidad (doble modo de acción) de la nisina.

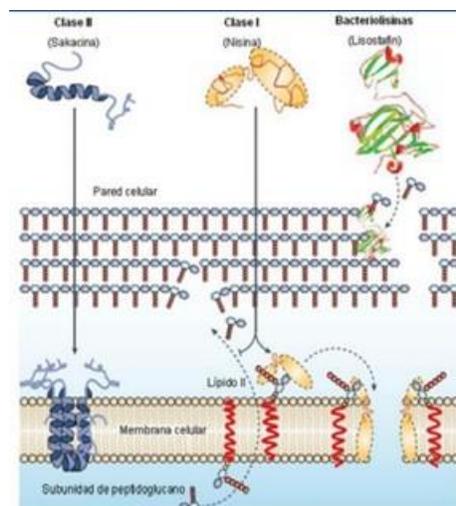


Figura 2. Modos de acción de las bacteriocinas. Imagen traducida de Cotter *et al.*, 2005.

2.9 Pregunta de Investigación

Analizando la problemática de las ETAs, así como la necesidad de nuevas estrategias para combatir estas afecciones, aunado con los resultados que ha obtenido anteriormente nuestro grupo de trabajo, se genera la pregunta de investigación ¿Qué características bioquímicas y fisicoquímicas tiene el compuesto producido por *Pediococcus pentosaceus* CM175 que le pudiera permitir ejercer antagonismo en contra de bacterias patógenas Gram positivas y/o Gram negativas y de qué manera actúa?

3. HIPÓTESIS

Pediococcus pentosaceus CM175 produce una bacteriocina no conocida antagonista contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, estable a temperatura, pH y susceptible a proteasas y causante de daño a la membrana de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Purificar y caracterizar fisicoquímicamente al menos una bacteriocina antagonista contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, producida por *Pediococcus pentosaceus* CM175, así como definir su secuencia aminoacídica y su efecto en la membrana de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium.

4.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto antagónico del sobrenadante libre de células de *Pediococcus pentosaceus* CM175 contra *Salmonella* Saintpaul, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.
2. Identificar la naturaleza del compuesto que confiere antagonismo a *Pediococcus pentosaceus* CM175 contra *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium
3. Purificar, al menos, una bacteriocina y realizar pruebas de estabilidad contra temperatura, pH y proteasas, así como definir la secuencia aminoacídica mediante espectrometría de masas.
4. Determinar el efecto de bacteriocina sobre la membrana celular de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Medios de Cultivo, Enzimas y Reactivos Utilizados

Para la realización de la presente investigación se utilizaron los siguientes medios de cultivo comerciales: agar granulado, caldo y agar de Man Rogosa & Sharpe (MRS), caldo de infusión cerebro-corazón (BHI), todos estos de Difco (Beckton Dickinson, E.U.A.). Además, se utilizaron las enzimas comerciales: catalasa, proteinasa K, proteasa y tripsina (Sigma-Aldrich, E.U.A.). Los reactivos comerciales utilizados en las microscopías fueron: fluoresceína y el yoduro de propidio (Sigma-Aldrich, E.U.A.), ácido fosfotungstico, tetraóxido de osmio (OsO_4), glutaraldehido y cacodilato de sodio de Sigma-Aldrich, E.U.A. Por último, el amortiguador de fosfatos de sodio (Sigma-Aldrich, E.U.A.) se utilizó en diferentes fases de la investigación, principalmente en la cromatografía de intercambio catiónico.

5.2 Cepas Bacterianas y Condiciones de Cultivo

La bacteria ácido láctica (BAL) utilizada en la presente investigación, *Pediococcus pentosaceus* CM175, fue aislada previamente de melón cantaloupe y pertenece al cepario del Laboratorio de Fisiología Vegetal-Molecular del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C.). Las bacterias patógenas *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 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. *Salmonella* Saintpaul 476 y *Escherichia coli* O157:H7 K3999 fueron proporcionadas por el Doctor Alejandro Castillo perteneciente de la Universidad de Texas. La BAL se creció en caldo de Man Rogosa & Sharpe (MRS) con una incubación a 37°C por 18-24 horas. Todas las bacterias patógenas fueron crecidas en caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) a 37°C por 18-24 horas.

5.3 Obtención del Sobrenadante Libre de Células (SLC) de *Pediococcus pentosaceus* CM175

El sobrenadante libre de células (SLC) se obtuvo de la siguiente manera: *Pediococcus pentosaceus* CM175, crioconservado a -80°C en el cepario del Laboratorio de Fisiología Vegetal-Molecular, se inoculó mediante azada, utilizando un asa redonda, en tubo con 10 mL de caldo MRS, se incubó a 37°C por 18 horas. Pasado este tiempo, el crecimiento de *P. pentosaceus* CM175 se utilizó para reinocular un matraz con 90 mL de caldo MRS, el cual se incubó bajo las condiciones ya mencionadas. Posterior a la segunda incubación, se utilizó nuevamente el crecimiento para inocular un matraz con 900 mL de caldo MRS, el cual se incubó bajo las especificaciones anteriormente descritas. Después de esta tercera incubación, se obtuvo el SLC del cultivo mediante centrifugación ($10,000 \times g$, 10 min, 4°C), descartando el paquete bacteriano, y filtrando el SLC con un microfiltro con tamaño de poro de $0.22 \mu\text{m}$ (Durapore® Merck Millipore, Irlanda). El SLC filtrado se liofilizó utilizando un liofilizador Labconco Freezone 4.5 (E.U.A.). 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.

5.4 Antagonismo de SLC Contra Bacterias Patógenas de Humanos

La actividad antimicrobiana del SLC se midió utilizando dos técnicas diferentes. La técnica de difusión en agar suave (Hernandez *et al.*, 2005) con pequeñas modificaciones y el ensayo de inhibición de crecimiento en microplaca (de Lima Marques *et al.*, 2017).

La técnica de difusión en agar suave se realizó en agar suave BHI, y se utilizaron las 5 bacterias patógenas para analizar su susceptibilidad al SLC. Estas bacterias se reactivaron en caldo tripticosa de soya (TSB) a 37°C por 16 horas, pasado este tiempo se recuperó el pellet bacteriano mediante centrifugación por 10 minutos a $10,000 \times g$ a 4°C . El paquete bacteriano se lavó con una solución amortiguadora de fosfatos de sodio 20 mM pH 6.5 ± 0.2 , en dos ocasiones, centrifugando con las

condiciones anteriores entre cada lavado. Al finalizar los lavados se recuperó nuevamente el paquete bacteriano mediante centrifugación con condiciones ya mencionadas. El paquete bacteriano lavado se resuspendió en la solución amortiguadora ya mencionada y se ajustó a una $DO_{600nm} = 0.1$ ($DO_{600nm}=0.1$ equivale a 1×10^6 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 se inoculó en el medio a una concentración final de 1×10^5 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL. La bacteria se mezcló con el agar suave BHI para después vaciar 18 mL en las 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 5 mm, los cuales se realizaron con pipetas Pasteur estériles, en cada uno de los pocillos se colocaron 35 μ L del SLC y se incubó a 37°C por 18-20 horas. La actividad antimicrobiana fue determinada por la medición de la zona clara alrededor del pocillo medida en centímetros con un vernier.

El ensayo de inhibición de crecimiento en microplaca se llevó a cabo en una microplaca COSTAR de 96 pocillos. Cinco μ L de una solución de bacterias patógenas 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 0, 5, 10 o 15 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.).

5.5 Parámetros Cinéticos de Inhibición de Crecimiento

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 *et al.*, 2014). No crecimiento (NC) fue reportado cuando la DO max fue menor a 0.1 unidades de absorbancia a 600 nm.

5.6 Naturaleza del Compuesto Antagónico del SLC

Para la identificación de los compuestos antagonistas que son producidos por *Pediococcus pentosaceus* CM175 y que están presentes en el SLC, se llevó a cabo la técnica realizada por Cruz-Guerrero *et al.* (2014). La técnica se basa en la búsqueda de 3 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), y se almacenó hasta su prueba de antagonismo.
- Para descartar el antagonismo por peróxido de hidrógeno, el pH del sobrenadante se neutralizó, se le adicionó catalasa, se incubó por 90 minutos a 25°C y 10 minutos a 65 °C para posterior almacenaje.
- Si el antagonismo se mantenía, 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 utilizó la técnica de difusión en agar suave con pocillos utilizando la bacteria *Listeria monocytogenes* como bacteria indicadora.

5.7 Identificación de Genes Estructurales de Bacteriocinas

En concordancia con los resultados obtenidos, se buscó la presencia de posibles genes estructurales que codifiquen para bacteriocinas secretadas por el género bacteriano *Pediococcus*, específicamente pediocinas. Se realizó la extracción del ADN genómico de la cepa CM175

utilizando el kit comercial QIAamp DNA mini kit y sus respectivas indicaciones (Anexo 1). Los iniciadores utilizados fueron: sentido 5'-TTA CTT GTG GCA AAC ATT CCT G-3' y el antisentido 5'-TGA TTA CCT TGA TGT CCA CCA G-3', de acuerdo a las condiciones establecidas por Macwana and Muriana (2012) para identificar el gen *papA*. La reacción de PCR contenía los siguientes componentes: 10 µL de SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, CA, E.U.A.), 1 µL de cada iniciador y 12 ng de ADNg para un volumen final de 20 µL. Con estos ingredientes se realizó la corrida en el equipo de PCR en tiempo real StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, E.U.A.). El producto de PCR se mandó secuenciar a Macrogen Inc (Seúl, Corea del Sur), este resultado se analizó mediante el algoritmo de BLAST y se realizaron comparaciones con la base de datos GenBank.

5.8 Purificación del Compuesto Tipo Bacteriocina

La purificación del compuesto tipo bacteriocina se llevó a cabo realizando una cromatografía de intercambio catiónico para después realizar una separación de proteínas por tamaño utilizando amicones con membranas de diferentes tamaños (5, 10, 30 y 50 kDa).

5.8.1 Cromatografía de Intercambio Catiónico y Separación de Proteínas por Tamaño

La cromatografía de intercambio catiónico se llevó a cabo con una columna SP sefarosa de 5 mL. El equipo en el que se realizaron las corridas cromatográficas es un FPLC (cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad) (Pharmacia Biotech Inc., NJ, E.U.A.) y las soluciones amortiguadoras utilizadas fueron los siguientes: Solución de lavados (A), fosfatos de sodio 20 mM pH 6.5 ±0.2; solución de elución (B), fosfatos de sodio 20 mM pH 6.5 ±0.2, adicionado con cloruro de sodio 1M. Después de realizar la cromatografía, se procedió a realizar una separación de proteínas en base a su tamaño, utilizando un sistema de filtración Amicon® (Merck, Darmstadt, Alemania) de

diferentes tamaños (3, 10, 30 y 50 kDa) y centrifugando a 4,000 x g por 3 min a 10°C, además con estas condiciones también se eliminó la cantidad de sal de la muestra.

5.8.2 Cuantificación de Proteína

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 2), teniendo una curva de albumina sérica (0-2000 µg/mL) como referencia para extrapolar los valores de densidad óptica previamente obtenidas de las muestras evaluadas.

5.8.3 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Para realizar las electroforesis en poliacrilamida con condiciones desnaturalizantes y reductoras se utilizaron geles de 15% de acrilamida, los cuales fueron teñidos con tinción azul de Coomassie (Laemmli, 1970). Posterior a la tinción, se identificaron las bandas de cada muestra y se procedieron a cortarse e identificarse mediante espectrometría de masas.

5.9 Pruebas de Estabilidad del Compuesto Tipo Bacteriocina: Temperatura, pH y Proteasas

La estabilidad de la bacteriocina se evaluó utilizando como variables los siguientes factores: temperatura, pH, y proteasas. Las técnicas utilizadas fueron las presentadas por Vaillancourt *et al.*, 2015 con pequeñas modificaciones.

5.9.1 Pruebas de Estabilidad a Diferentes Temperaturas

Se tomaron 100 μL de una solución de proteína con una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ a un pH de 6.5, para evaluar cada una de las temperaturas (4°C, 10°C, 25°C, 37°C, 50°C, 70°C, 90°C, 100°C y 121°C). Este volumen se dividió en dos alícuotas (dos réplicas), ambas se incubaron por 30 minutos a cada una de las temperaturas analizadas. Transcurrido el tiempo, las muestras se incubaron a temperatura ambiente (25°C) por 10 minutos y se procedió a realizar la prueba de antagonismo en placa, utilizando *L. monocytogenes* como bacteria testigo.

5.9.2 Pruebas de Estabilidad a Diferentes Valores de pH

Para realizar las pruebas de estabilidad a pH se utilizó el volumen y la concentración de proteína ya mencionada en las pruebas de estabilidad a temperatura, así como también se realizaron 2 réplicas. Ambas réplicas se incubaron por 60 minutos, a temperatura ambiente, a cada uno de los valores de pH seleccionados. Transcurrido el tiempo, a las muestras se les ajustó el pH a 7 y se procedió a realizar la prueba de antagonismo en placa, utilizando *L. monocytogenes* como bacteria testigo. Los valores de pH evaluados fueron 3, 5, 7, 9 y 11.

5.9.3 Pruebas de Estabilidad a Diferentes Proteasas

Para realizar las pruebas de estabilidad a actividad de proteasas se utilizó el volumen y la concentración de proteína ya mencionada en las pruebas de estabilidad anteriores, al igual que la utilización de 2 réplicas. Ambas réplicas, se ajustó el pH a 7, se les adicionaron las proteasas por separado a una concentración final de 1 mg/mL y se incubaron a 37°C por 120 minutos. Transcurrido el tiempo, las muestras se incubaron a 65°C por 10 minutos y se procedió a realizar la prueba de antagonismo en placa, utilizando *L. monocytogenes* como bacteria testigo. Las proteasas evaluadas fueron tripsina, proteinasa K y proteasa.

5.10 Efecto de Bacteriocina sobre *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium.

El efecto de la bacteriocina obtenida de *Pediococcus pentosaceus* CM175 sobre las bacterias *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium, se evaluó mediante microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión, para esto se utilizó una solución con una concentración proteica de 200 µg/mL y se analizaron muestras del tiempo cero, como control, y 2 horas de incubación después de aplicar la solución proteínica.

5.10.1 Microscopía de Fluorescencia

La microscopía de fluorescencia se utilizó con el fin de detectar si el daño que provoca la molécula tipo bacteriocina producida por *Pediococcus pentosaceus* CM175, sobre bacterias susceptibles como lo son *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*, es sobre la membrana celular, utilizando una doble tinción con fluorocromos (yoduro de propidio y fluoresceína) y una concentración celular de 1×10^7 UFC/mL con y sin tratamiento. El yoduro de propidio se utilizó a una concentración de 1 mg/mL mientras que la fluoresceína se utilizó a una concentración de 50 µM, posterior a la adición de los fluorocromos, la mezcla se incubó a 37°C por 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados con buffer de fosfatos de sodio 20 mM pH 6.5, al terminar los lavados, las muestras se colocaron en un portaobjetos y fueron visualizadas utilizando un microscopio de fluorescencia Axioskope A1 (Carl Zeiss, Alemania) equipado con un set de filtros 09 (Fluoresceína) y otro set de filtros 20 (rodamina F). Las imágenes fueron tomadas utilizando el software Zeiss Axionvision 4.8.3 y el objetivo de inmersión 100 X (Aguilar-Toalá *et al.*, 2017).

5.10.2 Microscopía Electrónica de Transmisión

Los experimentos de microscopía electrónica de transmisión fueron realizados en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión de la Universidad de Sonora (LMET-UNISON).

La morfología y el daño celular de bacterias patógenas fue determinado utilizando imágenes obtenidas en un microscopio electrónico de transmisión (MET) JEM 2010F con un voltaje de operación de 200 Kv (JEOL, Ltd., Japón) (Laboratorio de microscopía electrónica de transmisión Universidad de Sonora). Las diferentes observaciones realizadas fueron utilizando bacterias con y sin incubación con la BLIS producida por *P. pentosaceus* CM175 y utilizando una tinción negativa con el reactivo ácido fosfotúngstico (1%) y realizando cortes generados con un ultramicrotomo. Para la tinción negativa: Se colocaron 5 μL de una solución bacteriana a una concentración de 7×10^9 UFC/mL en una rejilla de monóxido de silicón tipo A con cobre (300 mesh) (PELCO®, CA, E.U.A.) y se dejaron secar a temperatura ambiente. Después de secarse, se agregan 3 μL de ácido fosfotúngstico 1% a la rejilla y se incubó por 5 minutos, removiendo el exceso pasado este tiempo. Las muestras fueron secadas al vacío para su posterior observación en el MET (González-Pérez *et al.*, 2019). Las imágenes fueron visualizadas y editadas utilizando los softwares ImageJ (National Institutes of Health) y DigitalMicrograph™ (Gatan Inc.). Además, para las imágenes obtenidas de los cortes obtenidos con el ultramicrotomo se siguió el siguiente procedimiento: se realizaron cortes de las bacterias utilizando un ultramicrotomo (LEICA EM UC7, Alemania) con un grosor de 80 nm. Para realizar los cortes mencionados, previamente las bacterias se sometieron a un procedimiento que consta de fijación, deshidratación e inclusión de la resina Spurr. La fijación constó de los siguientes pasos: 1) Las bacterias se incubaron con glutaraldehído al 2 % por 2 horas a 4 °C, después, se centrifugó a $10,000 \times g$ x 10 min a 4 °C y se decantó; 2) Se agregó cacodilato de sodio 0.1 M, se resuspendió el paquete bacteriano y se incubó por 10 min a 4 °C, transcurrido el tiempo se centrifugó la muestra con las condiciones mencionadas anteriormente y se decantó; 3) Se añadió tetraóxido de osmio al 1%, se resuspendió el paquete bacteriano, se incubó por 1 h a 4 °C, se centrifugó y se decantó; 4) Nuevamente, se agregó cacodilato de sodio 0.1 M, se resuspendió el paquete bacteriano y se incubó por 10 min a 4 °C, se centrifugó y se decantó; 5) Por último, se resuspendió el paquete bacteriano y se trasladó la muestra al LMET-UNISON, donde se realizó la deshidratación, inclusión de la muestra en resina Spurr y se realizaron los cortes con el

ultramicrotomo. Las muestras se colocaron en rejillas y fueron secadas al vacío para su posterior observación en el MET (González-Pérez *et al.*, 2019). Las imágenes fueron visualizadas y editadas utilizando los softwares ImageJ (National Institutes of Health) y DigitalMicrograph™ (Gatan Inc.).

5.11 Identificación de la Sustancia Inhibitoria Tipo Bacteriocina Mediante Espectrometría de Masas

La identificación de la sustancia inhibitoria tipo bacteriocina (BLIS) se realizó por servicio en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) de la Ciudad de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México. La muestra que se envió fue la banda de gel de electroforesis visualizada con azul de Coomassie, correspondiente a la fracción con actividad antagonica.

5.12 Diseño y Análisis Estadístico

5.12.1 Técnica de Difusión en Agar Suave

El factor a evaluar fue la susceptibilidad de cada una de las bacterias patógenas al SLC. Se realizaron 4 repeticiones del antagonismo mediante la técnica de difusión en agar suave del SLC completo, así como de los ensayos donde se analizó la naturaleza del compuesto antagonico. El análisis de los resultados de antagonismo contra las bacterias patógenas fue estadística descriptiva, mientras que, para el ensayo de determinación de la naturaleza del compuesto antagonico se utilizó un diseño completamente al azar con un análisis de varianza y una prueba de Tukey-kramer para comparar medias ($p < 0.05$). En ambos ensayos la variable respuesta fue el halo de inhibición.

5.12.2 Ensayos de Inhibición de Crecimiento en Microplaca

Los ensayos de inhibición de crecimiento en microplaca tanto del SLC completo, así como los ensayos donde analizó el efecto del pH y compuestos proteínicos sobre la actividad antagónicas se llevaron a cabo con un diseño completamente al azar, donde la variable respuesta fueron las curvas de crecimiento, y se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, al comprobar que había diferencias entre los datos, se utilizó la prueba de Duncan para comparar medianas. Estos ensayos se realizaron por duplicado. El factor a evaluar fue la susceptibilidad, al SLC completo, al pH y a los compuestos proteínicos, de cada una de las bacterias patógenas examinadas.

5.12.3 Análisis de Datos Obtenidos de la Curva de Crecimiento Bacteriano

Los valores cinéticos como lo son: fase lag (min), tasa de crecimiento (h^{-1}), D.O. max (λ 600 nm) y tiempo de duplicación (min) fueron analizados con estadística descriptiva. Cada uno de estos valores fue afectado por la adición del SLC.

5.12.4 Estabilidad de BLIS

Los diferentes ensayos de estabilidad a temperatura, pH y proteasas fueron analizados mediante estadística descriptiva.

6. RESULTADOS

Los resultados presentados a continuación se encuentran en orden de cumplimiento de cada uno de los objetivos particulares planeados para esta investigación. El objetivo 1, el cual establece que se evaluaría el efecto antagónico del sobrenadante libre de células de *Pediococcus pentosaceus* CM175 (aislada de melón cantaloupe) contra *Salmonella* Saintpaul, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, se cumple al obtener los resultados del perfil antagónico ejercido por el SLC de *Pediococcus pentosaceus* CM175 (Sección 6.1)

6.1 Perfil Antagónico del SLC de *Pediococcus pentosaceus* CM175

El sobrenadante libre de células (SLC) producido por *Pediococcus pentosaceus* CM175 logró ejercer antagonismo contra *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* y *S. Saintpaul*, bacterias patógenas utilizadas en el ensayo de difusión en agar suave (Cuadro 4). De estas 4 bacterias, 2 son Gram positivas (*L. monocytogenes* y *S. aureus*) y 2 Gram negativas (*S. Typhimurium* y *S. Saintpaul*). Se observó claramente que la bacteria que presenta mayor susceptibilidad a este SLC fue *L. monocytogenes*. Mientras que, *E. coli* O157:H7 no es susceptible al SLC por medio de la técnica de difusión en agar suave. Con el fin de comprobar actividad del SLC contra *E. coli* O157:H7 se realizó la prueba de inhibición de crecimiento en microplaca, incluyendo las bacterias patógenas analizadas en el ensayo de difusión en agar suave.

Cuadro 4. Antagonismo del sobrenadante libre de células de *Pediococcus pentosaceus* CM175 por el método de difusión en agar suave.

Bacteria patógena	Zona de inhibición (cm)	Tinción Gram
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.7 ± 0.1	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.7 ± 0	+
<i>Salmonella Typhimurium</i>	0.6 ± 0.1	-

<i>Salmonella Saintpaul</i>	0.6 ± 0	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	0	-

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

Como se puede ver en la figura 3, se muestra que 15 µL del SLC son suficientes para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* y *S. Saintpaul*, mientras que este volumen de SLC causa un retraso de 10 horas en el crecimiento de *E. coli* O157:H7.

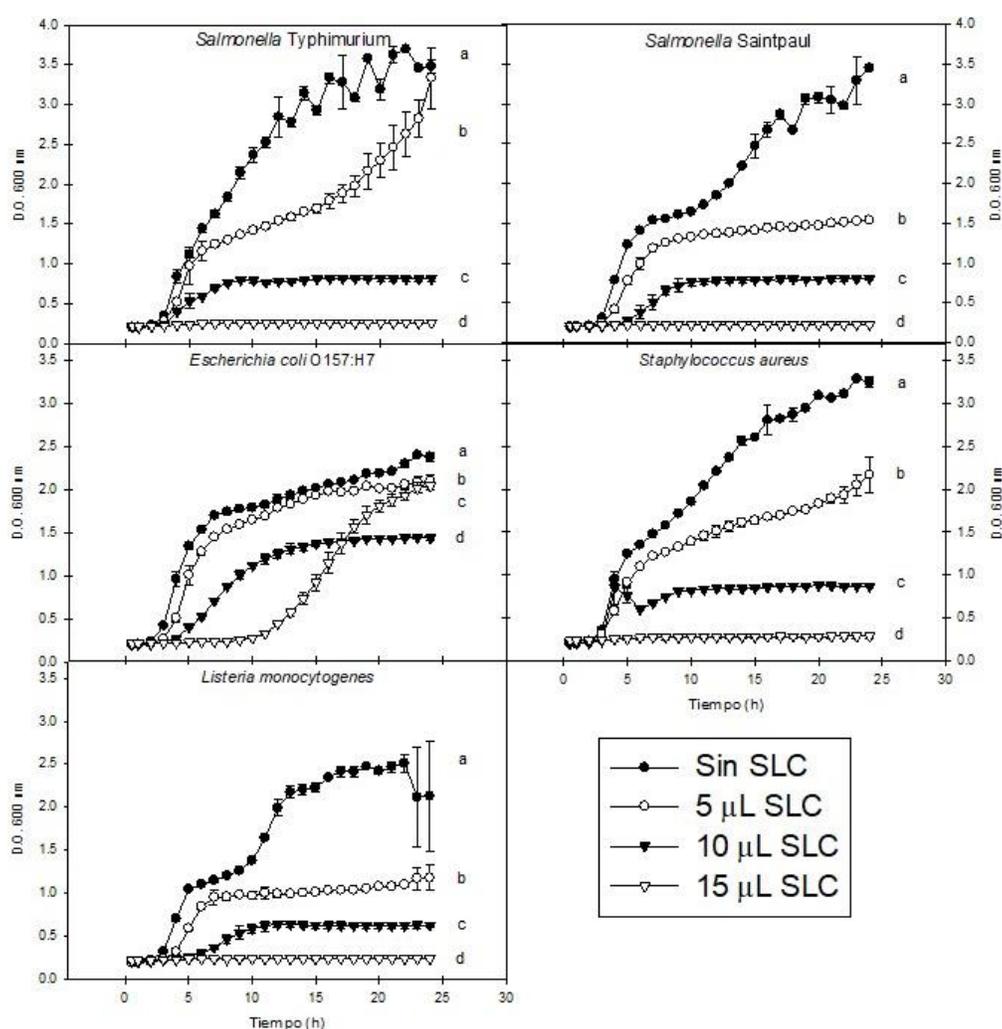


Figura 3. Curvas de crecimiento de bacterias patógenas sometidas a tratamientos con sobrenadante libre de células de *Pediococcus pentosaceus* CM175. SLC: Sobrenadante libre de células producido por *Pediococcus pentosaceus* CM175. Cada punto de las gráficas representa la media de dos experimentos y las líneas representan sus desviaciones estándar. Diferentes literales representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$)

Los parámetros cinéticos de las bacterias patógenas se calcularon utilizando los datos de la curva de crecimiento bacteriano. Estos valores están representados en el Cuadro 5. Se puede observar la inhibición del crecimiento que ejerció el SLC sobre las bacterias patógenas *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* y *S. Saintpaul*, al no haber crecimiento de estas bacterias no pudieron determinarse mencionados valores, por otro lado, en la bacteria en la que si se pudieron determinar (*E. coli* O157:H7), los valores de la fase lag y el tiempo de duplicación fueron aumentados 10 y 3 veces respectivamente, mientras que la tasa de crecimiento y la D.O. max fueron disminuidos a un 25% y a un 80%, respectivamente.

Cuadro 5. Valores cinéticos obtenidos de la curva de crecimiento de las bacterias patógenas tratadas con 15 μ L de SLC de *Pediococcus pentosaceus* CM175.

Muestra	Fase Lag (min)	Tasa de crecimiento (h^{-1})	D.O. max (λ 600 nm)	Tiempo de duplicación (min)	R ²
<i>S. Typhimurium</i>					
Control	21.65 \pm 20.4	4.92 \pm 0.24	3.497 \pm 0	8.5 \pm 0.4	0.95
SLC CM175	NC	NC	NC	NC	-
<i>S. Saintpaul</i>					
Control	61.85 \pm 25.9	1.99 \pm 0.2	3.284 \pm 0.04	21.05 \pm 2.2	0.99
SLC CM175	NC	NC	NC	NC	-
<i>E. coli</i>					
Control	41.2 \pm 19.5	1.97 \pm 0.6	2.21 \pm 0.02	22.1 \pm 6.8	0.99
SLC CM175	419.6 \pm 21.2	0.56 \pm 0.01	1.843 \pm 0.04	74.3 \pm 2.1	0.99
<i>S. aureus</i>					
Control	51.1 \pm 22.7	3.43 \pm 2.46	3.194 \pm 0.1	16.3 \pm 11.7	0.96
SLC CM175	NC	NC	NC	NC	-
<i>L. monocytogenes</i>					
Control	58.6 \pm 37.2	1.69 \pm 0.55	2.438 \pm 0.01	25.95 \pm 8.4	0.99
SLC CM175	NC	NC	NC	NC	-

SLC CM175: Sobrenadante libre de células producido por *Pediococcus pentosaceus* CM175. NC: No crecimiento. Los resultados están representados como media \pm desviación estándar de 2 mediciones.

Con los ensayos de inhibición de crecimiento realizados en este punto, se concluye que el SLC de *P. pentosaceus* CM175 puede inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas (*L. monocytogenes* y *S. aureus*) y de bacterias Gram negativas (*S. Typhimurium* y *S. Saintpaul*), además logra alargar 10 veces la fase lag de la curva de crecimiento de *E. coli* O157:H7 mostrando un efecto bacteriostático sobre esta bacteria en un lapso de 10 horas.

6.2 Naturaleza del Compuesto del SLC con Actividad Antagónica

Con el propósito de cumplir con el objetivo 2, en el cual se identificaría la naturaleza del compuesto que confiere antagonismo a *Pediococcus pentosaceus* CM175 contra *Listeria monocytogenes* (modelo de bacteria Gram positiva) y *Salmonella Typhimurium* (modelo de bacteria Gram negativa), se presentan los resultados obtenidos en la presente sección.

Después de confirmar que el SLC presenta antagonismo contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, se procedió a determinar la naturaleza de los compuestos con actividad antagónica que secreta la bacteria *P. pentosaceus* CM175. Para lograr esto, se utilizó una bacteria modelo para las bacterias Gram positivas (*L. monocytogenes*) y una bacteria para las Gram negativas (*S. Typhimurium*). Primeramente, se realizó el ensayo de difusión en agar suave, donde se obtuvieron los resultados para ácidos orgánicos (AO), peróxido de hidrógeno (PH) y compuestos proteínicos (CP), mostrados en el Cuadro 6. Al neutralizar el pH y eliminar el efecto de los AO, la actividad del SLC, dada por PH y CP no perdió actividad contra *L. monocytogenes* manteniendo halos de inhibición alrededor de 1.7 cm y sin haber diferencias significativas en los resultados; sin embargo, la actividad contra *S. Typhimurium* se perdió por completo cuando se neutralizó el pH del SLC de *P. pentosaceus* CM175. La actividad antagónica contra *L. monocytogenes* se conservó después de incubar el SLC con catalasa, no obstante, la actividad antagónica se perdió al incubar el SLC con proteasas. Los resultados muestran que la actividad del SLC contra *S. Typhimurium* depende únicamente de compuestos ácidos, entre los que pueden estar ácido láctico, ácido propiónico y/o ácido acético. Por otro lado, se muestra que el SLC contiene compuestos ácidos y compuestos de origen proteínico para generar actividad antagonista contra *L. monocytogenes*.

Cuadro 6. Efecto de los metabolitos presentes en el SLC de *P. pentosaceus* CM175 sobre el crecimiento de dos bacterias indicadoras (*L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*) mediante la técnica de difusión en agar suave.

Bacteria indicadora	Metabolito	Zona de inhibición (cm)
<i>Listeria monocytogenes</i>	AO, PH y CP	1.775 ± 0.05 ^a
	PH y CP	1.825 ± 0.05 ^a
	CP	1.65 ± 0.13 ^a
<i>Salmonella Typhimurium</i>	AO, PH y CP	0.5 ± 0.082 ^b
	PH y CP	0 ^c
	CP	0 ^c

AO: Ácidos orgánicos; PH: Peróxido de hidrógeno; CP: Compuestos proteínicos. Los resultados están representados como media ± desviación estándar de 4 réplicas. Diferentes literales representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$)

Después de la obtención de los resultados del ensayo de difusión en agar suave se procedió a analizar la naturaleza del SLC mediante el ensayo de inhibición de crecimiento en microplaca, con el fin de comprobar que la naturaleza del compuesto antagonista del SLC fueron compuestos de origen ácido y compuestos de origen proteínico. La Figura 4 muestra que la curva de crecimiento de *L. monocytogenes*, así como de *S. Typhimurium* se modificó por acción del SLC tratado con diferentes enzimas y/o compuestos. Se puede observar que el SLC, después de haberse sometido a los diferentes tratamientos, conserva parte de su actividad antagonista, siendo este efecto contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Mediante este ensayo se pudo comprobar que la actividad del SLC se debe tanto a compuestos ácidos como compuestos proteínicos.

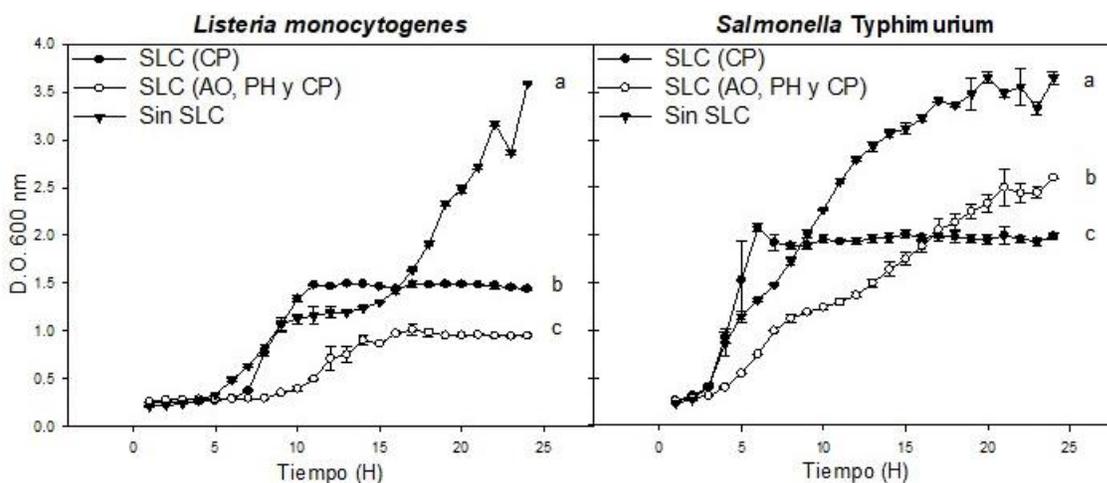


Figura 4. Efecto de los metabolitos presentes en el SLC de *P. pentosaceus* CM175 sobre *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium. Efecto sobre el crecimiento de dos bacterias indicadoras (Izquierda: Bacteria Gram positiva; Derecha: Bacteria Gram negativa) mediante la técnica de inhibición de crecimiento en microplaca. SLC: Sobrenadante libre de células de *Pediococcus pentosaceus* CM175. CP: Compuestos proteínicos. AO: Ácidos orgánicos. PH: Peróxido de hidrógeno. Cada punto de las gráficas representa la media de dos experimentos y las líneas representan sus desviaciones estándar. Diferentes literales representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$)

Con el fin de establecer bases moleculares para comprobar que la actividad antagonica del SLC puede estar mediado por la secreción de una o más bacteriocinas, se realizó una PCR en punto final utilizando iniciadores específicos, y esta amplificación se mandó secuenciar a Macrogen Inc. Al obtener los resultados de la secuenciación del gen (Anexo 3), se comprobó que en efecto se trataba de un segmento de ADN que codifica para genes estructurales de bacteriocinas y en específico del gen *papA* que forma parte de los genes estructurales que codifican para pediocinas producidas por el género *Pediococcus*.

Con los resultados obtenidos en esta sección, se puede concluir que la bacteria *Pediococcus pentosaceus* CM175 puede ejercer actividad antagonica mediante la producción de metabolitos de naturaleza ácida y naturaleza proteínica, con lo cual se cumple con el objetivo 2. En específico, con el metabolito proteínico fue importante continuar con sus estudios debido a que los estudios moleculares mostraron genes estructurales de bacteriocinas del género *Pediococcus* (Anexo 3), lo que indica la presencia de bacteriocinas en el SLC de la cepa CM175.

6.3 Purificación de BLIS, su Estabilidad y su Secuencia Aminoacídica.

El objetivo 3, el cual fue purificar al menos una bacteriocina y realizar pruebas de estabilidad contra temperatura, pH y proteasas, así como definir la secuencia aminoacídica mediante espectrometría de masas, se cumple con los resultados presentados en esta sección.

Al obtener los resultados que indicaron la presencia de una sustancia inhibitoria tipo bacteriocina (BLIS, en inglés) en el SLC de *P. pentosaceus* CM175, se procedió a su purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico, con el fin de obtener una fracción que conserve su actividad antagonica. Al realizar la cromatografía se obtuvieron fracciones con proteínas en la elución al 10% y al 50% del buffer de elución. Las fracciones proteínicas que se obtuvieron al realizar la corrida cromatográfica fueron analizadas mediante la técnica de difusión en agar suave utilizando *L. monocytogenes* como bacteria testigo. La actividad antagonica se presentó en la fracción de los lavados y en la fracción del 50%, eligiendo la fracción del 50% para seguir con los análisis debido a que en los lavados existía una gran cantidad de proteínas y carbohidratos pertenecientes aún al SLC.

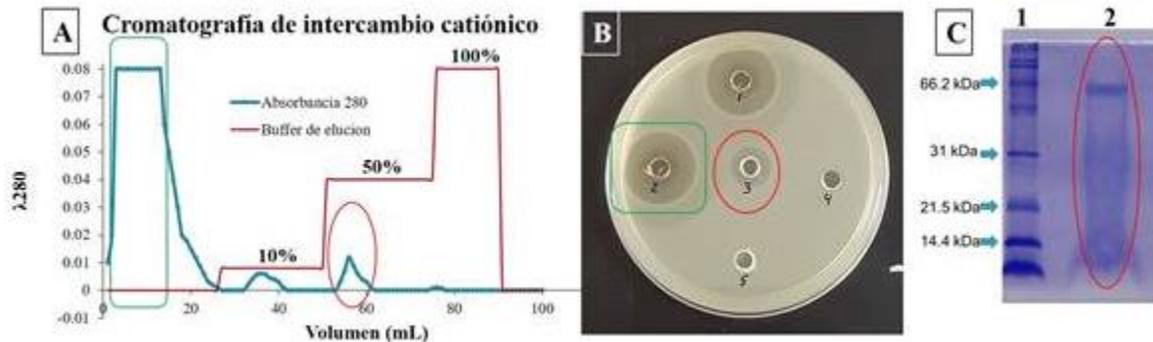


Figura 5. Purificación de compuesto proteico contenido en el SLC de *P. pentosaceus* CM175. A: Cromatograma de intercambio catiónico (CIC) del SLC. B: Ensayo de inhibición de crecimiento de fracciones derivadas de la CIC. 1: SLC, 2: Proteína no unida a columna, 3: Elución al 50%, 4: Elución al 10%, 5: Elución al 100%. Rojo: BLIS de interés; Verde: Proteína no unida a columna que mantiene actividad antagonica. Bacteria testigo: *Listeria monocytogenes*. C: Gel de electroforesis teñido con azul de Coomassie. 1: Marcador de peso molecular; 2: BLIS >50 kDa.

La fracción del 50% se sub-fraccionó por tamaños, utilizando membranas de tamaños de poros de 3, 10, 30 y 50 kDa. La fracción con tamaño de 50 kDa o mayor mantuvo la actividad antagonica por lo que la BLIS que se encuentra causando daños a bacterias susceptibles es de 50 kDa o más grande, resultando diferente con la mayoría de bacteriocinas publicadas.

Con el fin de visualizar las proteínas presentes en la fracción del 50 % del SLC con actividad antagonica, se realizó la electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE) después de realizar la separación de esta fracción por tamaños. Se detectó una proteína dentro de la fracción del 50 % con un tamaño aproximado a 60 kDa (Figura 5C), evidenciando una purificación de la muestra de BLIS, sin embargo, la relevancia de este resultado es que la proteína presenta un tamaño mucho más grande que la mayoría de las bacteriocinas reportadas para el género *Pediococcus*.

Al comprobar que la actividad antagonica se encontraba presente en la fracción de BLIS obtenida al 50% del buffer de elución por cromatografía de intercambio catiónico, se procedió a analizar su estabilidad a diferentes variables fisicoquímicas como lo son: pH, temperatura, tiempo y proteasas. La termoestabilidad de la BLIS es bastante interesante, ya que su actividad se mantuvo desde los 4°C hasta los 100°C, no obstante, a 100°C la BLIS no mantiene el 100% de su actividad, mantiene el 78% de esta. La actividad de la BLIS obtenida de la purificación parcial pierde totalmente su actividad a 121°C (Figura 6A). La BLIS de la fracción del 50 % logró mantener su actividad después de haber sido sometida a pH ácidos (3 y 5) y pH neutro (7), no obstante, la actividad se pierde al incubar la muestra a pH básicos (9 y 11) (Figura 6B). Las proteasas tripsina, proteinasa K y proteasa, inhibieron completamente la actividad bacteriocinogénica de la fracción del 50 % de la BLIS estudiada (Figura 6C).

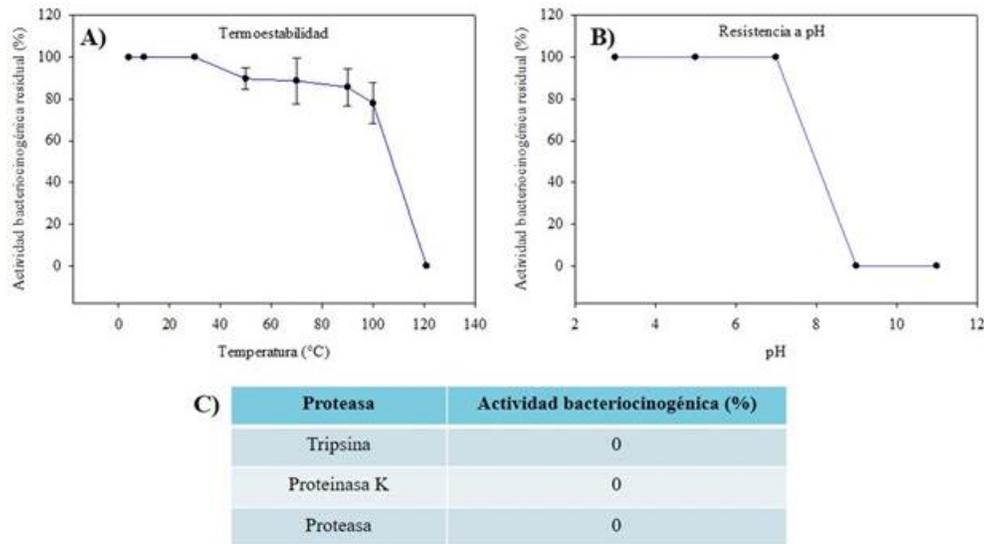


Figura 6. Estabilidad de BLIS producida por *Pediococcus pentosaceus* CM175. A) Estabilidad a temperatura; B) Estabilidad a pH; C) Estabilidad a proteasas. Cada punto de las figuras A y B representa la media de tres repeticiones \pm desviación estándar.

Para cumplir con los objetivos planteados dentro de esta investigación, se realizó la identificación de la BLIS CM175 mediante espectrometría de masas. La banda de 60 kDa que se identificó es la que se observa en la Figura 7. Los resultados señalan la identificación de una proteína que no ha sido reportada como metabolito de la bacteria *Pediococcus pentosaceus* (Cuadro 7). Para llegar a esta conclusión, se identificaron 2 péptidos, cuyas secuencias se encuentran en el Cuadro 7, estos péptidos sólo se encuentran en esta proteína dentro del género *Pediococcus*, lo cual es suficiente para tener una identificación aceptable. Al realizar el análisis de esta proteína y realizar un alineamiento contra las bases de datos se obtuvo una semejanza del 100% con una proteína de cápside de un fago que tiene un peso molecular de 49.2 kDa con un punto isoelectrico de 4.89 (Cuadro 7).

Cuadro 7. Datos del análisis por LC-MS/MS para la identificación de la proteína de *Pediococcus pentosaceus* CM175 y búsqueda en la base de datos por homología.

Banda	Proteína experimental (Proteína homóloga)	Número de acceso ^a	PM Exp ^b	PM teo/ <i>pI</i> ^c	Score ^d	PM ^e / SC ^f	Secuencias de los péptidos
A	Proteína no caracterizada (Proteína de cápside de fago)	A0A1Y0VNL4	60 kDa	49.2 kDa /4.89	32.56	2/5%	K.SDPEGKPK.G R.NAGEQRLNLTNK. A

^a Número de acceso a la base de datos de proteínas UniProt; ^b Peso molecular experimental; ^c Peso molecular teórico y punto isoeléctrico; ^d PEAKS Score reportado después de la búsqueda contra la base de datos de *Pediococcus pentosaceus* perteneciente a UniProt (7304 secuencias, noviembre 2020). Score >20 indica identidad o extensa homología. ^e Péptidos emparejados; ^f Cobertura de la secuencia.

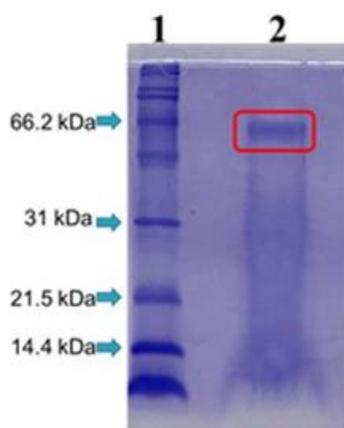


Figura 7. Gel de electroforesis teñido con azul de Coomassie. 1: Marcador de peso molecular; 2: BLIS >50 kDa. Rojo: Banda identificada por espectrometría de masas.

Analizando los resultados de esta sección se puede concluir que la BLIS obtenida de la bacteria *P. pentosaceus* CM175, se purificó y se determinó que es estable a 100°C por 15 minutos y a pH ácidos. No obstante, esta proteína es susceptible a pH básicos y a las proteasas utilizadas (tripsina, proteinasa K y proteasa), además se identificó como una proteína que no ha sido caracterizada de la bacteria *P. pentosaceus*. Dicha proteína es idéntica a una proteína de cápside de un bacteriófago. Después de purificar, analizar su estabilidad e identificar la BLIS, se procedió a cumplir con el último objetivo.

6.4 Efecto de BLIS sobre *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium

El objetivo número 4 y final fue determinar el efecto de bacteriocina sobre la membrana celular de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium utilizando técnicas microscópicas, este objetivo se cumple con los resultados presentados en la presente sección.

Un aspecto importante en la caracterización de una molécula con actividad antagonista es tratar de definir el lugar diana de esta, en este sentido las microscopías son una herramienta para tratar de definir este sitio. En esta investigación, la microscopía de fluorescencia y la microscopía electrónica de transmisión nos apoyaron para definir el efecto de BLIS sobre la membrana celular o su internalización a las bacterias susceptibles. La microscopía de fluorescencia nos muestra claramente que BLIS causa daños importantes a la membrana, esto se sabe debido a que esta microscopía consta de una doble tinción, primero en la que se utiliza yoduro de propidio, fluorocromo que entra a las células y presentan un daño a la membrana celular que con el set de filtros 20 se visualizan estas células dañadas de color rojo, y también se utiliza fluoresceína, fluorocromo que con set de filtros 09 exhibe en color verde a las células que se encuentran sin daño a la membrana celular. En las micrografías de fluorescencia podemos ver como el tratamiento, que en este caso es la BLIS añadida, causa daños a las membranas de *L. monocytogenes* y de *S. Typhimurium*, lo cual queda en evidencia en las Figuras 8 y 9, respectivamente, donde con el paso del tiempo se observa un mayor número de células de color rojo en comparación con su control respectivo.

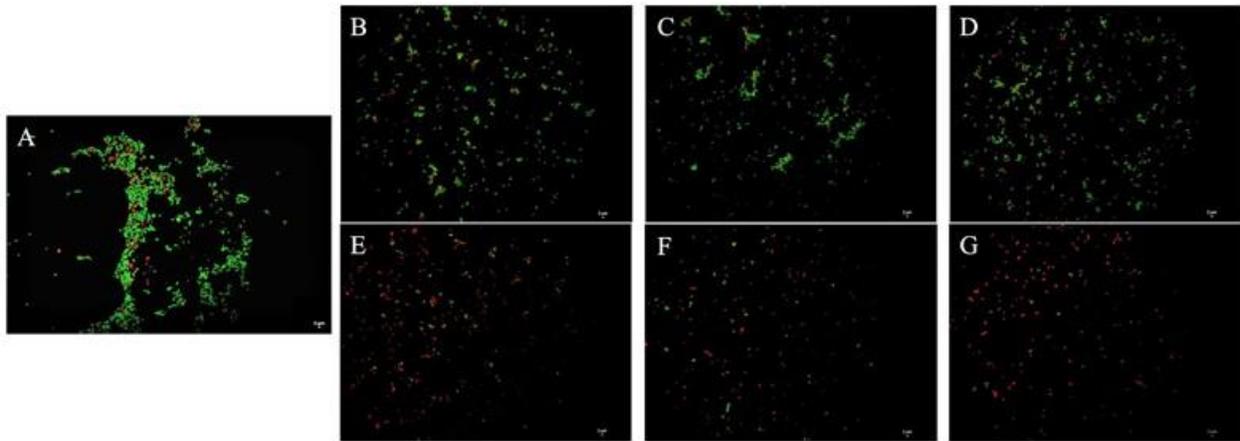


Figura 8. Micrografías de fluorescencia de *Listeria monocytogenes* con y sin BLIS (Sustancia inhibitoria tipo bacteriocina). A) Tiempo 0; B), C) y D): Control después de 1, 2 y 4 horas de incubación, respectivamente; E), F) y G): Tratamiento (BLIS) después de 1, 2 y 4 horas de incubación, respectivamente. Escala = 2 μ m.

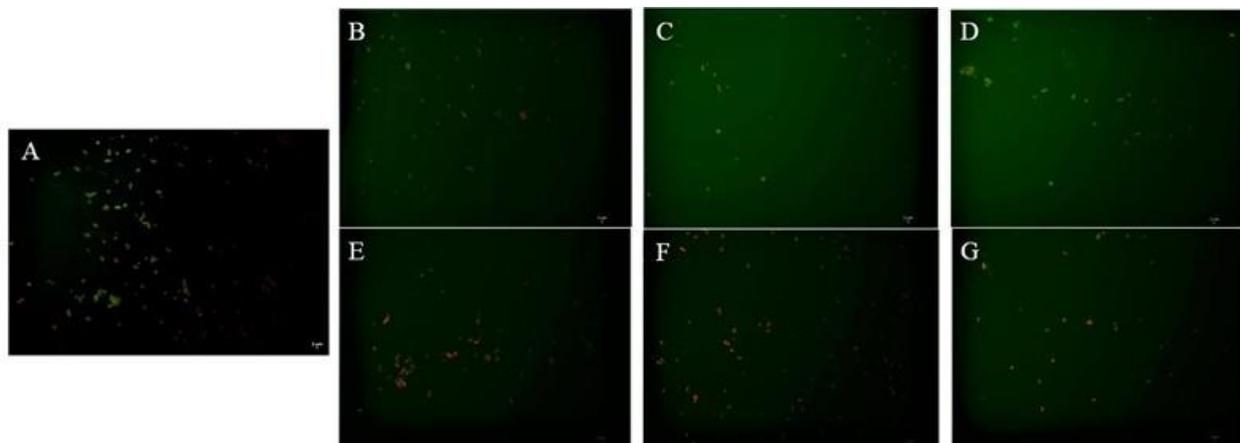


Figura 9. Micrografías de fluorescencia de *Salmonella* Typhimurium con y sin BLIS (Sustancia inhibitoria tipo bacteriocina). A) Tiempo 0; B), C) y D): Control después de 1, 2 y 4 horas de incubación, respectivamente; E), F) y G): Tratamiento (BLIS) después de 1, 2 y 4 horas de incubación, respectivamente. Escala = 2 μ m.

En cuanto a la microscopía electrónica de transmisión, nos muestra imágenes a mayor escala en la cual se puede observar la estructura de las bacterias y el daño posible. En este sentido, en la Figura 10 se presentan las micrografías electrónicas de *L. monocytogenes* que fueron obtenidas de dos maneras, una utilizando una tinción negativa con ácido fosfotúngstico, y otra realizando cortes con un ultramicrotomo y tiñendo con tetraóxido de osmio (OsO₄). La Figura 10 muestra imágenes del control (1A y 2A) y del tratamiento (BLIS añadida) (1B y 2B) donde se evidencia el daño de la

membrana de la bacteria, en estas micrografías se observa claramente la pérdida de continuidad de la estructura de la membrana bacteriana, asumiendo que es el sitio diana de la BLIS en nuestro caso específico. En la Figura 10-1A se observa la estructura y forma de una bacteria control mientras que la Figura 10-1B se observa una estructura totalmente dañada con una membrana prácticamente destruida. Por otro lado, las Figuras 10-2A y 10-2B son muestras que se capturaron después de someter la muestra al proceso de ultramicrotomía. En la Figura 10-2A, se observa la estructura de una bacteria control, con una membrana celular completamente intacta; mientras que en la Figura 10-2B se observa una interrupción en la integridad de la membrana, que puede ser debida al daño que provoca BLIS sobre la pared celular de la bacteria susceptible, lo cual provocó la salida de material intracelular y por lo tanto, daño y muerte.

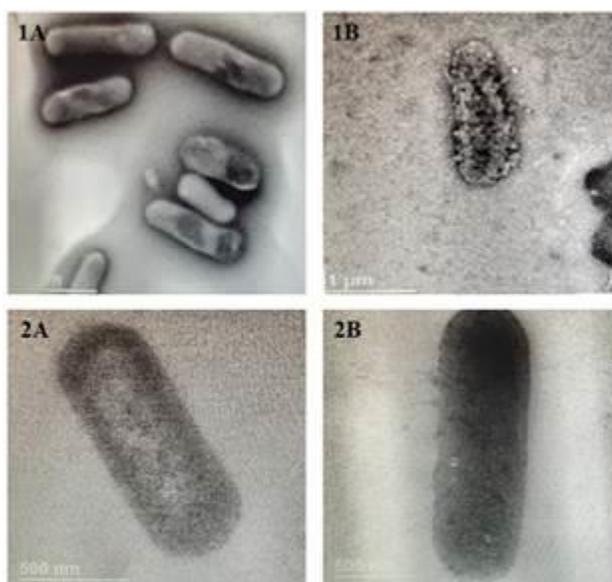


Figura 10. Micrografías electrónicas de transmisión de *Listeria monocytogenes*. 1) Micrografías con tinción negativa, 2) Micrografías con ultramicrotomía; A) Muestras control, B) Muestras tratadas e incubadas con BLIS por 2 horas.

7. DISCUSIÓN

Diferentes BAL tienen la capacidad de generar antagonismo contra otras bacterias, sin embargo, su capacidad inhibitoria actúa mayoritariamente contra bacterias Gram positivas y no contra Gram negativas (Albano *et al.*, 2007). No obstante, *Lactobacillus gasseri* EV1461 (Maldonado-Barragán *et al.*, 2016) y *Lactobacillus coryniformis* XN8 (Yi *et al.*, 2016) han presentado actividad tanto en Gram positivas como Gram negativas, incluso *L. coryniformis* XN8 presenta antagonismo contra bacterias con resistencia a diversos antibióticos. Los resultados de la actividad antagónica obtenidos con el SLC de *P. pentosaceus* CM175 son bastantes prometedores, ya que la actividad se presentó tanto contra bacterias Gram positivas como Gram negativas, resultados mostrados en el Cuadro 4 y Figura 3. Estos resultados demuestran que la molécula que confiere esta capacidad antagónica a la cepa CM175 tiene potencial para inhibir el desarrollo de bacterias patógenas Gram + y Gram -, siendo resultados presuntivos hasta este punto, ya que no se había realizado la purificación de la molécula.

La actividad antagónica tanto en agar como en medio líquido muestra la actividad antagónica del SLC ejercida tanto contra bacterias Gram positivas como Gram negativas. La bacteria *E. coli* O157:H7 fue la bacteria más resistente al efecto antagónico del SLC de la cepa CM175 de *P. pentosaceus*, esta bacteria incrementó su fase lag 10 veces, no obstante, su crecimiento al entrar en la fase logarítmica fue similar al control. Una posible explicación de la resistencia de *E. coli* contra el SLC de *P. pentosaceus* CM175 es que la molécula antagonista tenga características bioquímicas y/o estructurales similares a moléculas producidas por esta bacteria, por ejemplo, bacteriocinas, o que el modo de acción sea inhibido por moléculas secretadas o expresadas en *E. coli* O157:H7, por ejemplo, una bomba de expulsión o alguna enzima que tenga la capacidad de modificar a la molécula antagonista (Meade *et al.*, 2020). La fase lag es el período que utiliza la bacteria para adaptarse al medio en el que se encuentra, produciendo enzimas y todo el material bioquímico necesario para iniciar su división celular (Varela y Grotiuz, 2008), por lo cual, es válido hipotetizar que *E. coli* amplió su fase lag con el propósito de degradar los metabolitos antagonistas presentes en el SLC y poder iniciar su fase logarítmica. El resto de las bacterias patógenas utilizadas en las pruebas de antagonismo fueron susceptibles (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* y *S. Saintpaul*). Todorov y Dicks (2009) reportaron la actividad antagónica ejercida por una bacteria

producida por *P. pentosaceus* ST44AM. La bacteriocina reportada por estos autores tiene la capacidad de ejercer actividad antagónica contra *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli*, pero no logra ejercer esta actividad contra cepas del género *Salmonella*, lo cual justifica la caracterización de el o los metabolitos antagonistas producidos por la cepa CM175.

Las BAL tienen la capacidad de producir varios metabolitos que pueden actuar de manera negativa contra otras bacterias entre estos pueden ser ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y compuestos proteínicos (Saeed y Salam, 2013). La actividad antibacteriana del SLC obtenido de *P. pentosaceus* CM175 se atribuye tanto a ácidos orgánicos como compuestos proteínicos, ya que la actividad antagónica se da tanto con el SLC con pH neutro (pH 7) como con el SLC con pH ácido no neutralizado. El SLC de la cepa CM175 tiene un efecto mayor cuando no es neutralizado a comparación del SLC neutralizado. Este efecto puede quedar más claro al regresar al Cuadro 2, ya que se puede notar que los mecanismos de acción son diferentes entre los ácidos orgánicos y los posibles agentes de origen proteínico que producen las BAL, hipotetizando que estas moléculas puedan estar causando una sinergia en contra de las bacterias susceptibles. En este contexto, Vijayakumar y Muriana (2015) encontraron cepas de BAL, *Lactobacillus curvatus* FS47, *Lactobacillus curvatus* Beef3, *Pediococcus acidilactici* Bac3, *Lactococcus lactis* FLS1, *Enterococcus faecium* FS56-1 y *Enterococcus thailandicus* FS92, que producen SLC que tienen actividad antagónica, este SLC neutralizado es menos potente que el SLC no neutralizado, indicando una posible sinergia de compuestos ácidos y otro tipo de metabolitos extracelulares.

Los resultados tanto de inhibición de crecimiento en agar suave como en caldo dan indicios de la producción de compuestos proteínicos por parte de la cepa CM175, los cuales fueron corroborados con la prueba de biología molecular donde encontramos el gen *papA*, relacionado directamente con genes estructurales que codifican para bacteriocinas en bacterias del género *Pediococcus*. Reportes acerca de las bacteriocinas que pueden producirse por bacterias del género *Pediococcus* señalan tres bacteriocinas posibles, 1 perteneciente a la clase I, y 2 pertenecientes a la clase III (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016). Sin embargo, otra investigación menciona que la bacteria *Pediococcus pentosaceus* pueden producir cuatro bacteriocinas, dos de las cuales pertenecen a la clase IIa y dos de ellas que no han sido caracterizadas (Woraprayote *et al.*, 2016). Ambos coinciden en que bacterias del género *Pediococcus* producen más de una bacteriocina, lo que motiva la búsqueda y caracterización de nuevas bacteriocinas dentro de las cepas pertenecientes a este género bacteriano.

Al comprobar que el SLC de la cepa CM175 tiene un componente proteínico, se decidió realizar la purificación de este componente. Una desventaja de la purificación de las bacteriocinas es que involucra varios pasos, generalmente se realiza una precipitación y/o algún tipo de cromatografía (Maldonado-Barragán *et al.*, 2016; Qiao *et al.*, 2020; Todorov y Dicks, 2009). Dentro de esta investigación se llevó a cabo cromatografía de intercambio catiónico debido a que las bacteriocinas generalmente poseen un punto isoeléctrico arriba de 9, por lo que a un pH neutro la carga superficial de estas moléculas es positiva, lo cual tendría afinidad con la columna de intercambio catiónico que fue utilizada y podría purificarse. Se evaluó la actividad antagónica de las fracciones obtenidas con el fin de comprobar que la molécula de interés había presentado afinidad y que conservara su actividad después de haber pasado por el proceso de purificación. Después, con el fin de tener idea del peso molecular de la proteína que estaba siendo purificada se realizaron fracciones diferenciadas por sus tamaños. Al obtener resultados que mostraban al menos una proteína de alto peso molecular con actividad antagónica se hipotetizó que es una bacteriocina no caracterizada, pero al no comprobar de una manera concluyente que se trata de una bacteriocina, lo cual se logró hasta obtener los resultados de la secuencia aminoacídica, la molécula caracterizada le llamamos sustancia inhibitoria tipo bacteriocina (BLIS, siglas en inglés).

La BLIS secretada por *P. pentosaceus* CM175 y purificada fue caracterizada utilizando algunos parámetros fisicoquímicos y bioquímicos, entre los que se encuentran la temperatura, el pH y susceptibilidad a proteasas. Esta molécula mostró tener una termoestabilidad hasta los 100 °C por 15 minutos, lo cual es característico de bacteriocinas de bajo peso molecular pero no de las de alto peso molecular (Meade *et al.*, 2020). En cuanto a pH, esta molécula resulta ser estable en medios neutros y ácidos, mientras que perdió su actividad por completo al incubarse en un medio básico. Esta característica pudiera estar directamente ligada con la naturaleza catiónica de la mayoría de las bacteriocinas, por lo que al alcanzar su punto isoeléctrico o sobrepasarlo en un medio, la carga superficial cambia e incluso pudiera cambiar su estructura terciaria lo que implicaría cambios en su actividad antagónica (Kumariya *et al.*, 2019). Las proteasas utilizadas en esta investigación, tripsina, proteinasa K y proteasa, lograron inhibir por completo la actividad de la BLIS CM175, lo cual nos indica de su fácil degradación en caso de ser utilizada en alimentos o aplicaciones ligadas con humanos (Teixeira-Barbosa *et al.*, 2017).

Una vez definidas las características de estabilidad y secuencia aminoacídica de la BLIS CM175, se optó por tratar de inferir el sitio de acción de esta molécula mediante microscopías. En primera

instancia, se obtuvo como resultado, mediante microscopía de fluorescencia, que esta molécula no causaba lisis celular, ya que las imágenes captadas mostraban células con morfología similar entre células vivas y muertas. La naturaleza catiónica de la bacteriocina muy probablemente le permite unirse a los componentes aniónicos de la superficie celular de las bacterias y desestabilizarlas, estos componentes pueden ser: fosfatidiletanolamina, lipopolisacárido, ácido lipoteicoico y cardiolipina (Kumariya *et al.*, 2019). En este sentido, se utilizaron dos fluorocromos diferenciales, uno fue fluoresceína, el cual tiene la capacidad de marcar células que tienen intacta su membrana celular y el otro fue yoduro de propidio, el cual tiene la capacidad de ingresar a la célula únicamente cuando su membrana se encuentra comprometida o dañada (Shi *et al.*, 2007). En segunda instancia, se realizó microscopía electrónica de transmisión, en la cual los resultados coincidieron con los resultados de la microscopía de fluorescencia, ya que se logra observar que la integridad de la membrana bacteriana se encontraba dañada, esto se observa al ver la membrana bacteriana que pierde su continuidad, resultados similares mediante esta microscopía se han reportado anteriormente con una bacteriocina denominada plantaricina y la bacteria susceptible *Lactobacillus plantarum* (Zhang *et al.*, 2016). La relevancia de estos resultados es que dentro de las bacteriocinas de alto peso molecular existe una clasificación en la que se dividen las bacteriocinas líticas y las no líticas teniendo pesos moleculares alrededor de 30 y 40 kDa, respectivamente (Meade *et al.*, 2020), por lo que de comprobarse que nuestra BLIS es una bacteriocina, esta pudiera colocarse dentro de las bacteriocinas de alto peso molecular con actividad no lítica. El Cuadro 8 muestra las diferencias que existen entre las bacteriocinas producidas por las diferentes cepas de la bacteria *Pediococcus pentosaceus* que ya han sido reportadas y la que mostramos en esta investigación. Las características muestran que hay evidencias notables en cuanto a tamaño y perfil antagónico de las bacteriocinas reportadas anteriormente con la que reportamos en esta investigación, lo cual es de relevancia ya que sería la primer bacteriocina de alto peso molecular reportada para BAL.

Cuadro 8. Bacteriocinas producidas por diferentes cepas de *Pediococcus pentosaceus*.

Bacteriocina	Cepa productora	Tamaño	Perfil antagónico	Modo de acción	Referencia
Bacteriocina ST44AM	<i>P. pentosaceus</i> ST44AM	6.5 kDa	<i>L. monocytogenes</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Permeabilidad de la membrana	Todorov y Dicks, 2009.
Pediocina	<i>P. pentosaceus</i> 147	3.5-6.5 kDa	<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	Gutiérrez-Cortés, et al., 2018.
Penocina A	<i>P. pentosaceus</i> ATCC 25745	4.68 kDa	Bacterias Gram positivas	ND	Diep, et al., 2006.
Bacteriocin CM175	<i>P. pentosaceus</i> CM175	49 kDa	<i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>S. Saintpaul</i>	Permeabilidad de la membrana	Presente investigación.

ND= No Definido

La identificación de la BLIS CM175, muestran que se logró identificar una proteína que no ha sido caracterizada. Al realizar los análisis de alineamiento en las bases de datos, esta proteína es idéntica a la proteína de la cápside de un fago, investigaciones previas han identificado genes de proteínas de fagos que son integradas al ADN de las bacterias confiriendo características relevantes que les permite adaptarse a diferentes ambientes y sobrevivir o competir por su sobrevivencia de una manera más efectiva en el ambiente que se encuentran (Howard-Varona *et al.*, 2017). Existen reportes previos de proteínas que provienen de fagos que presentan actividad antagónica contra bacterias (Al-Wrafy *et al.*, 2019), y reportes previos de bacteriocinas provenientes de fagos que ya se han clasificado como proteínas de alto peso molecular tipo F (Lee *et al.*, 2016) y tipo R (Gebhart *et al.*, 2012). La proteína identificada en esta investigación no es de peso molecular similar a las bacteriocinas de tipo F o R, ya que estas proteínas tienen un tamaño superior a los 200 kDa, sin embargo, nos permite pensar que pudiéramos estar frente a una nueva clase de bacteriocinas, ya que es una molécula similar a la encontrada en un fago específico de la bacteria *Pediococcus pentosaceus*, de un peso molecular de 49 kDa presente en una BAL, grupo de bacterias en las que no se había reportado este tipo de bacteriocina anteriormente. Además, otra característica que queda en duda es la manera de producción de esta proteína, ya que para que las bacteriocinas ligadas a fagos, tipo F y tipo R, sean liberadas, la célula productora debe ser lisada, lo cual no se tiene evidencia de que pueda estar sucediendo con la cepa CM175. Los resultados obtenidos en esta investigación parecen indicar que se trata de una bacteriocina no caracterizada similar a la

proveniente de un fago y es la primer bacteriocina de este tipo reportada en el grupo de BAL. Las características de esta proteína permitirían que fuera usada en diferentes ámbitos relacionados con alimentos tanto frescos como cocinados y aquellos que posean un pH ácido, esto por su estabilidad a temperatura y a diferentes valores de pH. Una característica que toma relevancia es la termoestabilidad de esta proteína teniendo un peso molecular alto, lo que se pudiera inferir en este sentido es que esta proteína esta conformada por varias hélices α , las cuales le brindan a las proteínas termotolerancia (Kumar, *et al.*, 2000).

8. CONCLUSIÓN

Pediococcus pentosaceus CM175 produce una proteína tipo bacteriocina no caracterizada similar a las derivadas de fagos, antagonista contra bacterias Gram positivas (*L. monocytogenes* y *S. aureus*) y Gram negativas (*Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Saintpaul), estable a temperatura, pH y susceptible a proteasas y causante de daño a la membrana de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium.

9. RECOMENDACIONES

La primera recomendación es elucidar si la proteína tipo bacteriocina produce lisis a la bacteria que la produce, esto con el fin de elucidar si tiene características similares a las bacteriocinas tipo R o tipo F y comprobar que la bacteria no es productora de fagos y que la proteína tipo fagos se encuentra dentro del genoma bacteriano sin el resto de los genes necesarios para sintetizar el virión. Una recomendación muy importante es seguir estudiando la bacteria *Pediococcus pentosaceus* CM175, entre los experimentos que se proponen es la búsqueda de otras bacteriocinas y caracterizarlas, así como evaluar el potencial probiótico de esta bacteria. Además, recomiendo ampliamente continuar con la búsqueda de bacterias bacteriocinogénicas ya que el grupo de trabajo cuenta con un gran banco de bacterias que han generado actividad antagónica célula- célula.

10. REFERENCIAS

- Abee, T., Rombouts, F. M., Hugenholtz, J., Guihard, G. and Letellier, L. 1994. Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 1962-1968.
- Aguilar, C. (2016). Estimulación con oligosacáridos de la capacidad antagónica de bacterias ácido lácticas epífitas de melón cantaloupe contra *Salmonella Typhimurium* (Maestría en Ciencias). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. México.
- Aguilar-Toalá, J., Santiago-López, L., Peres, C., Peres, C., Garcia, H., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A. and Hernández-Mendoza, A. 2017. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 65-75.
- Ahlberg, S. H., Joutsjoki, V. and Korhonen, H. J. 2015. Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *International Journal of Food Microbiology*, 207, 87-102.
- Al-Wrafy, F., Brzozowska, E., Górska, S., Drab, M., Strus, M. and Gamian, A. 2019. Identification and characterization of phage protein and its activity against two strains of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 9(1), 1-14.
- Al Mamun, M., Rahman, S. M. M. and Turin, T. C. 2013. Microbiological quality of selected street food items vended by school-based street food vendors in Dhaka, Bangladesh. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), 413-418.
- Albano, H., Todorov, S. D., van Reenen, C. A., Hogg, T., Dicks, L. M. T. and Teixeira, P. 2007. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. *International Journal of Food Microbiology*, 116(2), 239-247.
- Alegbeleye, O. O., Singleton, I. and Sant’Ana, A. S. 2018. Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: a review. *Food Microbiology*, 73, 177-208.
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D. and Kuipers, O. P. 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2939-2951.
- Anderssen, E. L., Diep, D. B., Nes, I. F., Eijsink, V. G. and Nissen-Meyer, J. 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2269-2272.
- Baindara, P., Chaudry, V., Mittal, G., Liao, L. M., Matos, C. O., Khatri, N., Franco, O. L., Patil, P. B. and Korpole, S. (2016) Characterization of the antimicrobial peptide penisin, a class Ia novel lantibiotic from *Paenibacillus* sp. strain A3. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 60 (1):580-591.
- Bechinger, B. and Gorr, S.-U. 2017. Antimicrobial peptides: mechanisms of action and resistance.

Journal of Dental Research, 96(3), 254-260.

- Ben Said, L., Gaudreau, H., Dallaire, L., Tessier, M. and Fliss, I. 2019. Bioprotective culture: A new generation of food additives for the preservation of food quality and safety. *Industrial Biotechnology*, 15(3), 138-147.
- Callejón, R. M., Rodríguez-Naranjo, M. I., Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., García-Parrilla, M. C. and Troncoso, A. M. 2015. Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: trends and causes. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(1), 32-38.
- Cano-Garrido, O., Seras-Franzoso, J. and García-Fruitós, E. 2015. Lactic acid bacteria: reviewing the potential of a promising delivery live vector for biomedical purposes. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1-12.
- Carstens, C., Salazar, J. K. and Darkoh, C. 2019. Multistate Outbreaks of Foodborne Illness in the United States Associated with Fresh Produce From 2010-2017. *Frontiers in microbiology*, 10, 2667.
- CDC. 2020a. List of selected multistate foodborne outbreak investigations. Disponible en <https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreaks-list.html>. Último acceso 13 de enero del 2021.
- CDC. 2020b. Foodborne germs and illnesses. Disponible en <https://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>. Último acceso 15 de octubre del 2020.
- Cofepris. 2015. Enfermedades transmitidas por alimentos. Foro internacional de alimentos sanos. Disponible en <http://publico.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=29572&IdUrl=79917&objeto=Documento&IdObjetoBase=29572&down=true>.
- Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777-788.
- Cotter, P. D., Ross, R. P. and Hill, C. 2013. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 95-105.
- 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 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, Á. 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.
- Duncan, S. H., Louis, P., Thomson, J. M. and Flint, H. J. 2009. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, 11(8),

2112-2122.

- Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., and Rebuffat, S. 2007. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural Product Reports*, 24(4), 708-734.
- FDA. 2012. Bad bug book. Disponible en: <https://www.fda.gov/files/food/published/Bad-Bug-Book-2nd-Edition-%28PDF%29.pdf>.
- FDA. 2020. 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.
- Ford, L., Miller, M., Cawthorne, A., Fearnley, E. and Kirk, M. 2015. Approaches to the surveillance of foodborne disease: a review of the evidence. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(12), 927-936.
- Gabrielsen, C., Brede, D. A., Nes, I. F. and Diep, D. B. 2014. Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(22), 6854-6862.
- Gallo, M., Ferrara, L., Calogero, A., Montesano, D. and Naviglio, D. 2020. Relationships between food and diseases: what to know to ensure food safety. *Food Research International*, 137, 109414.
- Gebhart, D., Williams, S. R., Bishop-Lilly, K. A., Govoni, G. R., Willner, K. M., Butani, A., Sozhamannan, S., Martin, D., Fortier, L.-C. and Scholl, D. 2012. Novel high-molecular-weight, R-type bacteriocins of *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology*, 194(22), 6240-6247.
- González-Pérez, C. J., Tanori-Cordova, J., Aispuro-Hernández, E., Vargas-Arispuro, I. and Martínez-Téllez, M. A. 2019. Morphometric parameters of foodborne related-pathogens estimated by transmission electron microscopy and their relation to optical density and colony forming units. *Journal of Microbiological Methods*, 165, 105691.
- Gutiérrez-Cortés, C., Suarez, H., Buitrago, G., Nero, L. A. and Todorov, S. D. 2018. Characterization of bacteriocins produced by strains of *Pediococcus pentosaceus* isolated from Minas cheese. *Annals of Microbiology*, 68(6), 383-398.
- Hall, B. G., Acar, H., Nandipati, A. and Barlow, M. 2014. Growth rates made easy. *Molecular Biology and Evolution*, 31(1), 232-238.
- 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.
- Howard-Varona, C., Hargreaves, K. R., Abedon, S. T. and Sullivan, M. B. 2017. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *The ISME Journal*, 11(7), 1511-1520.
- Huerta-Ocampo, J. A., Barrera-Pacheco, A., Mendoza-Hernandez, C. S., Espitia-Rangel, E., Mock, H.-P. and Barba de la Rosa, A. P. 2014. Salt stress-induced alterations in the root proteome of *Amaranthus cruentus* L. *Journal of Proteome Research*, 13(8), 3607-3627.
- Huerta-Ocampo, J. Á., Osuna-Castro, J. A., Lino-López, G. J., Barrera-Pacheco, A., Mendoza-Hernández, G., De León-Rodríguez, A., & de la Rosa, A. P. B. 2012. Proteomic analysis of

- differentially accumulated proteins during ripening and in response to 1-MCP in papaya fruit. *Journal of Proteomics*, 75(7), 2160-2169.
- Janisiewicz, W. J. and Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), 411-441.
- Jordan, K., Dalmasso, M., Zentek, J., Mader, A., Bruggeman, G., Wallace, J., De Medici, D., Fiore, A., Prukner-Radovic, E. and Lukac, M. 2014. Microbes versus microbes: control of pathogens in the food chain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(15), 3079-3089.
- Karpiński, T. M. and Szkaradkiewicz, A. K. 2013. Characteristic of bacteriocines and their application. *Polish Journal of Microbiology*, 62(3), 223-235.
- Kim, T.-S., Hur, J.-W., Yu, M.-A., Cheigh, C.-I., Kim, K.-N., Hwang, J.-K. and Pyun, Y.-R. 2003. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 66(1), 3-12.
- Kumar, S., Tsai, C. J. and Nussinov, R. 2000. Factors enhancing protein thermostability. *Protein Engineering*, 13(3), 179-191.
- Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y., Sood, S., Akhtar, N. and Patel, S. 2019. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 128, 171-177.
- Lee, G., Chakraborty, U., Gebhart, D., Govoni, G. R., Zhou, Z. H. and Scholl, D. 2016. F-type bacteriocins of *Listeria monocytogenes*: a new class of phage tail-like structures reveals broad parallel coevolution between tailed bacteriophages and high-molecular-weight bacteriocins. *Journal of Bacteriology*, 198(20), 2784-2793.
- Li, H. and O'Sullivan, D. J. 2002. Heterologous expression of the *Lactococcus lactis* bacteriocin, nisin, in a dairy *Enterococcus* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3392-3400.
- Macwana, S. J. and Muriana, P. M. 2012. A 'bacteriocin PCR array' for identification of bacteriocin-related structural genes in lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 88(2), 197-204.
- Makinde, O. M., Ayeni, K. I., Sulyok, M., Krska, R., Adeleke, R. A. and Ezekiel, C. N. 2020. Microbiological safety of ready-to-eat foods in low-and middle-income countries: A comprehensive 10-year (2009 to 2018) review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 703-732.
- Maldonado-Barragán, A., Caballero-Guerrero, B., Martín, V., Ruiz-Barba, J. L. and Rodríguez, J. M. 2016. Purification and genetic characterization of gassericin E, a novel co-culture inducible bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* EV1461 isolated from the vagina of a healthy woman. *BMC Microbiology*, 16(1), 37.
- Martínez Téllez, M.A., Vargas Arispuro, I.C., Silva Bielenberg, H.K., Espinoza Medina, I.E, Rodríguez Leyva, F.J., and González Aguilar, G.A. 2007. Parte 2. Productos agrícolas. Capítulo 7. Producción y manejo poscosecha de hortalizas. 223-238 pp. En: Buenas prácticas en la producción de alimentos. (eds) . Editorial Trillas. ISBN: 9789682481758.
- Meade, E., Slattery, M. A. and Garvey, M. 2020. Bacteriocins, Potent Antimicrobial Peptides and

- the Fight against Multi Drug Resistant Species: Resistance Is Futile? *Antibiotics*, 9(1), 32.
- Miller, P. and McMullen, L. M. 2014. Mechanism for temperature-dependent production of piscicolin 126. *Microbiology*, 160(8), 1670-1678.
- Mir, S. A., Shah, M. A., Mir, M. M., Dar, B., Greiner, R. and Roohinejad, S. 2018. Microbiological contamination of ready-to-eat vegetable salads in developing countries and potential solutions in the supply chain to control microbial pathogens. *Food Control*, 85, 235-244.
- Muench, D. F., Kuch, D. J., Wu, H., Begum, A. A., Veit, S. J., Pelletier, M.-E., Soler-García, Á. A. and Jerse, A. E. 2009. Hydrogen peroxide-producing lactobacilli Inhibit gonococci in vitro but not during experimental genital tract infection. *The Journal of infectious diseases*, 199(9), 1369-1378.
- Nerin, C., Aznar, M. and Carrizo, D. 2016. Food contamination during food process. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 63-68.
- Nithya, A., Gothandam, K. M. and Babu, S. 2014. Alternative ecology of human pathogenic bacteria in fruits and vegetables. *Plant Pathology Journal*, 13(1), 1-7.
- O'Connor, P. M., Kuniyoshi, T. M., Oliveira, R. P., Hill, C., Ross, R. P. and Cotter, P. D. 2020. Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 160-167.
- OMS. 2003. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. WHO Technical Report Series, No.916. Disponible en https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42665/WHO_TRS_916.pdf;sequence=1. Último acceso 20 octubre del 2020.
- Perez, R. H., Ishibashi, N., Inoue, T., Himeno, K., Masuda, Y., Sawa, N., Zendo, T., Wilaipun, P., Leelawatcharamas, V. and Nakayama, J. 2016a. Functional analysis of genes involved in the biosynthesis of Enterocin NKR-5-3B, a novel circular bacteriocin. *Journal of Bacteriology*, 198(2), 291-300.
- Perez, R. H., Ishibashi, N., Inoue, T., Himeno, K., Masuda, Y., Sawa, N., Zendo, T., Wilaipun, P., Leelawatcharamas, V. and Nakayama, J. 2016b. Functional analysis of genes involved in the biosynthesis of enterocin NKR-5-3B, a novel circular bacteriocin. *Journal of Bacteriology*, 198(2), 291-300.
- Piva, A. and Headon, D. R. 1994. Pediocin A, a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* FBB61. *Microbiology*, 140(4), 697-702.
- Qiao, X., Du, R., Wang, Y., Han, Y. and Zhou, Z. 2020. Purification, characterization and mode of action of enterocin, a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* TJUQ1. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 151-159.
- Ricke, S. 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry science*, 82(4), 632-639.
- Saeed A, H. and Salam A, I. 2013. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 4(11A), 40133.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., Jones, J. L. and Griffin, P. M. 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 7-15.

- Shi, L., Günther, S., Hübschmann, T., Wick, L. Y., Harms, H. and Müller, S. 2007. Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. *Cytometry Part A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 71(8), 592-598.
- 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
- Tack, D. M., Marder, E. P., Griffin, P. M., Cieslak, P. R., Dunn, J., Hurd, S., Scallan, E., Lathrop, S., Muse, A. and Ryan, P. 2019. Preliminary incidence and trends of infections with pathogens transmitted commonly through food—Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 US Sites, 2015–2018. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 68(16), 369-373.
- Teixeira-Barbosa, A., Cuquetto-Mantovani, H. and Jain, S. 2017. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their potential in the preservation of fruit products. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(7), 852-864.
- Todorov, S. D. and Dicks, L. M. 2009. Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). *International Journal of Food Microbiology*, 132(2-3), 117-126.
- Tomita, H., Kamei, E. and Ike, Y. 2008. Cloning and genetic analyses of the bacteriocin 41 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI14: a novel bacteriocin complemented by two extracellular components (lysin and activator). *Journal of Bacteriology*, 190(6), 2075-2085. doi: 10.1128/JB.01056-07
- Tortora, G. J., Funke, B. R. and Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*: Ed. Médica Panamericana.
- 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.
- Varela, G. and Grotiuz, G. 2008. *Fisiología y metabolismo bacteriano*. Uruguay, Editorial Cefa, 43-58.
- Vásquez, S. M., Suárez, H. and Zapata, S. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(1), 64-71.
- Venema, K., Kok, J., Marugg, J. D., Toonen, M. Y., Ledebøer, A. M., Venema, G. and Chikindas, M. L. 1995a. Functional analysis of the pediocin operon of *Pediococcus acidilactici* PAC1. 0: PedB is the immunity protein and PedD is the precursor processing enzyme. *Molecular Microbiology*, 17(3), 515-522.
- Venema, K., Kok, J., Marugg, J. D., Toonen, M. Y., Ledebøer, A. M., Venema, G. and Chikindas, M. L. 1995b. Functional analysis of the pediocin operon of *Pediococcus acidilactici* PAC1. 0: PedB is the immunity protein and PedD is the precursor processing enzyme. *Molecular Microbiology*, 17(3), 515-522.
- Vijayakumar, P. P. and Muriana, P. M. 2015. A microplate growth inhibition assay for screening bacteriocins against *Listeria monocytogenes* to differentiate their mode-of-action.

Biomolecules, 5(2), 1178-1194.

- 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.
- Woraprayote, W., Malila, Y., Sorapukdee, S., Swetwivathana, A., Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2016. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science*, 120, 118-132.
- Worobo, R. W., Van Belkum, M. J., Sailer, M., Roy, K. L., Vederas, J. C. and Stiles, M. E. 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *Journal of Bacteriology*, 177(11), 3143-3149.
- Yi, L., Dang, J., Zhang, L., Wu, Y., Liu, B. and Lü, X. 2016. Purification, characterization and bactericidal mechanism of a broad spectrum bacteriocin with antimicrobial activity against multidrug-resistant strains produced by *Lactobacillus coryniformis* XN8. *Food Control*, 67, 53-62. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.02.008
- Zhang, X., Wang, Y., Liu, L., Wei, Y., Shang, N., Zhang, X. and Li, P. 2016. Two-peptide bacteriocin PlnEF causes cell membrane damage to *Lactobacillus plantarum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1858(2), 274-280.

11. ANEXOS

11.1. Protocolo de Extracción de ADN

Appendix D: Protocols for Bacteria

These protocols have been used successfully for bacteria such as *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bordetella pertussis* from nasopharyngeal swabs, *Borrelia burgdorferi*, from cerebrospinal fluid, and *Legionella pneumophila* from broncho-alveolar lavage.

For other bacteria, follow the protocol for Gram-positive bacteria, especially other Gram-positive bacteria, which may be difficult to lyse.

For isolation of bacterial DNA from urine, either follow the protocol for biological fluids, or use the QIAamp Viral RNA Mini Kit. Urine contains numerous unidentified PCR inhibitors. Buffer AVL (included in the QIAamp Viral RNA Mini Kit) is the buffer of choice to destroy these inhibitors.

Some bacteria (particularly Gram-positive bacteria) require pre-incubation with specific enzymes such as lysozyme* or lysostaphin* (e.g., staphylococci) to lyse the rigid multilayered cell wall. In these cases the protocol for Gram-positive bacteria should be used.

Additional reagents required

- For swabs: Phosphate-buffered saline (PBS)* containing a common fungicide*
- For Gram-positive and difficult-to-lyse bacteria: 20 mg/ml lysozyme or 200 µg/ml lysostaphin solution in 20 mM Tris·Cl,* pH 8.0, 2 mM EDTA,* 1.2% Triton®*

Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 17).
- Avoid repeated freezing and thawing of stored samples, since this leads to reduced DNA size.

Things to do before starting

- Equilibrate the sample to room temperature (15–25°C).
- Heat 2 water baths or heating blocks: one to 56°C and one to 70°C.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution.

- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 16.
- If a precipitate has formed in Buffer ATL or Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

* When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles.

For more information, consult the appropriate safety data sheets (SDSs), available from the product supplier.

Isolation of bacterial DNA from biological fluids

- D1. Pellet bacteria by centrifugation for 10 min at 5000 x g (7500 rpm).
- D2. Resuspend bacterial pellet in 180 µl Buffer ATL (supplied in the QIAamp DNA Mini Kit).
- D3. Follow the “Protocol: DNA Purification from Tissues“ from step 3 (page 33).

Isolation of bacterial DNA from eye, nasal, pharyngeal, or other swabs†

- D1. Collect samples and place in 2 ml PBS containing a common fungicide. Incubate for several hours at room temperature (15–25°C).
- D2. Follow the biological fluids protocol above from step D1.

Isolation of genomic DNA from bacterial plate cultures

- D1. Remove bacteria from culture plate with an inoculation loop and suspend in 180 µl of Buffer ATL (supplied in the QIAamp DNA Mini Kit) by vigorous stirring.
- D2. Follow the “Protocol: DNA Purification from Tissues“ from step 3 (page 33).

Isolation of genomic DNA from bacterial suspension cultures

- D1. Pipet 1 ml of bacterial culture into a 1.5 ml microcentrifuge tube, and centrifuge for 5 min at 5000 x g (7500 rpm).
- D2. Calculate the volume of the pellet or concentrate and add Buffer ATL (supplied in the QIAamp DNA Mini Kit) to a total volume of 180 µl.
- D3. Follow the “Protocol: DNA Purification from Tissues“ from step 3 (page 33).

Isolation of genomic DNA from Gram-positive bacteria

- D1. Pellet bacteria by centrifugation for 10 min at 5000 x g (7500 rpm).

D2. Suspend bacterial pellet in 180 µl of the appropriate enzyme solution (20 mg/ml lysozyme or 200 µg/ml lysostaphin; 20 mM Tris·HCl, pH 8.0; 2 mM EDTA; 1.2% Triton).

D3. Incubate for at least 30 min at 37°C.

D4. Add 20 µl proteinase K and 200 µl Buffer AL. Mix by vortexing.

D5. Incubate at 56°C for 30 min and then for a further 15 min at 95°C.

Note: Extended incubation at 95°C can lead to some DNA degradation.

D6. Centrifuge for a few seconds.

D7. Follow the “Protocol: DNA Purification from Tissues“ from step 6 (page 34).

† See also “Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Spin Protocol)” on page 36.

Protocol: DNA Purification from Tissues (QIAamp DNA Mini Kit)

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from tissues using the QIAamp DNA Mini Kit.

Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 17).
- Avoid repeated freezing and thawing of stored samples, since this leads to reduced DNA size.
- Transcriptionally active tissues, such as liver and kidney, contain high levels of RNA which will copurify with genomic DNA. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but will not inhibit PCR. If RNA-free genomic DNA is required, include the RNase A digest, as described in step 5a of the protocol.

Things to do before starting

- Equilibrate the sample to room temperature (15–25°C).
- Heat 2 water baths or heating blocks: one to 56°C for use in step 3, and one to 70°C for use in step 5.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution in step 11.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 16.
- If a precipitate has formed in Buffer ATL or Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Excise the tissue sample or remove it from storage. Determine the amount of tissue. Do not use more than 25 mg (10 mg spleen). Weighing tissue is the most accurate way to determine the

amount. If DNA is prepared from spleen tissue, no more than 10 mg should be used. The yield of DNA will depend on both the amount and the type of tissue processed. 1 mg of tissue will yield approximately 0.2–1.2 µg of DNA.

2. Cut up (step 2a), grind (step 2b), or mechanically disrupt (step 2c) the tissue sample. The QIAamp procedure requires no mechanical disruption of the tissue sample, but lysis time will be reduced if the sample is ground in liquid nitrogen (step 2b) or mechanically homogenized (step 2c) in advance.

2a. Cut up to 25 mg of tissue (up to 10 mg spleen) into small pieces. Place in a 1.5 ml microcentrifuge tube, and add 180 µl of Buffer ATL. Proceed with step 3. It is important to cut the tissue into small pieces to decrease lysis time. 2 ml microcentrifuge tubes may be better suited for lysis.

2b. Place up to 25 mg of tissue (10 mg spleen) in liquid nitrogen, and grind thoroughly with a mortar and pestle. Decant tissue powder and liquid nitrogen into 1.5 ml microcentrifuge tube. Allow the liquid nitrogen to evaporate, but do not allow the tissue to thaw, and add 180 µl of Buffer ATL. Proceed with step 3.

2c. Add up to 25 mg of tissue (10 mg spleen) to a 1.5 ml microcentrifuge tube containing no more than 80 µl PBS. Homogenize the sample using the Tissue Ruptor or equivalent rotor–stator homogenizer. Add 100 µl Buffer ATL, and proceed with step 3. Some tissues require undiluted Buffer ATL for complete lysis. In this case, grinding in liquid nitrogen is recommended. Samples cannot be homogenized directly in Buffer ATL, which contains detergent.

3. Add 20 µl proteinase K, mix by vortexing, and incubate at 56°C until the tissue is completely lysed. Vortex occasionally during incubation to disperse the sample, or place in a shaking water bath or on a rocking platform.

Note: Proteinase K must be used. QIAGEN Protease has reduced activity in the presence of Buffer ATL.

Lysis time varies depending on the type of tissue processed. Lysis is usually complete in 1–3 h. Lysis overnight is possible and does not influence the preparation. To ensure efficient lysis, a shaking water bath or a rocking platform

should be used. If not available, vortexing 2–3 times per hour during incubation is recommended.

4. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.

5. If RNA-free genomic DNA is required, follow step 5a. Otherwise, follow step 5b. Transcriptionally active tissues, such as liver and kidney, contain high levels of RNA which will copurify with genomic DNA. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but will not inhibit PCR.

5a. First add 4 μ l RNase A (100 mg/ml), mix by pulse-vortexing for 15 s, and incubate for 2 min at room temperature (15–25°C). Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid before adding 200 μ l Buffer AL to the sample. Mix again by pulse-vortexing for 15 s, and incubate at 70°C for 10 min. Briefly

centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid. It is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution. A white precipitate may form on addition of Buffer AL. In most cases it will dissolve during incubation at 70°C. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.

5b. Add 200 μ l Buffer AL to the sample, mix by pulse-vortexing for 15 s, and incubate at 70°C for 10 min. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid. It is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution. A white precipitate may form on addition of Buffer AL, which in most cases will dissolve during incubation at 70°C. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.

6. Add 200 μ l ethanol (96–100%) to the sample, and mix by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid. It is essential that the sample, Buffer AL, and the ethanol are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution. A white precipitate may form on addition of ethanol. It is essential to apply all of the precipitate to the QIAamp Mini spin column. This precipitate does not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application. Do not use alcohols other than ethanol since this may result in reduced yields.

7. Carefully apply the mixture from step 6 (including the precipitate) to the QIAamp Mini spin column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the tube containing

the filtrate.* Close each spin column to avoid aerosol formation during centrifugation. It is essential to apply all of the precipitate to the QIAamp Mini spin column. Centrifugation is performed at 6000 x g (8000 rpm) to reduce noise. Centrifugation at full speed will not affect the yield or purity of the DNA. If the solution has not completely passed through the membrane, centrifuge again at a higher speed until all the solution has passed through.

* Flow-through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 6 for safety information.

8. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate.*

9. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 µl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min.

10. Recommended: Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube (not provided) and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min. This step helps to eliminate the chance of possible Buffer AW2 carryover.

11. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 200 µl Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min.

12. Repeat step 11. A 5 min incubation of the QIAamp Mini spin column loaded with Buffer AE or water, before centrifugation, generally increases DNA yield. A third elution step with a further 200 µl Buffer AE will increase yields by up to 15%. Volumes of more than 200 µl should not be eluted into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the spin column will come into contact with the eluate, leading to possible aerosol formation during centrifugation. Elution with volumes of less than 200 µl increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but slightly reduces the overall DNA yield (see Table 5, page 25). Eluting with 4 x 100 µl instead of 2 x 200 µl does not increase elution

efficiency. For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and placing at -30 to -15°C is recommended, since DNA stored in water is subject to acid hydrolysis. Yields of DNA will depend both on the amount and the type of tissue processed. 25 mg of tissue will yield approximately 10–30 μg of DNA in 400 μl of water (25–75 $\text{ng}/\mu\text{l}$), with an A260/A280 ratio of 1.7–1.9.

11.2. Protocolo de Cuantificación de Proteínas

thermo scientific

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 thermo.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^{+1} by protein in an alkaline medium (the biuret reaction) with the highly sensitive and selective colorimetric detection of the cuprous cation (Cu^{+1}) 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)



Test-tube procedure (sample to WR ratio = 1:20)

1. Pipette 0.1 mL of each standard and unknown sample replicate into an appropriately labeled test tube.
2. Add 2.0 mL of the WR to each tube and mix well.
3. Cover and incubate tubes at selected temperature and time:
 - Standard Protocol: 37°C for 30 minutes (working range = 20–2000 µg/mL)
 - RT Protocol: RT for 2 hours (working range = 20–2000 µg/mL)
 - Enhanced Protocol: 60°C for 30 minutes (working range = 5–250 µg/mL)

Note:

- Increasing the incubation time or temperature increases the net 562 nm absorbance for each test and decreases both the minimum detection level of the reagent and the working range of the protocol.
- Use a water bath to heat tubes for either Standard (37°C incubation) or Enhanced (60°C incubation) Protocol. Using a forced-air incubator can introduce significant error in color development because of uneven heat transfer.

4. Cool all tubes to RT.
5. With the spectrophotometer set to 562 nm, zero the instrument on a cuvette filled only with water, then measure the absorbance of all the samples within 10 minutes.

Note: Because the BCA assay does not reach a true end point, color development will continue even after cooling to RT. However, because the rate of color development is low at RT, no significant error will be introduced if the 562 nm absorbance measurements of all tubes are made within 10 minutes of each other.

6. Subtract the average 562 nm absorbance measurement of the Blank standard replicates from the 562nm absorbance measurement of all other individual standard and unknown sample replicates.
7. Prepare a standard curve by plotting the average Blank-corrected 562 nm measurement for each BSA standard vs. its concentration in µg/mL. Use the standard curve to determine the protein concentration of each unknown sample.

Microplate procedure (sample to WR ratio = 1:8)

1. Pipette 25 µL of each standard or unknown sample replicate into a microplate well (working range = 20–2000 µg/mL). (For example, Thermo Scientific™ Pierce™ 96-Well Plates, Product No. 15041).

Note: If sample size is limited, 10 µL of each unknown sample and standard can be used (sample to WR ratio = 1:20). However, the working range of the assay in this case is limited to 125–2000 µg/mL.

2. Add 200 µL of the WR to each well and mix plate thoroughly on a plate shaker for 30 seconds.
3. Cover plate and incubate at 37°C for 30 minutes.
4. Cool plate to RT. Measure the absorbance at or near 562 nm on a plate reader.

Note:

- Wavelengths from 540–590 nm have been used successfully with this method.
- Because plate readers use a shorter light path length than cuvette spectrophotometers, the Microplate Procedure requires a greater sample to WR ratio to obtain the same sensitivity as the standard Test Tube Procedure. If higher 562 nm measurements are desired, increase the incubation time to 2 hours.
- Increasing the incubation time or ratio of sample volume to WR increases the net 562 nm measurement for each well and lowers both the minimum detection level of the reagent and the working range of the assay. As long as all standards and unknowns are treated identically, such modifications may be useful.

5. Subtract the average 562 nm absorbance measurement of the Blank standard replicates from the 562 nm measurements of all other individual standard and unknown sample replicates.
6. Prepare a standard curve by plotting the average Blank-corrected 562 nm measurement for each BSA standard vs. its concentration in µg/mL. Use the standard curve to determine the protein concentration of each unknown sample.

Note: If using curve-fitting algorithms associated with a microplate reader, a four-parameter (quadratic) or best-fit curve provides more accurate results than a purely linear fit. If plotting results by hand, a point-to-point curve is preferable to a linear fit to the standard points.

11.3. Datos de Secuenciación de Genes

>Secuencia utilizando iniciador forward.

```
CTGCTAGGTAGGTACCACTTGCATAATCAATAATGGAGCTATGGCATGGG
CTACTGGTGGGACATCAAGGTAATCACGGAATGTTTGCCCCAAGTAAA
```

Resultado de alineamiento de secuencia con bases de datos NCBI.

Pediococcus acidilactici strain BA28 plasmid pediocin BA 28 (papA) gene, complete cds

Sequence ID: [KC693734.1](#) Length: 618 Number of Matches: 1

Range 1: 171 to 242 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
115 bits(62)	4e-22	70/73(96%)	3/73(4%)	Plus/Plus
Query 7	GGT-AGG-TACCAC TTGCATAATCAATAATGGAGC TATGGCATGGGCTACTGGTGGGACA			64
Sbjct 171	GGTAAGGCTACCAC TTGCATAATCAATAATGGAGC TATGGCATGGGCTACTGG-GGGACA			229
Query 65	TCAMGGTAATCAC	77		
Sbjct 230	TCAMGGTAATCAC	242		

> Secuencia utilizando iniciador reverse.

CTCGAGCTCATTATTGATTATGCAAGTGGTAGCCTTACCCCAGTCAACAG
AGCAGGAATTTTTGCCACAAGTAACCTGGGGGCCTTCAGGGTATCCAA

Resultado de alineamiento de secuencia con bases de datos NCBI.

Pediococcus acidilactici strain BA28 plasmid pediocin BA 28 (papA) gene, complete cds

Sequence ID: [KC693734.1](#) Length: 618 Number of Matches: 1

Range 1: 134 to 206 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
122 bits(66)	2e-24	71/73(97%)	1/73(1%)	Plus/Minus
Query 5	AGCT-CATTATTGATTATGCAAGTGGTAGCCTTACCCCAGTCAACAGAGCAGGAATTTTT			63
Sbjct 206	AGCTCCATTATTGATTATGCAAGTGGTAGCCTTACCCCAGTCAACAGAGCAGGAATGTTT			147
Query 64	GCCACAAGTAACC	76		
Sbjct 146	GCCACAAGTAACC	134		