



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIBACTERIANA DE *Enterococcus faecalis*
AISLADO DEL QUESO COTIJA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

MARIO ALBERTO MORA REYES



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Profesor: RODOLFO PASTELIN PALACIOS.
VOCAL	Profesor: J. ELEAZAR MARTINEZ BARAJAS.
SECRETARIO	Profesor: MARICARMEN QUIRASCO BARUCH.
1er. SUPLENTE	Profesor: RUTH EDITH MARTIN FUENTES.
2do. SUPLENTE	Profesor: CARLOS EDUARDO SERRANO MALDONADO.

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología del Edificio E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch.

Los recursos para la realización de este trabajo provinieron del proyecto PAPIIT IN222115: “Análisis funcional del metagenoma bacteriano, inocuidad y potencial biotecnológico del género *Enterococcus* del queso Cotija”. Así mismo, se recibió apoyo económico del Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP-FQ) con clave 5000-9102.

Asesor del tema

Maricarmen Quirasco Baruch

Supervisor técnico

Carlos Eduardo Serrano Maldonado

Sustentante

Mario Alberto Mora Reyes

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Marco teórico.....	3
2.1. Características generales del queso Cotija.....	3
2.2. Proceso de elaboración del queso Cotija.....	4
2.3. Bacterias ácido lácticas.....	6
2.3.1. Generalidades de las bacterias ácido lácticas.....	6
2.3.2. Metabolitos con actividad antibacteriana.....	7
2.4. <i>Enterococcus spp</i>	18
2.4.1. Generalidades de <i>Enterococcus</i>	18
2.4.2. Patogenicidad.....	19
2.4.3. Presencia de <i>Enterococcus</i> en alimentos.....	20
2.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	22
2.5.1. Generalidades de <i>Staphylococcus</i>	22
2.5.2. Intoxicación causada por <i>Staphylococcus aureus</i>	24
2.5.3. Regulación sanitaria de <i>Staphylococcus aureus</i> en quesos madurados.....	25
2.6. <i>Listeria monocytogenes</i>	25
2.6.1. Generalidades de <i>Listeria</i>	25
2.6.2. Infección causada por <i>Listeria monocytogenes</i>	27
2.6.3. Regulación sanitaria de <i>Listeria monocytogenes</i> en quesos madurados.....	28
3. Antecedentes.....	29
4. Justificación.....	33
5. Hipótesis.....	33
6. Objetivos.....	33
6.1. General.....	33
6.2. Particulares.....	33
7. Metodología experimental.....	34
7.1. Diagrama general.....	34

7.2. Reactivación de las cepas.....	35
7.3. Siembra en medios de cultivo selectivos.....	35
7.4. Estandarización de los inóculos.....	38
7.5. Pruebas de co-cultivo.....	39
7.6. Precipitación de proteínas.....	41
7.7. Electroforesis.....	42
7.8. Identificación de proteínas.....	43
8. Resultados.....	44
8.1. Siembra en medios de cultivo selectivos.....	44
8.2. Estandarización de los inóculos.....	49
8.3. Pruebas de co-cultivo.....	51
8.3.1. Pruebas de co-cultivo entre <i>E. faecalis</i> F y <i>L. monocytogenes</i> en una relación 1:1 tanto en medio de cultivo BHI como MLS.....	51
8.3.2. Pruebas de co-cultivo entre <i>E. faecalis</i> F y <i>L. monocytogenes</i> en una relación 100:1 tanto en medio de cultivo BHI como MLS.....	55
8.3.3. Pruebas de co-cultivo entre <i>E. faecalis</i> F y <i>L. monocytogenes</i> en una relación 1:100 tanto en medio de cultivo BHI como MLS.....	57
8.3.4. Pruebas de co-cultivo entre <i>E. faecalis</i> F y <i>S. aureus</i> en una relación 1:1 tanto en medio de cultivo BHI como MLS.....	59
8.3.5. Pruebas de co-cultivo entre <i>E. faecalis</i> F y <i>S. aureus</i> en una relación 100:1 tanto en medio de cultivo BHI como MLS...	61
8.3.6. Pruebas de co-cultivo entre <i>E. faecalis</i> F y <i>S. aureus</i> en una relación 1:100 tanto en medio de cultivo BHI como MLS...	63
8.4. Perfil electroforético e identificación de las proteínas con actividad antibacteriana.....	67
9. Conclusiones.....	70
10. Perspectivas.....	71

11. Bibliografía.....	72
12. Anexo.....	79
12.1. Anexo I Medios de cultivo empleados.....	79
12.2. Anexo II Metodología empleada para la estandarización de los inóculos de cada bacteria.....	85
12.3. Anexo III Diluciones llevadas a cabo durante cada una de las pruebas de co-cultivo tanto en medio BHI como en MLS.....	86
12.4. Anexo IV Ejemplo de cálculo de UFC/mL y esquema de la metodología empleada durante las pruebas de co-cultivo.....	92
12.5. Anexo V Preparación de reactivos para geles SDS-PAGE.....	96

1. Resumen.

El queso Cotija artesanal madurado es un producto elaborado en México, en la sierra ubicada entre los estados de Jalisco y Michoacán. El producto se madura en la misma zona de producción por un tiempo mínimo de tres meses. En su proceso de elaboración no se incluye ningún tratamiento térmico que reduzca la carga microbiana, ni tampoco se adicionan cultivos iniciadores de forma intencional; sin embargo, el producto final presenta una buena calidad microbiológica, por lo que se piensa que esta característica es debida a la modificación de factores fisicoquímicos (como la disminución de la actividad acuosa y aumento de la acidez), así como a la actividad de bacterias ácido lácticas (BAL) durante su proceso de maduración. En el grupo de trabajo, se ha reportado la producción de compuestos con actividad antibacteriana por una cepa de *Enterococcus faecalis* (F), aislada del queso Cotija, los que fueron purificados del medio extracelular y probados contra algunas cepas patógenas de interés en alimentos, obteniéndose así su espectro antimicrobiano.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antibacteriano de la cepa de *E. faecalis* F frente a dos bacterias patógenas que comúnmente se encuentran en productos lácteos debido a su capacidad de proliferar frente a diversas condiciones adversas: *L. monocytogenes* y *S. aureus*, haciéndolas crecer junto con *E. faecalis* (co-cultivo) en dos diferentes medios: un medio rico (BHI) y otro que simula la composición de la cuajada del queso Cotija artesanal (medio lácteo con sal). Se variaron las concentraciones de la bacteria en cada reto microbiano, para así finalmente poder observar el potencial de la cepa de *E. faecalis* aislada del queso Cotija artesanal para ser empleada como un futuro cultivo iniciador en alimentos fermentados.

Debido a que se logró observar una disminución en la cuenta de ambas bacterias patógenas en los medios de cultivo, se realizó la identificación de proteínas con actividad antibacteriana, las cuales fueron precipitadas y purificadas parcialmente con sulfato de amonio y ácido tricloroacético. Por medio de la electroforesis y zimogramas se logró identificar el peso molecular aproximado y su actividad contra el microorganismo indicador *Micrococcus lysodeikticus*. Se seleccionó una banda que presentó actividad en el zimograma para su posterior secuenciación, con lo que se logró identificar una proteína de



61 kDa con una región perteneciente a una familia con dominios muy conservados, denominada NlpC/P60, que debe su actividad antibacteriana a su acción como peptidasa de pared celular bacteriana, en otras palabras, se trata de una peptidoglucano hidrolasa (PGH).



2. Marco teórico.

2.1. Características generales del queso Cotija.

El queso Cotija artesanal es un queso mexicano genuino que se elabora desde hace más de 400 años, es producido en la región geográfica que abarca la zona montañosa entre los estados de Jalisco y Michoacán (sierra de Jalmich, Fig. 1). Se elabora a partir de leche entera bronca que proviene de ganado cebú o criollo que se alimenta en pastoreo libre, sal de grano artesanal proveniente del estado de Colima y cuajo de origen animal. Es un queso al cual no se le adiciona ningún cultivo iniciador, que se madura por lo menos tres meses en la región donde se produce (debido a las condiciones de humedad relativa de 60 a 90 % y temperatura de 18 °C a 25 °C), con el fin de que adquiera los aromas y sabores característicos.

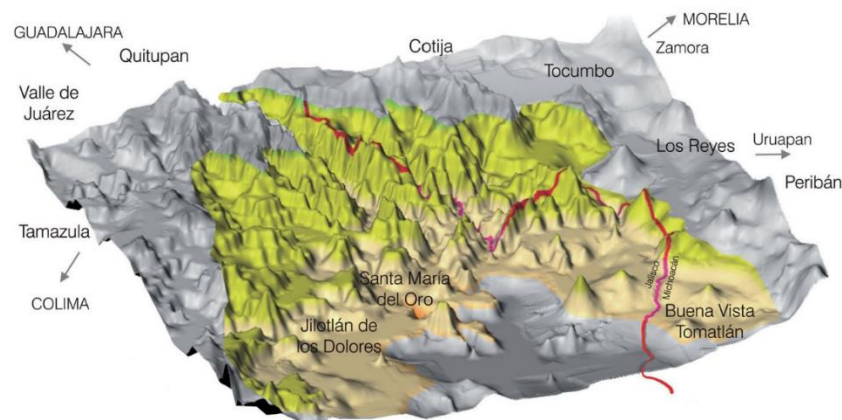


Figura 1. Sierra de Jalmich, las zonas reconocidas como auténticas para la producción de queso Cotija se encuentran ubicadas en los municipios al noreste de Jalisco (Santa María del Oro, Jilotlán de los Dolores y Quitupan) y al noroeste de Michoacán (Cotija, Tocumbo y Buena Vista Tomatlán) (Álvarez *et al.*, 2005).

El producto final presenta gran tamaño y peso (40 cm de diámetro y 20 cm de altura, y un peso alrededor de 20 a 30 kg, Fig. 2), posee una pasta dura, no cocida, prensada, ácida, con un elevado contenido de sal (aproximadamente entre el 4 al 6 %), de consistencia firme y desmoronable.

Su período de elaboración se restringe a los meses con precipitaciones constantes (de Junio a Noviembre) debido a que la vegetación con la que se alimenta el ganado es más abundante durante esa época, aumentando la producción de leche (Álvarez *et al.*, 2005).



Figura 2. Queso Cotija. Tomada de <http://www.sinembargo.mx/26-07-2015/1402348>

2.2. Proceso de elaboración del queso Cotija.

El proceso general para la elaboración del queso es el siguiente: (Álvarez *et al.*, 2005; Parguel *et al.*, 2011).

- 1) Se lleva a cabo una ordeña manual: las personas dedicadas a ordeñar vacas deben asegurarse de cumplir con unas buenas prácticas de higiene (lavado de manos y limpieza de la ubre de las vacas) antes de llevar a cabo la ordeña, con el fin de reducir los riesgos potenciales de contaminación por microorganismos no deseados presentes en el suelo o en la piel como por ejemplo *L. monocytogenes* o *S. aureus*.

Toda la leche recolectada es mezclada para posteriormente ser filtrada a través de cedazos previamente sanitizados, con el fin de separar cualquier materia extraña antes de su uso. Cabe resaltar que la leche no sufre algún proceso térmico, como la pasteurización, que ayude a eliminar microorganismos patógenos o de descomposición.

- 2) Se deja reposar la leche en recipientes de acero inoxidable durante un periodo de tres a cuatro horas, a temperatura ambiente, hasta que alcance una temperatura aproximada de 34 °C (debido a que es la temperatura óptima para ser cuajada).
- 3) Se adiciona aproximadamente 10 mL de cuajo de origen animal (Cuamex XXX ®) por cada 100 L de leche, se mezcla rápidamente y se deja cuajar por aproximadamente una hora.
- 4) Obtenida la consistencia firme de la cuajada, se procede a realizar el corte de la cuajada en pequeños cubos de aproximadamente 1 cm³.
- 5) Se deja reposar hasta que la cuajada cortada se asiente en el fondo del recipiente. Se desuera manualmente o por drenado y se deja escurrir con ayuda de un lienzo o un colador limpio sobre una artesa o mesa de madera o acero inoxidable.
- 6) Posteriormente se adiciona la sal de grano entre un 4 y 6 % de sal sobre la cuajada y se amasa manualmente para homogeneizar.
- 7) Se vacía dentro de un molde de acero inoxidable fajado y cubierto internamente con una manta de fibras de maguey o ixtle para darle forma cilíndrica típica al producto. Se forman piezas de 20 kg aproximadamente.
- 8) Se realiza el proceso de prensado por un período de 18 a 24 h. El prensado regularmente se lleva a cabo empleando piedras de entre 50 y 90 kg colocadas en la parte superior del molde o en algunas ocasiones se emplean prensas de tornillo.
- 9) La pasta prensada se mantiene fajada para que no pierda la forma cilíndrica, se voltea sobre su cara diariamente y se orea a temperatura ambiente durante 15 días o hasta que adquiera la firmeza necesaria para que cada pieza pueda ser manipulada. Durante este tiempo, el queso se voltea y se limpia diariamente con un trapo limpio.
- 10) Una vez obtenida la textura adecuada (formación de la costra), se inicia el proceso de maduración: la pieza se desfaja aunque el proceso de volteado diario se mantiene



y además se limpia con un lienzo limpio cada tercer día. La maduración tiene una duración mínima de 3 meses y es aquí donde suceden varios cambios fisicoquímicos y microbiológicos que van a dar lugar a la generación de aromas, olores y sabores característicos del queso Cotija, así como también se verá mejorada la calidad microbiológica del producto terminado.

Todos los cambios fisicoquímicos y sensoriales que ocurren en el queso durante su periodo de maduración, son debidos a la formulación, a las condiciones de proceso y a las alteraciones provocadas por microorganismos, dentro de los cuales se encuentran principalmente a las bacterias ácido lácticas (BAL), que por medio de su actividad lipolítica y proteolítica sobre los nutrientes del queso, generan nuevos metabolitos que imparten un sabor, aroma o textura característico (Ramírez-López y Vélez-Ruíz, 2012).

2.3. Bacterias ácido lácticas.

2.3.1. Generalidades de las bacterias ácido lácticas.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se definen como cocos o bacilos Gram positivos, no móviles, no esporulados, microaerofilicos o anaerobios, catalasa, oxidasa y reductasa negativos, que se caracterizan por producir ácido láctico como producto final mayoritario por la fermentación de carbohidratos. Es por esto último que se clasifican como BAL homofermentativas y heterofermentativas, donde las primeras sólo producen ácido láctico, mientras que las segundas pueden producir ácido acético y etanol.

Los géneros más representativos de las BAL son: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Axelsson, 2004).

Las BAL están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversos alimentos, tierra, plantas verdes, así como también del tracto digestivo de mamíferos, entre otras fuentes (Torres, 2002; Azadnia *et al.*, 2011).

Debido a varias de sus propiedades metabólicas, las BAL desempeñan un papel importante en la industria alimentaria, por su contribución significativa al sabor, olor, textura y valor



nutricional del producto fermentado (Parra, 2010), así como también ayudan a que este adquiriera una mayor vida de anaquel y una buena calidad sanitaria (Savadogo *et al.*, 2006). Es por ello que este grupo de microorganismos son generalmente utilizados como cultivos iniciadores en la elaboración y conservación de productos lácteos, tales como leche acidificada, yogurt, mantequilla, crema, kéfir y quesos; así como también en el procesamiento de carnes, bebidas alcohólicas y vegetales (García *et al.*, 2002; Carr *et al.*, 2002).

Las BAL son importantes en la manufactura y maduración de los quesos debido a que:

- ❖ La formación de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, mejora el cuerpo y la textura en los quesos, e inhibe en parte, el desarrollo de la microbiota contaminante y patógena.
- ❖ Producen pequeñas cantidades de acetaldehído, acetoína y diacetilo, por la fermentación de citrato, otorgando sabor y aroma agradable.
- ❖ Además, pueden producir dióxido de carbono, que contribuye a la formación de los ojos de algunos quesos.
- ❖ La actividad lipolítica y proteolítica tiene influencia en la formación de compuestos de sabor y aroma típicos de variedades de quesos madurados, como son los ácidos grasos libres y transformaciones enzimáticas de algunos aminoácidos produciendo amoníaco, ácidos orgánicos (ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico) y dióxido de carbono.
- ❖ Pueden producir componentes inhibitorios de otros microorganismos, como bacteriocinas (Ouweland y Vesterlund, 2004; Parra, 2010).

2.3.2. Metabolitos con actividad antibacteriana.

Un metabolito antimicrobiano se define como un compuesto producido por microorganismos, que tiene un efecto sobre microorganismos patógenos o alterantes de alimentos (Erginkaya *et al.*, 2014). La utilización de las BAL y/o sus metabolitos para la preservación de alimentos es generalmente aceptado por consumidores como algo “natural” y como “promotores de salud” (Olson y Aryana, 2008).



Las BAL producen un conjunto de sustancias antimicrobianas (como ácidos orgánicos, diacetilo, acetoína, peróxido de hidrógeno, reuterina, reuteriicina y bacteriocinas) (Osorio y Roldan, 2003; Savadogo *et al.*, 2006) que han sido utilizadas como bioconservadores en productos alimenticios, incluyendo productos lácteos como quesos frescos y madurados, con el objeto de evitar la proliferación de patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp* y *Staphylococcus aureus*. (Ozkaya *et al.*, 2007).

A continuación se presentan algunos metabolitos antimicrobianos producidos por las BAL y de manera general se explica su función frente a los microorganismos:

➤ **Ácidos Orgánicos.**

El ácido láctico es el principal metabolito producido por la fermentación de los carbohidratos por parte de las BAL, el cuál es clasificado como GRAS (generalmente reconocido como seguro) para su empleo como aditivo alimenticio por la FDA (Food and Drug Administration) (Parra, 2010). La actividad antimicrobiana de este ácido orgánico es debida a que posee una naturaleza lipofílica, por lo que puede atravesar la membrana celular y disociarse en el citoplasma, incrementando así la concentración de protones (H^+) presentes en el interior de la célula y provocando así la acidificación del citoplasma. Cuando la concentración de protones excede la capacidad tampón del citoplasma, se transportan hacia el exterior mediante bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Cuando estas reservas se agotan, la bomba de protones se detiene y se provoca el descenso del pH interno (colapso del gradiente electroquímico de transporte de H^+), lo cual causa a su vez desnaturalización de las proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo así con la viabilidad (Vásquez *et al.*, 2009).

Otros ácidos orgánicos producidos por las BAL son el ácido acético y propiónico, aunque en menor cantidad (trazas) y su síntesis depende tanto de la especie del organismo como de las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo el crecimiento microbiano (Vásquez *et al.*, 2009). Su mecanismo de acción es similar al del ácido láctico, sin embargo, el ácido acético es más efectivo debido a que tiene un amplio rango de actividad inhibitoria frente a hongos,



levaduras y bacterias, mientras que en el ácido propiónico ejerce un fuerte efecto antimicrobiano frente a hongos y levaduras. Esta fuerte actividad antimicrobiana por parte del ácido acético y propiónico es debida en parte a su alto valor de pKa comparado con el del ácido láctico (4.87, 4.75 y 3.08 respectivamente) (Ouwehand y Vesterlund, 2004).

➤ **Etanol.**

El etanol es producido por la fermentación de los carbohidratos por las BAL heterofermentativas. Presenta un efecto bactericida sobre células vegetativas de bacterias patógenas, pero no es efectivo contra esporas bacterianas. Su actividad antimicrobiana resulta de la desnaturalización de las proteínas presentes en la célula, así como también daña a la estructura lipídica de la membrana del citoplasma. Sus inconvenientes son que posee una escasa difusión y además se inactiva por los ácidos orgánicos; sin embargo, aumenta la actividad antimicrobiana de algunos compuestos antimicrobianos (Sagdic *et al.*, 2014).

➤ **Peróxido de hidrogeno.**

En presencia de oxígeno, las BAL son capaces de generar peróxido de hidrogeno (H_2O_2), a través de la acción de las flavoproteína oxidasas, NADH oxidasas y superóxido dismutasas. En ausencia de una fuente de grupo hemo, las BAL no producen catalasa para la eliminación de H_2O_2 ; sin embargo, éste no se acumula en cantidades significativas porque es descompuesto por las peroxidasas, flavoproteinas y pseudocatalasas (Ouwehand y Vesterlund, 2004). Su efecto antimicrobiano es debido a la oxidación de los grupos sulfhidrilos de las proteínas, causando la desnaturalización de un cierto número de enzimas y la peroxidación de los lípidos de la membrana, provocando el aumento de la permeabilidad de la misma. El H_2O_2 también es un precursor de la formación de radicales libres con efecto bactericida como lo es el superóxido (O_2^-) y el hidroxilo (OH), radicales que pueden dañar el DNA de las células bacterianas (Erginkaya *et al.*, 2014).



➤ **Dióxido de carbono.**

El dióxido de carbono (CO₂) es un producto final mayoritario de la fermentación de hexosas por BAL heterofermentativas. Un número de BAL son capaces de producir CO₂ a partir de malato, citrato y también por la metabolización de la arginina por medio de la vía arginina desaminasa. Finalmente, la descarboxilación de aminoácidos (histidina, tirosina) pueden llegar a formar CO₂. (Erginkaya *et al.*, 2014).

El CO₂ también contribuye a la actividad antimicrobiana de las BAL. Su papel en la creación de un ambiente anaeróbico mediante la sustitución del oxígeno molecular presente, su capacidad de disminuir el pH extra e intercelular y sus efectos destructivos sobre la membrana celular (disfunción de la permeabilidad), hace que el CO₂ sea un potente sistema de inhibición contra una amplia variedad de microorganismos (Naidu y Clemens, 2000).

➤ **Diacetilo.**

El diacetilo (2,3-butanodiona, Figura 3) es un producto final del metabolismo del piruvato por la fermentación del citrato por las BAL (Naidu y Clemens, 2000). Es responsable del aroma característico asociado a la mantequilla y se ha demostrado que su actividad antimicrobiana es mayor frente a bacterias Gram negativas, levaduras y hongos, que contra las Gram positivas no lácticas (Axelsson, 2004; Ouwehand, 1998). Su efecto antimicrobiano es debido a que inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas por la reacción con la proteína de unión a arginina, afectando la utilización de arginina (Erginkaya *et al.*, 2014).

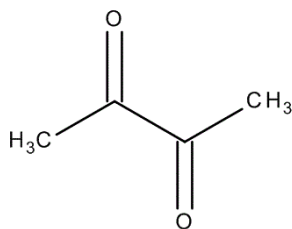


Figura 3. Molécula de diacetilo o 2,3-butanodiona.



➤ **Sustancias de bajo peso molecular.**

Existen múltiples investigaciones que reportan la producción de compuestos de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana por BAL. Entre sus propiedades se tiene lo siguiente:

- Activas a bajo pH.
- Termoestables.
- Amplio espectro de actividad inhibitoria de microorganismos (Ouwehand y Vesterlund, 2004).

Ejemplo de este tipo de sustancias son las que se mencionan a continuación:

➤ **Reuterina.**

La reuterina o 3-hidroxiopropanal (Figura 4) es una sustancia con actividad antibacteriana producida por *Lactobacillus reuteri* durante la fase estacionaria, cuando se cultiva en condiciones de anaerobiosis con una mezcla de glucosa y glicerol o gliceraldehído. Posee una actividad antibacteriana, antifúngica, antiprotozoaria y antiviral, las BAL son incluso sensibles a la reuterina, sin embargo son más resistentes que otros microorganismos. No existen reportes sobre un posible efecto negativo de la reuterina frente a las células humanas.

Su actividad antimicrobiana es debida a que actúa contra las enzimas con grupos sulfhidrilo. Se ha demostrado que es un inhibidor de la subunidad de unión al sustrato de la ribonucleótido reductasa, interfiriendo de este modo con la síntesis de ADN (Ouwehand y Vesterlund, 2004).

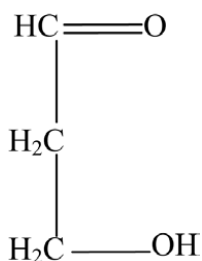


Figura 4. Estructura de la reuterina o 3-hidroxiopropanal.



➤ **Reuteriicina.**

La reuteriicina (Figura 5) es un compuesto inhibidor producido por cepas de *Lactobacillus reuteri*, es estructuralmente pero no funcionalmente relacionada con los ácidos tetrámicos de origen natural (Gänzle y Vogel, 2003). La reuteriicina funciona como un ionóforo; se distribuye dentro de la membrana citoplasmática, debido a su hidrofobicidad, y disipa selectivamente el gradiente de pH transmembranal (Ouwehand y Vesterlund, 2004). La concentración mínima inhibitoria es aproximadamente de 0.06 – 2.5 mg/L para bacterias Gram positivas, mientras que las bacterias Gram negativas no son sensibles debido a la permeabilidad de su membrana externa (Gänzle, 2004).

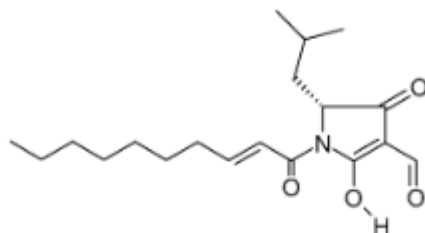


Figura 5. Estructura química de la reuteriicina

➤ **Ácido 2-pirrolidona-5-carboxílico (PCA).**

Se ha reportado que cepas de *Lactobacillus casei* ssp. *casei*, *L. casei* ssp. *pseudopantarum* y *Streptococcus bovis* producen el ácido piroglutámico o PCA (Figura 6). Es térmicamente estable (20 min a 121 °C) pero pierde su actividad cuando el pH aumenta por arriba de 2.5. Su mecanismo de acción antibacteriano es similar al de los ácidos orgánicos (Ouwehand y Vesterlund, 2004).

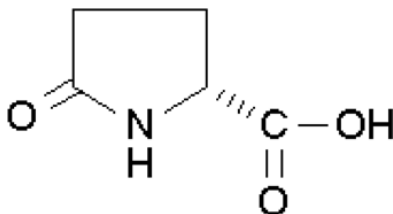


Figura 6. Estructura del ácido 2-pirrolidona-5-carboxílico (PCA).

➤ **Bacteriocinas.**

Las bacteriocinas son péptidos biológicamente activos producidos por algunas bacterias Gram positivas, tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros miembros de la misma especie productora (de bajo espectro) o miembros de distintos géneros bacterianos (de amplio espectro). Son péptidos de bajo peso molecular que son producidas por síntesis ribosomal que se caracterizan por ser estables al calor. Cabe resaltar que los microorganismos que las producen son resistentes a sus propias bacteriocinas; propiedad que se encuentra mediada por proteínas de inmunidad muy específicas (Cotter *et al.*, 2005).

La mayoría de las bacteriocinas son efectivas contra microorganismos patógenos importantes involucrados en enfermedades transmitidas por alimentos, tales como: *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. (Beristain-Bauza *et al.*, 2012).

Muchas de las bacteriocinas son producidas por BAL de grado alimenticio, lo cual ofrece la posibilidad de manipular el ecosistema microbiológico del alimento de forma deliberada, por ejemplo, usando bacteriocinas que protejan al alimento contra la contaminación o la prevención del crecimiento de alguna bacteria patógena específica (Cotter *et al.*, 2005).

Las bacteriocinas se clasifican de acuerdo a sus modificaciones estructurales, tamaño y mecanismo de acción de la siguiente manera:

- ❖ Clase I (Lantibióticos): Son péptidos pequeños (18-38 aminoácidos de longitud) que poseen un peso molecular menor a 5 kDa, contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, β -metillantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de los átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos, formándose 'anillos' internos que dan a los lantibióticos su estructura característica.

- ❖ Clase II (No lantibióticos): Son péptidos pequeños (30 a 60 aminoácidos de longitud) que poseen un peso molecular menor a 10 kDa, termoestables que no



están sujetos a una amplia modificación post-traducciona (no contienen aminoácidos modificados).

- ❖ Bacteriolisinas (anteriormente denominadas clase III): Son proteínas antimicrobianas termolábiles, grandes (>30 kDa). Están estructuradas en dominios, los cuales tienen funciones de translocación, de unión al receptor, y su actividad es letal (Cotter *et al.*, 2005).

Cada uno de los tipos de bacteriocinas posee un mecanismo de acción específico, los cuales se explican de manera resumida en la Figura 7.

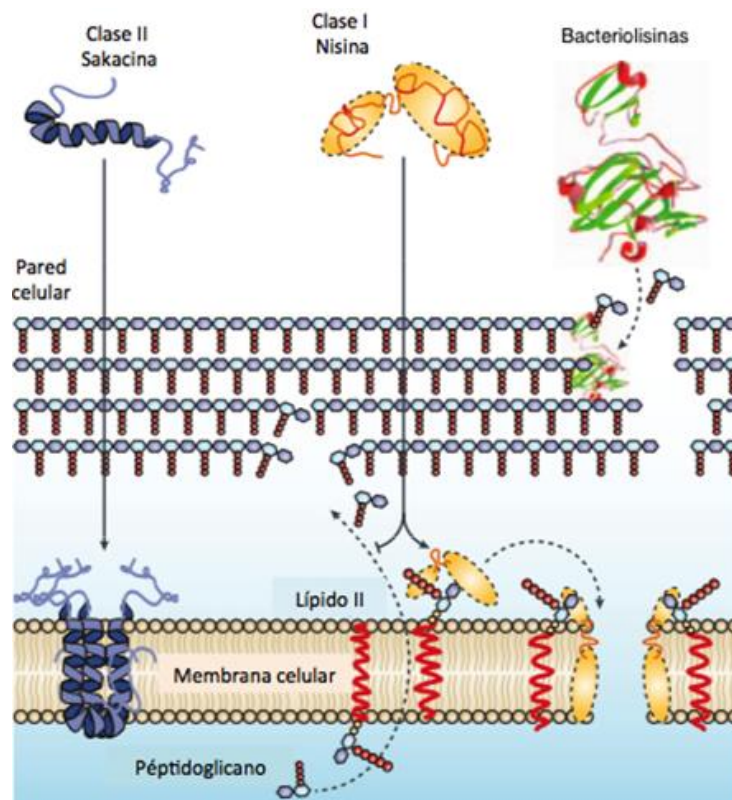


Figura 7. Modo de acción de las bacteriocinas (Cotter *et al.*, 2005).

Las bacteriocinas **clase I** (lantibióticas) poseen un mecanismo doble de acción. Se unen al lípido II, el principal transportador de subunidades de peptidoglucano del citoplasma a la pared celular, impidiendo la correcta síntesis de la pared celular, dando lugar a la muerte celular. Además, pueden utilizar al lípido II como una molécula de acoplamiento para



anclarse e insertarse en la membrana celular y comenzar con la formación de poros, lo que lleva a la bacteria a una muerte rápida. Por otra parte, las bacteriocinas **clase II** (no lantibióticas) poseen una estructura helicoidal anfifílica, lo que les permite insertarse a la membrana de las células, inducen la permeabilización de la membrana y la salida de las moléculas del interior de la bacteria. Finalmente, las grandes proteínas bacteriolíticas (denominadas **bacteriolisinas**, antes conocidas como bacteriocinas clase III), actúan directamente sobre la pared celular de las bacterias Gram positivas, lo que lleva a la muerte y a la lisis de la célula diana (Cotter *et al.*, 2005).

➤ **Peptidoglucano hidrolasas.**

Uno de los elementos más importantes de la célula bacteriana es la pared celular, la cual es responsable del mantenimiento de la forma celular y la protección contra la lisis osmótica. La resistencia y rigidez de la pared celular es debida a una capa de peptidoglucano, como se muestra en la Figura 8, es una estructura macromolecular covalente que consiste en cadenas fuertes de glucano que están entrelazadas por puentes peptídicos flexibles (Cabeen MT y Jacobs-Wagner C. 2005).

La familia de las peptidoglucano hidrolasas (PGHs) se compone de un gran grupo heterogéneo de enzimas que se unen, modifican y degradan el peptidoglucano, componente principal de la pared celular cuya integridad es esencial para la supervivencia bacteriana (Vollmer *et al.*, 2008a; Fridrich y Gaynor, 2013).

Están implicadas en varias funciones fisiológicas: intercambio celular, división celular, la formación de flagelos y pili, esporulación y germinación de esporas. Además son esenciales para la población bacteriana debido a que están involucradas en el desarrollo de la lisis (Allocati *et al.*, 2015).



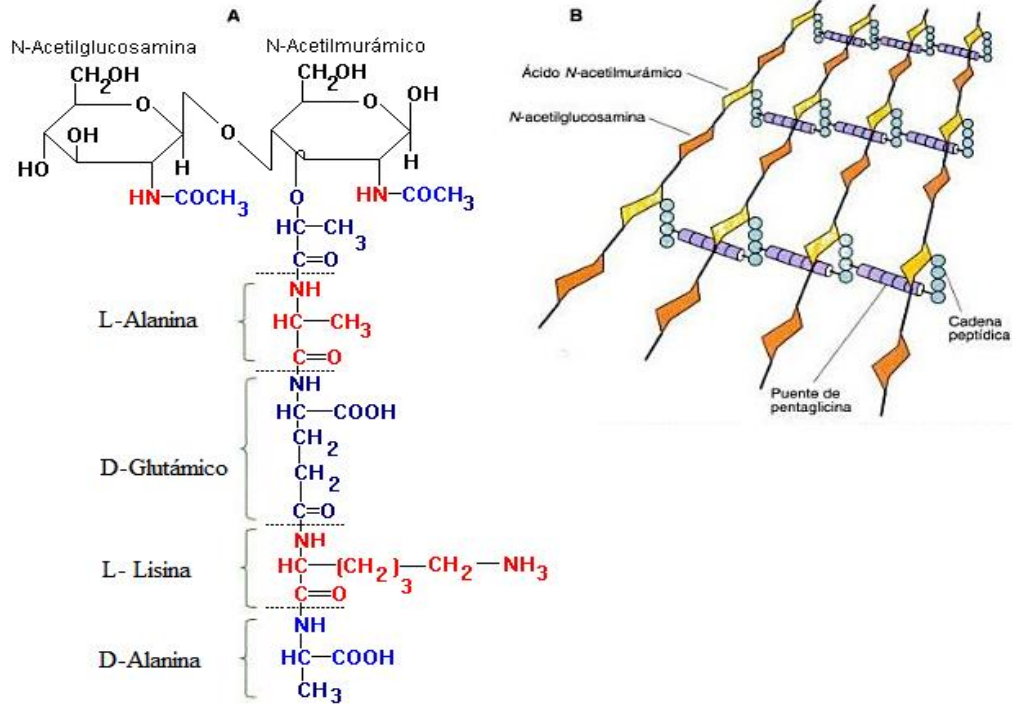


Figura 8. Estructura química del peptidoglucano. **A:** Las cadenas de glucano se componen de residuos alternos de N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetylmurámico (NAM) unidos por enlaces β -1 \rightarrow 4. El residuo de ácido láctico de NAM forma un enlace amida con un tetra péptido que contiene un D- aminoácido para formar la unidad de repetición de peptidoglucano, su composición con frecuencia es L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala (Vollmer, *et al.*, 2008a). **B:** Cadenas de glucano unidas por enlaces peptídicos entre los tetra péptidos, formando así la red polimérica de peptidoglucano. (Adaptado de Voet *et al.*, 2004).

Las PGHs se clasifican de acuerdo a la especificidad de su sitio activo como: glucosaminidasas, muramididasas, amididasas y endopeptidasas (Vollmer *et al.*, 2008b). En la Figura 9 se explican los sitios de acción de cada una de las PGHs.



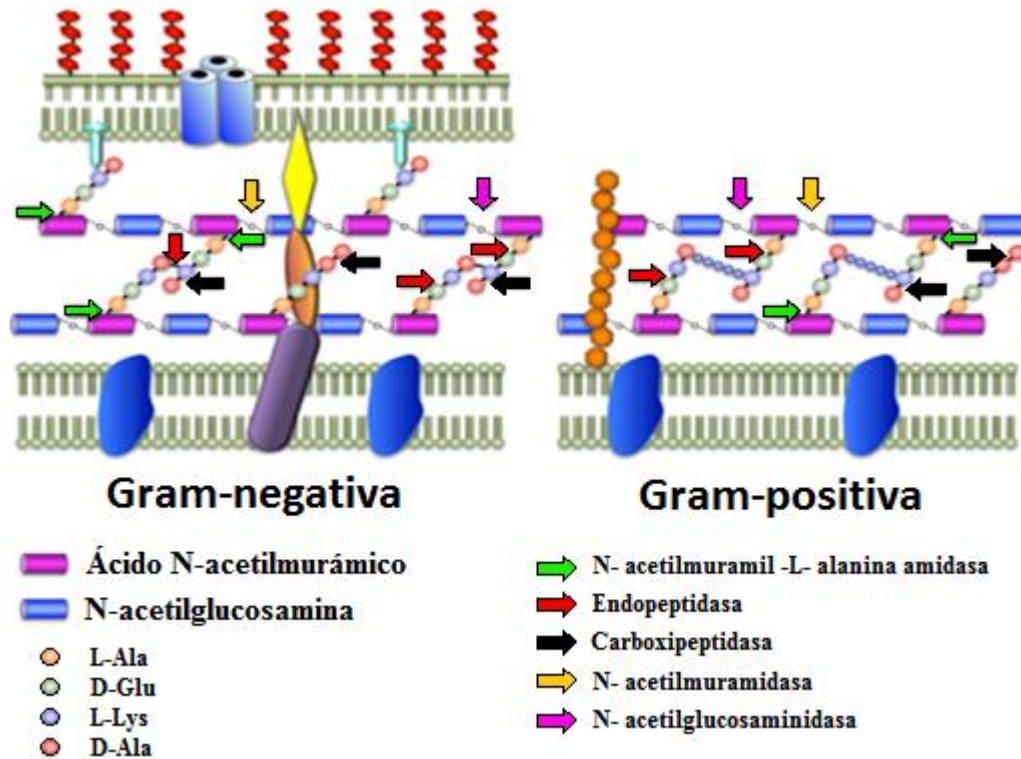


Figura 9. Representación esquemática de los sitios de acción de las PGHs en la pared celular de bacterias Gram positivas y Gram Negativas (adaptado de Allocati *et al.*, 2015).

Las amidasas, actúan en el enlace amida entre el ácido N-acetil murámico y L- alanina. (Flechas verdes). Las endopeptidasas hidrolizan los enlaces peptídicos situados en el centro de una molécula proteica, dividiendo por lo tanto la proteína o polipéptido en 2 fragmentos de aproximadamente el mismo tamaño (flechas rojas). Las carboxipeptidasas hidrolizan un enlace peptídico situado en el extremo carboxi-terminal de una proteína o polipéptido, liberando de esta forma el aminoácido situado al final de la cadena (flechas negras). Las N-acetilmuramidasa hidrolizan el enlace glucosídico entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina, dejando un extremo reductor del ácido N- acetilmurámico (flechas azules). Y las N-acetilglucosaminidasas hidrolizan el enlace glucosídico entre la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico, dejando un extremo reductor de la N-acetilglucosamina (flechas magenta) (Allocati *et al.*, 2015; Vollmer *et al.*, 2008b).

2.4. *Enterococcus* spp.

Dentro del grupo de las BAL encontradas en múltiples alimentos fermentados, se ha logrado aislar diferentes cepas del género *Enterococcus* tanto en productos cárnicos, así como también en productos lácteos.

2.4.1. Generalidades de *Enterococcus*.

Los enterococos son cocos Gram positivos que típicamente se disponen en parejas y en cadenas cortas (Figura 10). Crecen de forma aerobia y anaerobia en un amplio intervalo de temperaturas (10 – 45 °C), en una amplia gama de valores de pH (4.6 a 9.9) y en presencia de altas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) y de sales biliares. Fermentan un amplio rango de carbohidratos con producción principalmente de ácido láctico, acidificando el medio en el que se encuentra a un pH final de 4.2 – 4.6. Por lo tanto reciben comúnmente la denominación de BAL. Las características bioquímicas sobresalientes incluyen: son catalasa negativos, tienen la capacidad de hidrolizar la esculina, crecen en presencia de NaCl al 6.5 % y de bilis al 40 % e hidrolizan la L- pirrolidonil β-naftil-amida (PYR). Estas propiedades permiten distinguir a los enterococos de la mayoría de otros cocos Gram positivos y catalasa negativos (Díaz *et al.*, 2010; Murray, 2013).

Los enterococos se clasificaron previamente como estreptococos del grupo D de Lancefield debido a que comparten el antígeno de la pared celular del grupo D, un ácido teicoico con glicerol con otros estreptococos. En el año de 1984, los enterococos se clasificaron en el nuevo género *Enterococcus*, el cual consta actualmente de 40 especies; sin embargo, relativamente pocas especies son patógenos importantes para los seres humanos. Las especies que se aíslan con mayor frecuencia y que son clínicamente las más importantes son *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. *Enterococcus gallinarum* y *Enterococcus casseliflavus* también constituyen frecuentes colonizadores del aparato digestivo del ser humano y revisten importancia porque estas especies muestran una resistencia intrínseca frente a la vancomicina (Murray *et al.*, 2013).



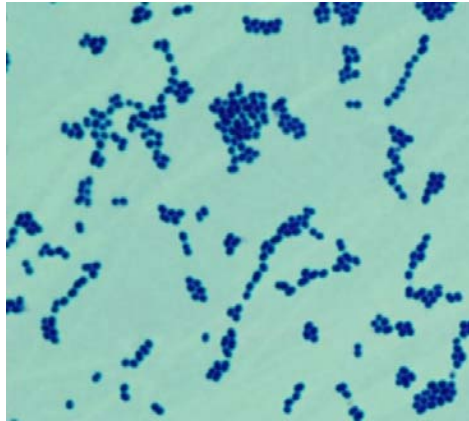


Figura 10. Tinción de Gram de *Enterococcus faecalis*.

2.4.2. Patogenicidad.

Los enterococos forman parte de la microbiota gastrointestinal, encontrándose en más del 90 % de los individuos sanos. Por ello, con frecuencia son considerados como comensales inocuos, o bien, con bajo potencial patogénico. Sin embargo, esta percepción ha cambiado en las últimas décadas debido al incremento de su incidencia en las infecciones nosocomiales, así como de su resistencia a los antibióticos. Los enterococos se encuentran entre los principales agentes causantes de infecciones nosocomiales, estando implicados con mayor frecuencia en infecciones del tracto urinario y bacteremias primarias y secundarias. También ocasionan endocarditis y otras infecciones mucho más infrecuentes, tales como meningitis postquirúrgica, osteomielitis e infecciones respiratorias. Son patógenos oportunistas que generalmente provocan infecciones en personas con enfermedades subyacentes graves o inmunodeprimidos. La especie aislada con mayor frecuencia es *E. faecalis* (80-90 %), seguida de *E. faecium* (5-10 %) y otras especies de enterococos (menos del 10 %) (Abriouel *et al.*, 2008).

La virulencia está mediada por dos propiedades generales: 1) capacidad para adherirse a los tejidos y formar biopelículas y 2) resistencia a los antibióticos. Son numerosos los factores descritos que median en la adherencia y en la formación de biopelículas, como proteínas de superficie, glucolípidos membranaarios, gelatinasa y pili. Además, los enterococos son intrínsecamente resistentes a muchos de los antibióticos utilizados habitualmente (p. ej.,

oxacilina, cefalosporinas) o han adquirido genes de resistencia (p. ej., aminoglucósidos, vancomicina) (Díaz *et al.*, 2010; Murray, 2013).

2.4.3. Presencia de *Enterococcus* en alimentos.

Más allá de que los enterococos sean considerados como indicadores del grado de higiene de los alimentos, juegan un papel importante en la elaboración de diversos tipos de alimentos mediante fermentación y contribución al desarrollo de las propiedades organolépticas durante los procesos de maduración de muchos alimentos. Ello se debe tanto a su elevada tolerancia a las condiciones ambientales desfavorables (deseccación, congelación, calor, ácidos orgánicos, NaCl, etc.), así como a su metabolismo fermentador y al bagaje enzimático que poseen muchas de las cepas.

La presencia de enzimas glicolíticas es de vital importancia para el aprovechamiento tanto de los azúcares presentes en los alimentos para la producción de ácidos orgánicos y otros componentes, así como también para la degradación de otros azúcares considerados como factores anti nutricionales como lo es la rafinosa o la estaquiosa, o bien otros componentes (como los glucósidos) que pueden resultar tóxicos para la célula (Abriouel *et al.*, 2008).

La actividad lipolítica por parte de las esterasas lipasas resulta de indudable valor para el desarrollo de sabores y aromas, conferidos por los propios ácidos grasos resultantes de la hidrólisis (especialmente en aquellos de cadena corta), y por los compuestos (tales como aldehídos, ésteres y cetonas) resultantes de posteriores transformaciones y reacciones con otros componentes del alimento, que pueden tener lugar durante los procesos de maduración (Abriouel *et al.*, 2008).

Finalmente la actividad proteolítica es importante tecnológicamente en productos lácteos, ya que la hidrólisis de la caseína induce cambios de textura. Así mismo, los péptidos liberados pueden conferir sabores característicos al queso (que pueden ser agradables o inapropiados, dependiendo del tipo de queso) (Abriouel *et al.*, 2008).

En los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios en los que se concluye que los enterococos tienen un importante papel en la maduración de quesos tradicionales elaborados a partir de leche cruda o pasteurizada, como se muestra en la Tabla 1. Se han



encontrado enterococos en niveles que oscilan entre 10^4 y 10^7 UFC/g de queso, siendo los más predominantes *E. faecium* y *E. faecalis*. Su presencia en el queso se debe, en parte, a la contaminación de la leche y a la supervivencia en el ambiente de la lechería mientras que otra parte proviene del crecimiento bajo las condiciones de fabricación y la maduración del queso (Ogier *et al.*, 2008; Abriouel *et al.*, 2008).

Tabla 1. Ejemplos de algunos quesos madurados de los cuales contienen enterococos (Abriouel *et al.*, 2008).

Origen	Producto
España	Cebreiro, Tetilla, Serra da Estella, Cueva de la Magahá, Quesaila y Torta Arochena, Genesoto, Armada, Idiazábal, Manchego
Italia	Fiore Sardo, Vanoi, Rolle, Mozzarella, Fontina, Provolone, Pecorino, Montasio
Francia	Saint Nectaires, Comté
Grecia	Feta, Kefalotyri, Batzos, Orinotyri, Anthotyro
Portugal	Picante, y otros quesos regionales
Eslovenia	Tolmic
Serbia	Zlatar
Irlanda	Cheddar
Marruecos	Jben

Así como también se ha visto que los enterococos son importantes para la producción de quesos, de igual forma están presentes en otros productos fermentados, como las salchichas y aceitunas (Franz *et al.*, 1999; Giraffa, 2002), sin embargo su papel en estos productos no se ha aclarado totalmente. Además, la producción de bacteriocinas por los enterococos se ha documentado bien, por ejemplo la enterocina EJ97 producida por *E. faecalis* que inhibe a *L. monocytogenes* (García *et al.*, 2004), así como también la enterocina A con efecto anti-*Listeria* producida por *E. faecium* EFM01 aislado de un queso (Ennahar y Deschamps, 2000).

Es más, se usan los enterococos hoy en día como microorganismos probióticos para mejorar el equilibrio de la microbiota del intestino o como un tratamiento para la gastroenteritis en humanos y animales (Franz *et al.*, 1999). Tal es el caso de la cepa de *E. faecium* SF68 que se produce en Suiza (Cylactin®), la cual ha sido bien estudiada para ser



usada como probiótico. Se ha propuesto que esta cepa es eficaz en la prevención de diarrea asociada al uso de antibióticos y en el tratamiento de diarrea en infantes. De igual forma su uso en la alimentación de animales, refuerza las funciones inmunes y humorales (Cabeza, 2015).

2.5. *Staphylococcus aureus*.

Así como los alimentos fermentados pueden contener múltiples BAL que ayudan a modificar los aspectos nutricionales, fisicoquímicos y sensoriales para el bien de estos, existe la posibilidad de que dadas las condiciones higiénicas durante el proceso de elaboración de dichos alimentos, permitan el desarrollo de ciertas bacterias patógenas o de descomposición de los alimentos como lo son *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* o coliformes, que además de producir un cambio desagradable, pueden producir un daño a la salud de quien lo consuma.

2.5.1. Generalidades de *Staphylococcus*.

Los integrantes del género *Staphylococcus*, son cocos Gram positivos. Microscópicamente se encuentran en pares, tétradas o formando racimos irregulares (muy parecido a un racimo de uvas, Figura 11). Son inmóviles, no formadoras de esporas, generalmente no poseen cápsula, la mayoría de las especies producen catalasa (característica muy útil para diferenciarlos de *Enterococcus* y *Streptococcus*); sin embargo, no son capaces de producir la enzima coagulasa, a excepción de *S. aureus*. Son capaces de crecer en una variedad de condiciones aeróbica y anaeróbicamente en presencia de una elevada concentración de sal (p. ej., cloruro de sodio al 10 %), entre un rango de pH de 4.0 a 9.6 y a temperaturas de 18-40 °C (Pascual, 2009; Murray, 2013).



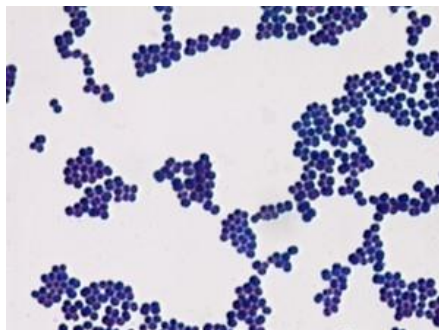


Figura 11. Tinción de Gram de *S. aureus*.

El género *Staphylococcus* incluye actualmente 42 especies diferentes. Algunas de ellas forman parte de la microbiota normal de piel y mucosas en humanos y otras se encuentran sólo entre la microbiota de animales mamíferos y aves, así como también pueden estar presentes en el aire, el polvo y agua. Por lo general, cada especie tiende a ocupar una localización anatómica específica en el huésped que coloniza. Entre las especies que suelen colonizar al ser humano (Tabla 2), las de mayor importancia clínica son *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* y *S. aureus*; siendo esta última, sin duda, la más importante de todo el género en patología infecciosa (Pascual, 2009).

Tabla 2. Especies de estafilococos que se encuentran normalmente colonizando al ser humano (Pascual, 2009).

Especie	Área colonizada	Infección
Coagulasa positivo <i>S. aureus</i>	Piel, fosas nasales	Muy frecuente
Coagulasa negativos*		
<i>S. epidermidis</i>	Fosas nasales, piel, mucosas	Frecuente**
<i>S. saprophyticus</i>	Tracto urinario	Frecuente
<i>S. haemolyticus</i>	Piel	Poco frecuente
<i>S. hominis</i>	Piel	Poco frecuente
<i>S. capitis</i>	Cuero cabelludo	Rara
<i>S. warnerii</i>	Piel	Rara
<i>S. simulans</i>	Piel, uretra femenina	Rara
* Con frecuencia se encuentran como contaminantes de muestras clínicas y su aislamiento debe ser valorado clínicamente.		
** Infecciones asociadas a prótesis y catéteres intravasculares.		

2.5.2. Intoxicación causada por *Staphylococcus aureus*.

La intoxicación alimentaria por estafilococos es una de las enfermedades más frecuentes transmitida por alimentos causada por la ingestión de enterotoxinas producidas por una cepa enterotoxigénica de *S. aureus* que contaminó y se desarrolló en el alimento (Murray, 2013). Su presencia en alimentos procesados se debe a la contaminación introducida por los manipuladores, por inadecuadas prácticas de manufactura o por la utilización de materia prima contaminada (Manfredi, 2010).

En general, se considera que los estafilococos enterotoxigénicos deben alcanzar niveles de al menos 10^5 a 10^6 UFC/g o mL de alimento para producir cantidades detectables de enterotoxinas estafilocócicas (aproximadamente 1 μ g). En Europa, las contaminaciones de bajo grado por *S. aureus* son toleradas en la mayoría de los productos alimenticios (hasta 10^4 UFC/g en quesos de leche cruda) ya que no se consideran un riesgo para la salud pública (Moroni *et al.*, 2009).

Las enterotoxinas son sustancias de naturaleza polipeptídica de bajo peso molecular (26–34 kDa) que poseen estabilidad térmica (p. ej., 100 °C durante 30 minutos) y una gran resistencia a la hidrólisis por enzimas gástricas y yeyunales. Su producción ocurre generalmente entre los 40-45 °C y en un amplio rango de pH, siendo el óptimo de 7.0 a 8.0. Actualmente se ha identificado 18 enterotoxinas estafilocócicas (de la A a la R), de las que la enterotoxina A es la que con más frecuencia se asocia a las intoxicaciones alimentarias. Las enterotoxinas C y D se encuentran en los productos lácteos contaminados, y la enterotoxina B produce colitis pseudomembranosa estafilocócica. La prevalencia o la importancia clínica de las restantes toxinas se conocen en menor medida. Estas toxinas son superantígenos que son capaces de inducir la activación de los linfocitos T y la liberación de citosinas (Cameán *et al.*, 2012; Manfredi, 2010; Murray, 2013).

Los alimentos que se contaminan con mayor frecuencia son los que contienen un alto contenido proteínico como son los productos cárnicos, como el jamón, productos de pastelería como lo son los bollos rellenos de crema, las ensaladas, los helados y productos lácteos. De igual forma se presenta en alimentos cocinados que se recontaminan posteriormente debido a la eliminación de la microbiota competente que restringen el



desarrollo de *S. aureus* o bien por una inadecuada temperatura de conservación (Chin, 2001; Cameán *et al.*, 2012).

Cabe destacar que los alimentos contaminados con esta bacteria, no presentan ningún cambio sensorial, por lo que no se distinguen de los alimentos que no están contaminados, por esta razón el peligro de ingerir alimentos contaminados con *S. aureus* es alto (Murray, 2013).

El periodo de incubación y la severidad de los síntomas observados dependen de la cantidad de enterotoxina ingerida y la susceptibilidad del individuo. Los síntomas iniciales, náuseas seguidas de vómito, aparecen dentro de los 30 minutos a 8 horas (en promedio 3 horas) después de haber ingerido el alimento contaminado. Otros síntomas comúnmente descritos son dolor abdominal, diarrea, mareos, escalofríos y debilidad general, a veces asociada con fiebre moderada. En casos severos, se han reportado dolores de cabeza, calambres musculares y presión arterial baja. En la mayoría de los casos, la recuperación se produce dentro de 24 – 48 horas sin tratamiento específico, mientras que la diarrea y debilidad general pueden durar 24 horas o más (Hennekinne y Dragacci, 2014).

2.5.3. Regulación sanitaria de *Staphylococcus aureus* en quesos madurados.

De acuerdo a la legislación vigente, la NOM-243-SSA1-2010 estipula que para quesos madurados el límite de *S. aureus* es ≤ 100 UFC/g o mL, así como también indica la ausencia de enterotoxinas estafilocócicas. Mientras que la NMX-F-735-COFOCALEC-2011 indica exactamente lo anterior, solo que para el caso del queso Cotija.

2.6. *Listeria monocytogenes*.

2.6.1. Generalidades de *Listeria*.

Las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son bacilos cortos Gram positivos que con frecuencia se disponen en parejas o en cadenas cortas (Figura 12), no formadoras de esporas, anaerobias facultativas, catalasa positivas y presentan movilidad (Murray, 2013).



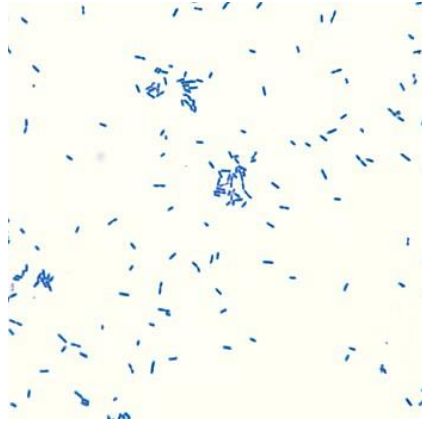


Figura 12. Tinción de Gram de *Listeria monocytogenes*.

Las especies de *Listeria* están muy extendidas en el medio ambiente. Se han aislado del suelo, materia vegetal en putrefacción, material fecal, aguas residuales, alimentos frescos y procesados, alimentos crudos de origen animal, queso, leche no procesada, así como en el tracto digestivo de humanos y animales asintomáticos. Debido a su amplia distribución, este microorganismo tiene muchas oportunidades de contaminar alimentos en distintos pasos de la producción alimentaria, siendo ésta la vía más frecuente por la que el ser humano adquiere la infección (Seoane, 2013).

El género *Listeria* está formado por 10 especies, de las que *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son los únicos patógenos reconocidos. *L. monocytogenes* representa un destacado patógeno del ser humano, mientras que *L. ivanovii* constituye en esencia un patógeno animal.

L. monocytogenes ha sido una grave amenaza para la industria alimentaria debido a su capacidad para sobrevivir a las más comunes condiciones de procesamiento de alimentos tales como el pH (4.1 – 9.6), la alta concentración de sal (hasta el 10 %), baja actividad de agua y temperaturas de refrigeración (por debajo de los 4 °C) (Jay *et al.*, 2005; Liu y Busse, 2009). Sin embargo, puede ser eliminado o reducido por medio de la pasteurización debido a que no sobrevive a la temperatura del proceso (por arriba de los 75 °C) (Law *et al.*, 2015).

Es bien conocido que *L. monocytogenes* es capaz de adherirse a las superficies de contacto con alimentos tales como el acero inoxidable y el poliestireno durante el procesamiento de alimentos por medio de biopelículas, las cuales son importantes para su supervivencia en ambientes hostiles. Dichas películas pueden persistir durante un largo tiempo y además

toleran altas concentraciones de desinfectantes, sanitizantes y antimicrobianos. Esto puede dar lugar a la contaminación de las superficies en contacto con alimentos que luego conducen a un mayor riesgo de contaminación de los alimentos durante y/o después del procesamiento (Law *et al.*, 2015).

2.6.2. Infección causada por *Listeria monocytogenes*.

Alimentos contaminados con *L. monocytogenes* han planteado una gran preocupación a la industria alimentaria, debido a que pueden causar una infección grave conocida como listeriosis. A diferencia de otras infecciones transmitidas por alimentos, tiene una alta tasa de mortalidad de alrededor del 23 % y es uno de los motivos que concita su interés (Schwartz *et al.*, 1989).

La listeriosis afecta principalmente a segmentos específicos de la población cuya vulnerabilidad es mayor como personas inmunocomprometidas y mujeres embarazadas. Su cuadro clínico es grave debido al daño que puede provocar a nivel del sistema nervioso central (Doyle y Beuchat, 2012; Jay *et al.*, 2006).

Durante las primeras etapas de la infección, se muestran síntomas inespecíficos parecidos a la gripe (por ejemplo, fiebre y escalofríos, fatiga, dolor de cabeza, muscular y de las articulaciones) y gastroenteritis (que puede ser observado antes de la aparición de bacteriemia o en individuos sanos infectados con una dosis alta de *L. monocytogenes* no acompañado de otros síntomas).

La gravedad y el pronóstico de la enfermedad son claramente dependientes en el estado inmune de los individuos. En un individuo inmunocompetente, las bacterias invasoras de *L. monocytogenes* son combatidas y eliminadas por la red inmune mediada por células del huésped y los síntomas de la enfermedad a menudo desaparecen con un corto tiempo (en cuestión de días). Sin embargo, en las personas inmunocomprometidas, *L. monocytogenes* tiene una propensión a causar problemas especialmente graves con el aborto y la muerte ocasional como resultados frecuentes, dada la capacidad de *L. monocytogenes* de cruzar el intestino del huésped, la barrera hematoencefálica, y las barreras fetoplacentarias, afectando



el útero en el embarazo, el sistema nervioso central o el torrente sanguíneo (Liu y Busse, 2009).

Los síntomas varían dependiendo de la persona infectada: (CDC, 2015).

- Las mujeres embarazadas pueden experimentar síntomas leves parecidos a los de la influenza (gripe); sin embargo, las infecciones durante el embarazo pueden provocar abortos espontáneos o muertes fetales, partos prematuros o infecciones en el recién nacido (granulomatosis infantiséptica).
- Las personas de edad avanzada o con sistema inmunitario débil pueden presentar septicemia y meningitis.
- Las personas inmunocompetentes pueden presentar gastroenteritis febril aguda o sin síntomas.

En general, los niveles de *L. monocytogenes* en los alimentos implicados han superado las 100 UFC/g, pero ha habido casos en que el nivel observado de *L. monocytogenes* en el alimento implicado ha sido sustancialmente menor. Lo cual indica que la dosis de infección puede depender tanto como el estado inmunológico del hospedero o como a la cantidad real del patógeno en la porción del alimento consumido, la cual podría variar considerablemente entre el consumo y el análisis del alimento contaminado, ya que puede permitir la multiplicación o la muerte de las listerias (Doyle y Beuchat, 2012; World Health Organization, 2004).

2.6.3. Regulación sanitaria de *Listeria monocytogenes* en quesos madurados.

De acuerdo a la legislación vigente, la NOM-243-SSA1-2010 estipula que para quesos madurados *L. monocytogenes* debe estar ausente en 25 g o mL. Mientras que la NMX-F-735-COFOCALEC-2011 indica que el queso Cotija debe encontrarse libre de *L. monocytogenes*.

3. Antecedentes.

En el grupo de trabajo, se realizó un estudio de la población microbiana del queso Cotija empleando medios de cultivo selectivos para BAL, identificándose principalmente al género *Enterococcus* y *Lactobacillus*. De igual forma se estudió la población de coliformes en 3 muestras de queso Cotija durante 60 días de maduración y al mismo tiempo se evaluó el pH, la acidez y la actividad acuosa (a_w) del queso Cotija. Se reportó una disminución de más del 95 % de la población inicial de coliformes presentes en las muestras de queso Cotija (Figura 13), dicho efecto se debe a la disminución del a_w y al aumento de la acidez del producto. Aunado a estos factores fisicoquímicos, la disminución de la carga microbiana se puede atribuir también a la producción de compuestos antibacterianos producidos por las bacterias ácido lácticas presentes en el queso Cotija (Bravo, 2008).

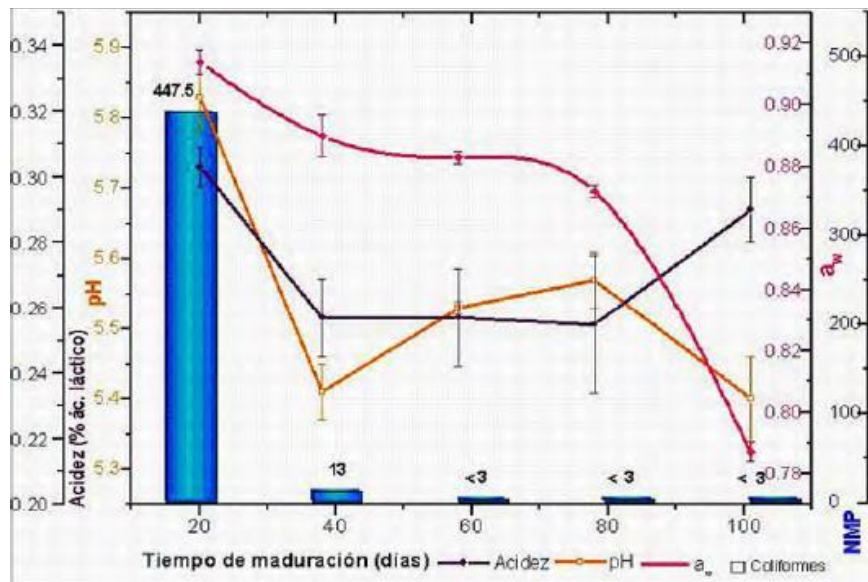


Figura 13. Resultados fisicoquímicos del queso Cotija, comparados con la cuenta de coliformes (Bravo, 2008).

Posteriormente se lograron aislar 7 cepas del género *Enterococcus* presentes en el queso Cotija, 4 cepas de *Enterococcus faecium* (B, C, D y G) y 3 cepas de *Enterococcus faecalis* (A, E y F), las cuales fueron identificadas por medio de métodos moleculares con la secuenciación del gen ADN_r 16S. Cabe resaltar que dichas cepas no son la población dominante en el queso Cotija, sin embargo están presentes durante y después del periodo de maduración del queso Cotija (Zúñiga, 2009).



En años posteriores se realizaron múltiples experimentaciones con las cepas de *Enterococcus* aisladas del queso Cotija, una de ellas fue un estudio realizado sobre la producción de compuestos antibacterianos en medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS). Se reportó una mayor actividad antibacteriana (bacteriostática) por parte de los compuestos extracelulares de la cepa F de *E. faecalis* cuando se encontraba en la fase estacionaria temprana de crecimiento, contra los microorganismos *S. aureus* y *E. coli* (Figura 14).

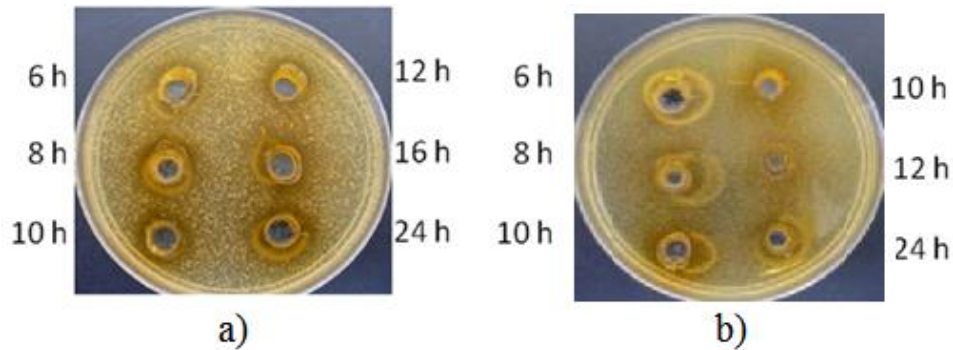


Figura 14. Prueba presuntiva por difusión en agar BHI de la cepa de *E. faecalis* F usando como microorganismos indicadores a) *S. aureus* y b) *E. coli*. (Delgado, 2013).

De igual forma en otra experimentación con la cepa F de *E. faecalis*, se reportó que sus compuestos extracelulares crudos (pH ajustado a 7, filtrados y concentrados) poseen actividad inhibitoria frente a *S. aureus* y *E. coli* (Figura 15) en un amplio rango de acción a pH 5.0 a 8.0, además de que son estables térmicamente (p. ej. 100 °C por 60 min) y que dicha actividad no se ve influenciada por la concentración de sal en el medio (Hernández, 2010).

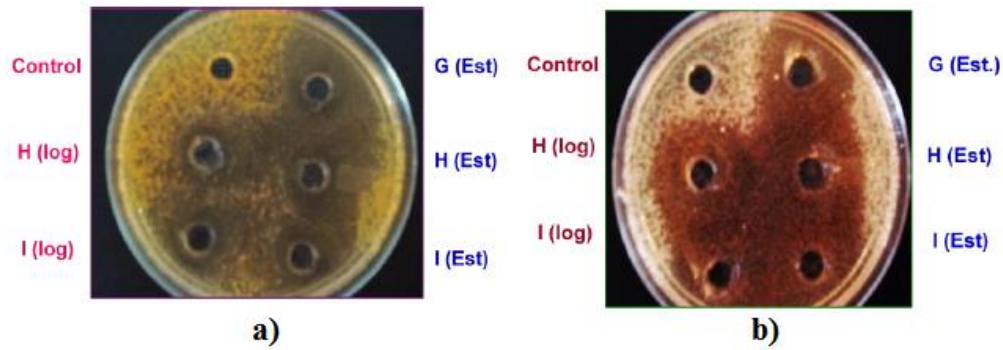


Figura 15. Actividad antibacteriana de las cepas de BAL sobre a) *S. aureus* y b) *E. coli* en agar MRS. Izquierda: sobrenadantes en fase logarítmica tardía; Derecha: Sobrenadantes en fase estacionaria temprana; Control: ausencia de sobrenadante; G: *E. faecium*; H: *L. brevis*; I: *E. faecalis* F (Hernández, 2010).

Posteriormente se reportó que la actividad antibacteriana de la cepa F de *E. faecalis* al ser cultivada en medio MRS, podía estar dada en parte a la producción de peptidoglucano hidrolasas (PGH), identificándose una de 76 kDa con actividad *N*-acetilglucosaminidasa llamada AtlA (Figura 16) (Serrano, 2010).

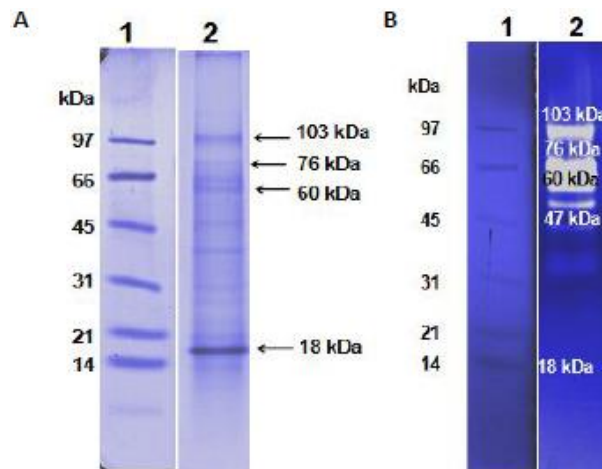


Figura 16. A: Perfil electroforético de los sobrenadantes concentrados de la cepa F de *E. faecalis* desarrollado en medio MRS (2). Marcador de peso molecular bajo (1). Proteína total por pozo, 40 μ g. Gel SDS-Tris-Tricina, 10 % de poliacrilamida. B: Zimograma de actividad lítica contra *M. lysodeikticus* de los sobrenadantes concentrados de la cepa F de *E. faecalis* (2). Marcador de peso molecular bajo (1). Proteína total por pozo, 40 μ g. Gel SDS-Tris-Tricina, 10 % de poliacrilamida (Serrano, 2010).

De igual forma se trató de identificar si la actividad antibacteriana por parte de la cepa F de *E. faecalis* se atribuía a la producción de enterocinas; sin embargo, no se encontraron genes que codificaran para las enterocinas A y AS-48, las cuales han sido previamente caracterizadas y reportadas en la literatura, ni tampoco se detectó la producción de ninguna mediante zimografía (Olvera, 2013).

Finalmente se reportó el espectro antibacteriano tanto para la cepa G de *E. faecium* y la cepa F de *E. faecalis*, dicha actividad fue determinada mediante la técnica de difusión en placa, adicionando a las proteínas precipitadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de las BAL ya mencionadas en pequeños pozos elaborados en el agar con el césped bacteriano de múltiples patógenos. Entre las bacterias Gram positivas susceptibles a estas BAL se encontraron a *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* y *Micrococcus lysodeikticus*, mientras que para el caso de las bacterias Gram negativas las más susceptibles fueron *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa* (García- Cano *et al.*, 2014).

Al mismo tiempo se realizaron experimentaciones con el queso Cotija con el fin de comprobar si durante su proceso de elaboración, se llegara a contaminar con *S. aureus* o *L. monocytogenes*, debido a unas malas prácticas de higiene o en cuanto a la calidad de la materia prima, estos patógenos fueran o no capaces de sobrevivir en el queso Cotija durante su periodo de maduración. En ambos caso se analizaron 95 muestras de queso Cotija artesanal por medio de la técnica de PCR en tiempo real.

Para el caso de *L. monocytogenes*, no se encontró ADN en ninguna de las muestras de queso Cotija analizadas, sin embargo esto no significa que debido a las condiciones de proceso y a las propiedades del producto terminado, no exista el riesgo de que *L. monocytogenes* pudiera desarrollarse en este alimento (Becerra, 2013). Mientras que para la detección de *S. aureus*, se encontró ADN de dicha bacteria en varias muestras de queso, sin embargo no se logró aislar colonias típicas de *S. aureus* en medio Baird Parker, lo cual indica que probablemente *S. aureus* estuvo presente en algún momento en el queso Cotija, sin embargo al termino del proceso de maduración, esta bacteria ya no se encontraba viable, por lo cual no hubo desarrollo de colonias en el agar Baird Parker; (Salto, 2013).



4. Justificación.

En investigaciones previas en el grupo de trabajo se ha observado que los compuestos secretados por *E. faecalis* poseen una actividad antibacteriana frente a múltiples bacterias patógenas.

El propósito de este trabajo es determinar si la cepa F de *E. faecalis* es capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus* o de *L. monocytogenes*, al ser cultivadas una u otra de estas bacterias patógenas en un mismo medio de cultivo con *E. faecalis* (co-cultivo), ya que ambas bacterias patógenas son de suma importancia en la industria de alimentos debido a su gran capacidad de proliferar a las condiciones típicas de múltiples procesos para la elaboración de alimentos.

5. Hipótesis.

Debido a que la cepa F de *E. faecalis* es capaz de sobrevivir en las mismas condiciones que *L. monocytogenes* y *S. aureus*, y que además produce una serie de compuestos que poseen una actividad antibacteriana, se espera que el crecimiento de las bacterias patógenas se vea disminuido cuando se encuentran en co-cultivo tanto en un medio rico (BHI), así como en un medio que simule la composición de la cuajada del queso (MLS).

6. Objetivos.

6.1. General.

- Evaluar el efecto antibacteriano de la cepa F de *E. faecalis* frente a *L. monocytogenes* y *S. aureus*, en co-cultivo, en medio BHI y medio lácteo con sal (MLS).

6.2. Particulares.

- Seleccionar los medios y condiciones de cultivo para diferenciar de manera inequívoca a *E. faecalis* F de *L. monocytogenes* y *S. aureus*, cuando se encuentren en co-cultivo.



- Evaluar el efecto antibacteriano de *E. faecalis* F frente a los dos microorganismos patógenos ya mencionados, variando la relación de concentraciones entre ellos, en pruebas de co-cultivo.
- Determinar el peso molecular de las proteínas con actividad antibacteriana producidas por *E. faecalis* F en los medios BHI y MLS.
- Identificación de las proteínas con actividad antibacteriana producidas por *E. faecalis* F en los medios BHI y MLS, utilizando la identificación de las bandas proteínicas separadas por electroforesis en condiciones desnaturizantes.

7. Metodología experimental.

7.1. Diagrama General.

La metodología experimental empleada en el presente trabajo se muestra de manera resumida en la Figura 17.

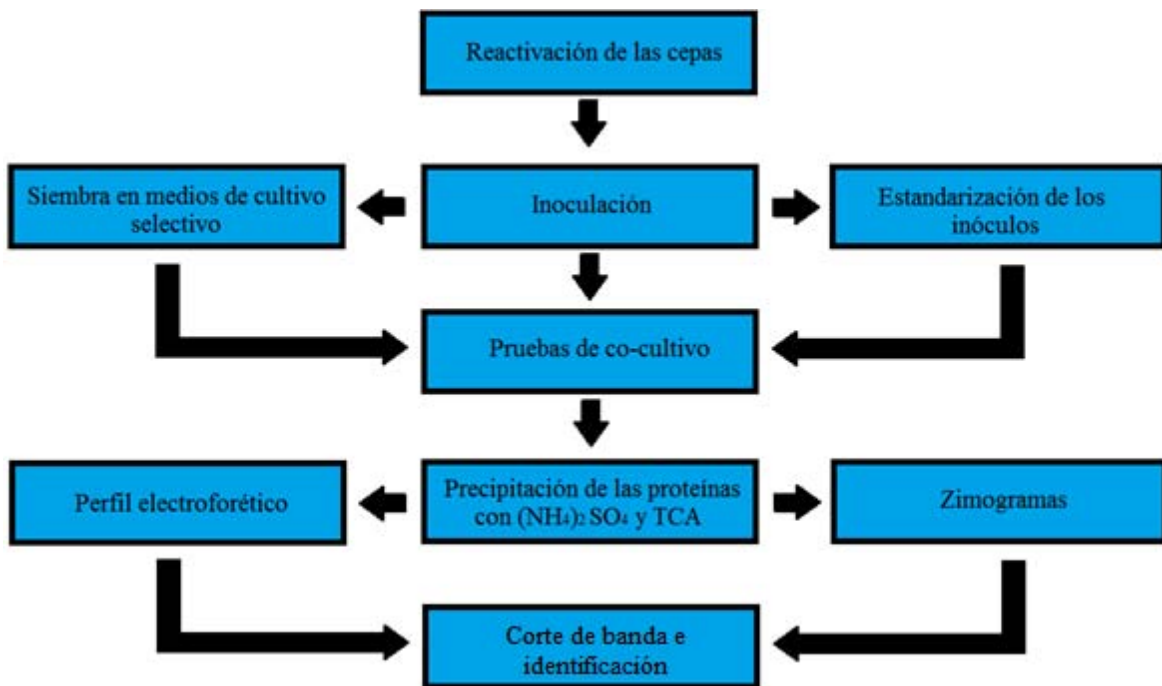


Figura 17. Diagrama general de la metodología experimental.

7.2. Reactivación de las cepas.

Las cepas que se emplearon en este estudio son:

- *Enterococcus faecalis* cepa F aislada del queso Cotija artesanal por el grupo de trabajo.
- *Listeria monocytogenes* CFQ-B-103 proporcionado por el cepario de la Facultad de Química.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6358.

Todas fueron cultivadas en medio Infusión Cerebro Corazón (BHI) (Becton Dickinson ®) a 37 °C y 250 rpm durante 24 h. Cada una de las cepas se almacenó en congelación a -20 °C en caldo BHI con glicerol al 15 % como crioprotector, en viales de plástico con tapa de rosca de 2 mL estériles.

Se reactivaron 50 µL de cada cepa en tubos de ensayo con 5 mL de caldo BHI estériles y se incubaron a 37 °C/24 h a 250 rpm (Innova 40 ®).

7.3. Siembra en medios de cultivo selectivos.

De acuerdo con lo reportado en la literatura, existe una amplia gama de agentes selectivos utilizados comúnmente en diferentes medios de cultivo para el aislamiento de cada microorganismo empleado en el presente proyecto, los cuales se presentan en la Tabla 3.

Lo reportado en la literatura indica que el medio de cultivo Agar Vogel Johnson (Oxoid ®) es útil para diferenciar a *S. aureus* de *E. faecalis* (Muñoz *et al.*, 2007), mientras que el Agar Kanamicina, Esculina y Azida (Oxoid ®) es un medio selectivo para el género *Enterococcus* y el Agar Baird Parker (Becton Dickinson ®) es un medio selectivo para *S. aureus* (Manual de medios de cultivo Oxoid).



Tabla 3. Agentes selectivos utilizados en diferentes medios de cultivo para el aislamiento de *E. faecalis*, *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Díaz et al., 2013: Manual terrestre de la OIE, 2014).

<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Azida de sodio • Cloruro de sodio • Telurito de potasio • Tiocianato de potasio • Etil violeta • Cristal violeta • Kanamicina • Gentamicina • Ácido nalidíxico • Ácido oxolínico • Polimixina B • Colistina 	<ul style="list-style-type: none"> • Cicloheximida • Fosfomicina • Cloruro de litio • Acriflavina • Feniletanol • Polimixina B • Colistina • Ceftazidima • Moxalactam • Ácido nalidíxico • Cefotetan 	<ul style="list-style-type: none"> • Cloruro de sodio • Telurito de potasio • Cloruro de litio • Polimixina B • Azida de sodio • Penicilina

Los medios de cultivo anteriormente mencionados fueron elaborados de acuerdo a las instrucciones del proveedor, se sembraron por agotamiento a cada uno de los microorganismos de interés en cada medio selectivo y se incubaron a 37 °C/24 h (Gravity Convection E-71), con excepción de *S. aureus* en el agar Vogel Johnson, las cuales fueron incubadas a 37 °C/ 48 h debido a que al ser incubadas 24 h, se presentaba un escaso crecimiento. Posteriormente a cada medio de cultivo selectivo se le aumentó la cantidad del agente selectivo (Tabla 4) con el fin de obtener una mayor selectividad.



Tabla 4. Medios de cultivo selectivos empleados y concentraciones a las cuales se encontraba el agente selectivo adicionado.

Agar Oxoid® Vogel Johnson	Adicionado con telurito de potasio al 3.5 %, el medio ya contiene 5 g/L de LiCl y 10 g/L de glicina.
	Adicionado con 5 g/L de LiCl, dando un total de 10 g/L de LiCl.
	Adicionado con 10 g/L de glicina, dando un total de 20 g/L de glicina.
Agar Oxoid® Kanamicina, Esculina y Azida (KAA)	Adicionado con kanamicina a una concentración final de 20 µg/mL.
Agar Becton Dickinson® Baird Parker	Sin adición de ningún agente selectivo (12 g/L de glicina y 5 g/L de LiCl que contiene el medio).

Se adicionó más LiCl debido a que es uno de los agentes selectivos para *L. monocytogenes* y *S. aureus* que contenía el medio Vogel Johnson, este reactivo se encarga de inhibir el crecimiento de la mayoría de los cocos entéricos que también puedan hidrolizar la esculina. Así mismo se adicionó kanamicina en el medio KAA debido a que *Enterococcus faecalis* es resistente a dicho antibiótico, mientras que *L. monocytogenes* y *S. aureus* son susceptibles.

La adición de glicina en el medio Vogel Johnson, inhibe algunas bacterias Gram positivas y negativas, favoreciendo así el crecimiento de *S. aureus*.

El telurito de potasio hace visibles a aquellas bacterias que son capaces de reducir el telurito a teluro, impartándole una tonalidad negra a las colonias.

La finalidad de hacer uso de estos medios de cultivo selectivos es para poder diferenciar a cada bacteria rápidamente cuando se encuentren en una mezcla, para así poder realizar la cuenta en placa de manera adecuada.



En el Anexo I. se muestran tanto la forma de preparación y formulación de cada medio de cultivo empleado, así como las condiciones de esterilización de cada medio de cultivo selectivo.

7.4. Estandarización de los inóculos.

Para llevar a cabo las pruebas de co-cultivo, fue necesario ajustar la cantidad de biomasa inicial de cada una de las bacterias durante cada reto microbiano, para eso se realizaron las cinéticas de crecimiento de cada bacteria a corto tiempo y así obtener la relación de UFC y DO_{600nm} .

Se inoculó 1 mL de cada bacteria en su respectivo matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de caldo BHI estéril, se evaluó la biomasa midiendo la absorbancia a 600 nm con ayuda de un espectrofotómetro (Biomate 3 ®), usando como blanco caldo BHI. Posteriormente se realizaron las diluciones correspondientes como se muestra en la Tabla 5, empleando tubos Eppendorf de 1.5 mL con 900 μ L de solución salina isotónica al 0.85 % y pH ajustado a 7.0. Para cada tiempo de la cinética de crecimiento se inocularon 100 μ L de cada dilución en una caja Petri con Agar BHI por duplicado, con ayuda de una varilla de vidrio en forma de “L” estéril se extendió todo el inóculo en la caja hasta su completa absorción en el agar. Los matraces se incubaron a 37 °C / 2 h a 250 rpm para, posteriormente, volver a repetir todo el procedimiento ya mencionado pero ahora aumentando las diluciones para cada bacteria. Finalmente se dejaron incubando las cajas Petri a 37 °C / 24 h y se realizó la cuenta en placa de todas las cajas, siendo el rango de colonias aceptable de 25-250 para calcular las UFC / mL.

Tabla 5. Diluciones realizadas para cada bacteria en cada punto de la cinética de crecimiento.

Tiempo (h)	<i>E. faecalis</i> F	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
0	10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}	10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}	10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}
2	10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}	10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}	10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}
4	10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}	10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}	10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10}
6	10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}	10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}	10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12}



En la parte de Anexo II se encuentra la Figura A, que representa de manera más clara toda la metodología empleada.

Una vez seleccionados los medios de cultivo selectivos a utilizar en conjunto con las ecuaciones de la rectas para cada cinética, se procedió a realizar las pruebas de co-cultivo.

7.5. Pruebas de co-cultivo.

Se realizaron dos tipos de pruebas de co-cultivo; una realizada en un medio rico (BHI) y otra en un medio que simula la composición de la cuajada del queso (MLS), esto con el fin de observar la actividad antibacteriana de *E. faecalis* F frente a *L. monocytogenes* y *S. aureus* en dos medios composicionalmente distintos. El método de elaboración del medio MLS se encuentra en el Anexo I.

Se tomaron 50 µL de cada uno de los preinóculos y se inocularon en matraces respectivos con 50 mL de caldo BHI, los cuales se incubaron a 37 °C / 2 h a 250 rpm. Una vez transcurrido el tiempo, se midió la densidad óptica a 600 nm, y haciendo uso de las ecuaciones de las curvas de cinética de crecimiento para cada microorganismo elaboradas anteriormente, se realizó el cálculo para ajustar la biomasa inicial tanto a 1×10^6 UFC/mL como a 1×10^4 UFC/mL como lo indica la Tabla 6.

Se decidió esa cantidad inicial de biomasa debido a que *E. faecalis* se ha encontrado presente en las cuajadas de múltiples quesos elaborados en la región del Mediterráneo entre 10^4 a 10^6 UFC/mL, mientras que en quesos ya madurados es de 10^5 a 10^7 UFC/mL (Ogier *et al.*, 2008), así como también es debido al límite permisible de *S. aureus* enterotoxigenico, el cual es menor a 10^5 UFC/mL.



Tabla 6. Concentraciones aproximadas de inóculo inicial utilizadas durante cada prueba de co-cultivo en medio BHI y MLS.

	Co-cultivo en caldo BHI		Co-cultivo en MLS	
	<i>E. faecalis</i> F	<i>E. faecalis</i> F	<i>E. faecalis</i> F	<i>E. faecalis</i> F
	VS <i>L. monocytogenes</i>	VS <i>S. aureus</i>	VS <i>L. monocytogenes</i>	VS <i>S. aureus</i>
Concentración de inóculo inicial	1x10 ⁶ : 1x10 ⁶ UFC/mL	1x10 ⁶ : 1x10 ⁶ UFC/mL	1x10 ⁶ : 1x10 ⁶ UFC/mL	1x10 ⁶ : 1x10 ⁶ UFC/mL
	1x10 ⁶ : 1x10 ⁴ UFC/mL	1x10 ⁶ : 1x10 ⁴ UFC/mL	1x10 ⁶ : 1x10 ⁴ UFC/mL	1x10 ⁶ : 1x10 ⁴ UFC/mL
	1x10 ⁴ : 1x10 ⁶ UFC/mL	1x10 ⁴ : 1x10 ⁶ UFC/mL	1x10 ⁴ : 1x10 ⁶ UFC/mL	1x10 ⁴ : 1x10 ⁶ UFC/mL

Se inocularon los ajustes de biomasa inicial para cada bacteria en sus respectivos matraces con 50 mL de caldo BHI o 50 mL de MLS según sea el caso de la prueba de co-cultivo realizada, así como también se inocularon por separado cada una de estas bacterias (blancos), todos los matraces se incubaron a 37 °C / 4 h a 250 rpm. Cada 4 h se midió la densidad óptica a 600 nm, así como también se realizó el método de conteo variable en superficie para calcular las UFC/mL. En el caso de las pruebas de co-cultivo en MLS no se midió densidad óptica debido a que la leche es un producto muy turbio y no permite el paso de la luz tan fácilmente en comparación a un medio de cultivo translúcido.

Para todas las pruebas de co-cultivo se empleó el método de conteo variable en superficie de (Miles y Misra, 1938), en los medios de cultivo selectivos anteriormente probados y aprobados para realizar la cuenta en placa correctamente. Para esto, primero se realizó una serie de diluciones consecutivas para cada prueba de co-cultivo como lo muestran las Tablas de C a N presentadas en la parte de Anexo III. Con ayuda de una micropipeta, se inocularon 20 µL de cada dilución por triplicado y se dejó reposar por un tiempo de 10 a 15 minutos hasta que se logró su completa absorción al medio de cultivo. Finalmente cada caja se incubó a 37 °C / 24 h. Se repitió todo el procedimiento cada 4 h, aumentando el número



de diluciones para cada prueba. Una vez transcurrido el tiempo de incubación de las cajas Petri, se realizó la cuenta en placa, considerando solo aquellas diluciones en las cuales había menos de 30 colonias por gota.

En la parte de Anexo IV, se presenta el ejemplo de cálculo para ajustar las UFC/mL iniciales, así como también un ejemplo de cálculo de UFC/mL para el método de Miles y Misra y la Figura B que explica de manera detallada la metodología empleada.

7.6. Precipitación de proteínas.

Una vez terminadas las pruebas de co-cultivo, se realizó una identificación de posibles proteínas con actividad antibacteriana que llegaran a producirse por *E. faecalis* F en ambos medios de crecimiento que pudieran inhibir el crecimiento de las cepas de referencia.

Partiendo de un inóculo puro de *E. faecalis* F desarrollado en caldo BHI, se tomó 1 mL y se inoculó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL que contenía 100 mL de caldo BHI estéril, se incubó a 37 °C / 12 h a 250 rpm.

Posteriormente, se separaron las células del extracto extracelular, se centrifugó la muestra a 10,000 rpm (12074 x g) durante 15 min a 4 °C (Beckman J2-MC). Se desechó el pellet y el sobrenadante se neutralizó con NaOH al 50 % (p/v), esto con el fin de descartar que el efecto antibacteriano sea debido a la producción de ácidos orgánicos.

La muestra neutralizada se filtró con una membrana con un tamaño de poro de 0.22 µm (Millipore) para eliminar cualquier tipo de impureza o células que tuviera presente la muestra.

A continuación se llevó a cabo la precipitación con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80 %, con agitación y a 4 °C durante 2 h. Se precipitó al 80 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, debido a que por arriba de esta concentración, la cantidad de proteína obtenida era prácticamente la misma.

Se volvió a centrifugar la muestra a 8500 rpm (8724 x g) durante 20 min a 4 °C (Beckman J2-MC). El sobrenadante se desechó y el pellet se resuspendió en 4 mL de buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.0.



La muestra se dializó con una membrana de tamaño de corte de 1 kDa contra agua en agitación durante 18 h a 4 °C. Este paso es importante debido a que la diálisis tiene como fin la eliminación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que pudiera estar aún presente en la muestra, ya que este puede interferir con otras mediciones y métodos de purificación.

Una vez finalizada la diálisis se procedió a precipitar con ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final del 10 % (v/v) a 4 °C durante 1 h. El TCA se utiliza para precipitar proteínas y a su vez remover sales, polisacáridos y muchos detergentes de las proteínas. Se centrifugó la muestra a 14000 rpm (13148 x g) durante 15 min (Centrifugación III), se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de acetona al 90 % (v/v) para volver a ser centrifugado a las mismas condiciones, por lo menos dos veces más, esto con el fin de eliminar los restos del TCA presentes en la muestra. Finalmente la muestra se dejó en campana de extracción para que todo el remanente de acetona se evaporara.

7.7. Electroforesis.

Una vez obtenidas las proteínas del extracto extracelular, se realizó la electroforesis en geles de SDS-Tris-Glicina al 10 % (p/v) para obtener el perfil electroforético y su zimograma para poder observar la actividad lítica de las proteínas contra el microorganismo indicador *Micrococcus lysodeikticus*.

Para ello se tuvo primero que calentar a ebullición la muestra junto con el buffer de carga durante 5 min para poder resuspenderla más fácilmente, además de que el buffer de carga contiene un agente reductor (β - mercaptoetanol), el cual contribuye a la desnaturalización de las proteínas reduciendo sus enlaces disulfuro, rompiendo así la estructura cuaternaria de las proteínas.

Se realizaron geles de SDS-Tris-Glicina al 10 % (p/v) para identificar compuestos de naturaleza proteínica que pudieran tener actividad antimicrobiana. Se empleó la metodología descrita por (Laemmli, 1970) con el equipo Mini Protean 3 System, Electrophoresis Module (Bio-Rad) y se utilizó el marcador de peso molecular bajo (Bio-Rad) con el fin de estimar el peso de las proteínas de la muestra.



Cada gel se cargó con 5 μ L de marcador Low range y 30 μ L de la muestra ya resuspendida en buffer de carga. Las condiciones de electroforesis fueron 80 V durante 20 min a temperatura ambiente y, posteriormente, a 120 V durante 90 min a 4 °C. Las proteínas se tiñeron con PageBlue (Thermo Scientific).

Para la detección de la actividad lítica se emplearon zimogramas (Leclerc y Asselin, 1989) utilizando como sustrato 0.2 % de células del microorganismo indicador *Micrococcus lysodeikticus*, dichos geles se corrieron a las mismas condiciones que los anteriores y, posteriormente, se incubaron a 37 °C a 50 rpm durante 18 h en una solución renaturalizante (buffer de fosfatos 100mM a pH 7.5 y triton al 1% (V/V)), su función es para que las proteínas recobren su actividad. La tinción de éstos se realizó con azul de metileno durante 20 minutos y posteriormente se destiñeron con agua destilada. La actividad se detectó por la presencia de una banda translúcida sobre un fondo opaco de color azul. Se utilizó el mismo marcador de peso molecular y a su vez este gel se comparó con su perfil electroforético utilizando el programa Image Lab del equipo Gel Doc ® (Bio-Rad) para conocer el peso molecular aproximado de la o las bandas que presentan actividad lítica contra los microorganismos indicadores, para así de igual forma poder seleccionar de manera adecuada la o las bandas que posteriormente se mandarían a identificar. En la parte de Anexo V se encuentra la preparación de cada uno de los reactivos utilizados para realizar los geles de electroforesis.

7.8. Identificación de proteínas.

Se seleccionó la banda que presentó la mayor actividad antibacteriana, se cortó y se mandó a identificar a la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos. La proteína a identificar es sometida a una digestión enzimática, obteniéndose los péptidos de la proteína, posteriormente se remueven las sales, se concentran y purifican los péptidos por medio de ZipTip®, para finalmente analizar los péptidos por medio de la cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masas capaces de producir espectros en tándem (LC-MS/MS), identificándose de forma muy segura a la proteína con ayuda de los bancos de datos.



8. Resultados y discusión.

Como primera actividad, se buscó un medio de cultivo en el cual al ser cultivados *S. aureus* o *L. monocytogenes* en co-cultivo frente a *E. faecalis* F, permitiera una rápida diferenciación entre las colonias de una y otra bacteria, para así poder realizar una inequívoca cuenta en placa.
















8.1. Siembra en medios de cultivo selectivos.

Primero se utilizaron los medios de cultivo selectivos mencionados en la Tabla 7, tal cual lo indicaban las instrucciones del fabricante, sin embargo únicamente en el medio Vogel Johnson no se observó una diferenciación entre las 2 bacterias patógenas y *E. faecalis*, por lo cual fue necesario aumentar la cantidad de uno de sus agentes selectivos que el medio de cultivo ya contenía en su formulación, para así aumentar la selectividad del medio de cultivo.

Los resultados observados en cada medio de cultivo selectivo se muestran en la Tabla 7, así como también las Figuras 18 a 22 representan la forma en las que se desarrollaron cada una de las bacterias en cada medio de cultivo.



Tabla 7. Crecimiento de cada bacteria en los medios de cultivo selectivo.

Medios de cultivo	<i>E. faecalis</i> F	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
Agar Vogel Johnson con telurito de potasio al 3.5 % (Formulación original)			
Agar Vogel Johnson adicionado con 10 g/L de glicina (total 20 g/L de glicina)			
Agar Vogel Johnson adicionado con 5 g/L de LiCl (total 10 g/L de LiCl)			
Agar Kanamicina, Esculina y Azida (KAA) con una concentración final de 20 µg/mL de kanamicina			
Agar Baird Parker			

Condiciones de incubación: 37 °C / 24 h a 250 rpm.

 Indica crecimiento microbiano.  Indica no crecimiento microbiano.

Los medios de cultivo selectivos elegidos para realizar la cuenta en placa durante las pruebas de co-cultivo fueron los siguientes:

- **Agar Vogel Johnson adicionado con 5 g/L de LiCl (concentración total de LiCl de 10 g/L).**

Este medio se seleccionó porque *E. faecalis* F se vio inhibido debido a la presencia de una alta cantidad de LiCl, lo que indica que *E. faecalis* F es una bacteria que resiste en menor medida la presencia de esa sal en el medio, con respecto a *S. aureus* o *L. monocytogenes* que si fueron capaces de desarrollarse en dicho medio de cultivo selectivo. Cabe destacar que estas últimas dos bacterias en este medio se diferencian porque *S. aureus* es capaz de fermentar el manitol que contiene el medio, provocando que el medio de cultivo vire de color rojo a amarillo, mientras que *L. monocytogenes* no es capaz de fermentar el manitol,

sin embargo utiliza las peptonas que contiene el medio, produciendo una alcalinidad del mismo y generando un ligero aumento de la tonalidad rojiza (Figura 18).

El LiCl es una sal que además de disminuir la actividad de agua, inhibe el crecimiento bacteriano mediante la interferencia con su metabolismo. El litio es un agente caotrópico que al entrar a la célula bacteriana puede causar la precipitación de proteínas, esto debido a que desorganiza la red tridimensional del agua, influyendo en la organización de sus moléculas a través de sus puentes de hidrogeno, y en la interacción de estas con macromoléculas tales como proteínas, ADN o ARN, tienden a desnaturalizarlas o disolverlas (Stewart *et al.*, 2005).

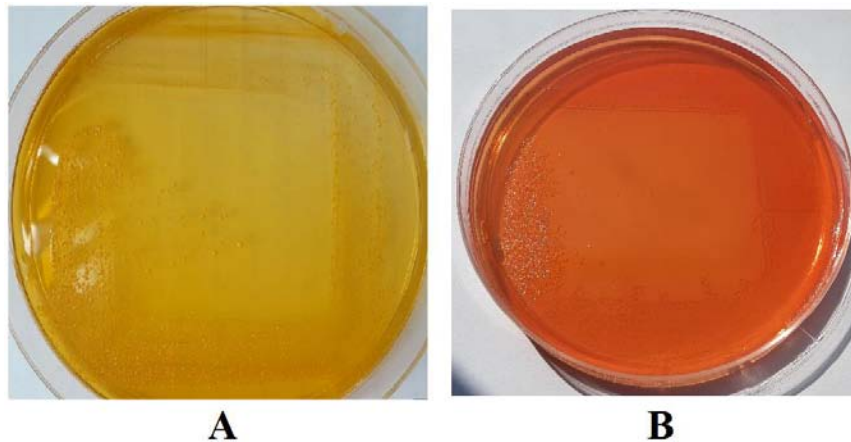


Figura 18. Cultivo de **A:** *S. aureus* y **B:** *L. monocytogenes* por dilución en Agar Vogel Johnson adicionado con 5 g/L de LiCl e incubados a 37 °C / 48 h y 37 °C / 24 h, respectivamente.

➤ **Agar Kanamicina, Esculina y Azida (KAA) a una concentración final de kanamicina de 20 µg/mL.**

En este medio de cultivo selectivo, sólo *E. faecalis* F fue capaz de desarrollarse debido a su resistencia al antibiótico kanamicina, se observaron colonias de color blanco con un precipitado negro a su alrededor, esto es debido a la hidrólisis de la esculina a esculetina, la cual reacciona con los iones Fe^{3+} presentes en el medio, produciéndose

una sal de hierro insoluble de color negro (Figura 19). Mientras que *S. aureus* y *L. monocytogenes* se ven inhibidas por la presencia de kanamicina y azida de sodio.

La kanamicina es un antibiótico perteneciente al grupo de los aminoglucósidos, de amplio espectro, bactericida, que afecta la síntesis de proteínas debido a que es capaz de atravesar la membrana, para posteriormente unirse a la subunidad 30 S ribosomal, donde inhibe la síntesis proteica (sintetiza proteínas con errores que no son útiles) y origina la muerte (Aliño *et al.*, 2007).

Muchas bacterias aerobias y anaerobias facultativas obtienen energía mediante el metabolismo respiratorio característico de las enzimas llamadas citocromos. La azida de sodio actúa inhibiendo la transferencia de hidrógeno a través del sistema citocromo, bloquea el hierro de la molécula de citocromo en el estado férrico (Fe^{3+}), e impide así la transferencia final del electrón de oxígeno molecular (Díaz *et al.*, 2012).

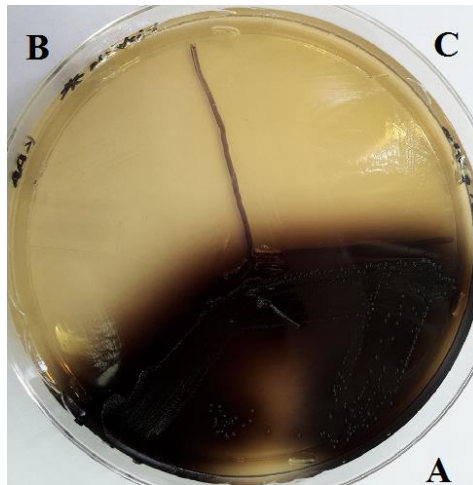


Figura 19. Cultivo de A: *E. faecalis* F, B: *L. monocytogenes* y C: *S. aureus* en Agar KAA con una concentración final de 20 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina, incubado a 37°C/ 24h.

El resto de los medios de cultivo (Figura 20-22) no serán útiles para el fin de la experimentación, debido a que no se puede diferenciar rápidamente una bacteria de otra cuando se encuentren mezcladas, interfiriendo así en la cuenta de cada bacteria en una misma placa.

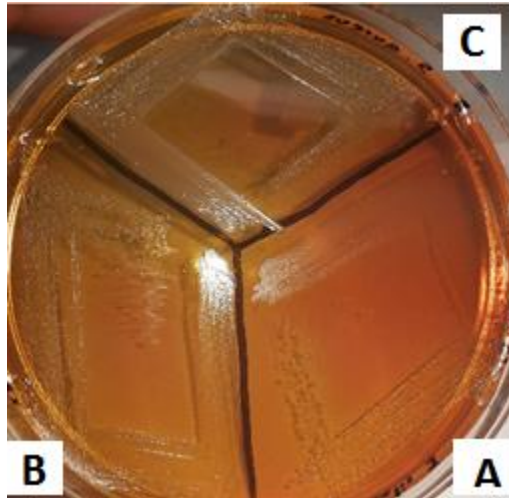


Figura 20. Cultivo de A: *E. faecalis* F, B: *L. monocytogenes* y C: *S. aureus* en Agar Vogel Johnson adicionado con 5 g/L de glicina (total 15 g/L de glicina).

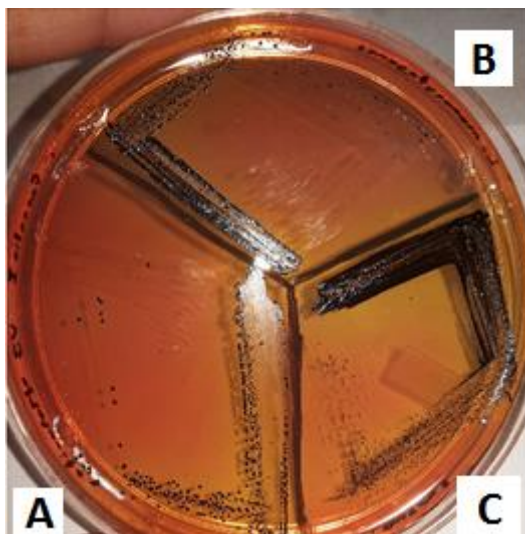


Figura 21. Cultivo de A: *E. faecalis* F, B: *L. monocytogenes* y C: *S. aureus* en medio Agar Vogel Johnson con telurito de potasio al 3.5 % (total 15 g/L de glicina).

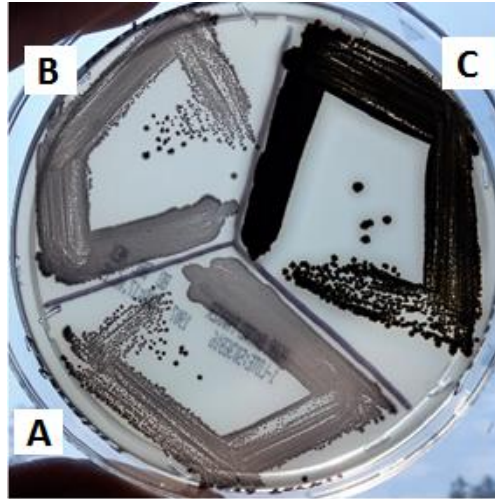


Figura 22. Cultivo de A: *E. faecalis* F, B: *L. monocytogenes*, C: *S. aureus* en medio Agar Baird Parker.

8.2. Estandarización de los inóculos.

Una vez seleccionados los dos medios selectivos a usar durante las pruebas de co-cultivo, se procedió a realizar la estandarización de los inóculos de cada bacteria, para lo cual fue necesario elaborar las cinéticas de crecimiento en un periodo de 6 h (Figuras 23-25), para así obtener su ecuación de la curva y poder realizar la relación de densidad óptica y UFC/mL.

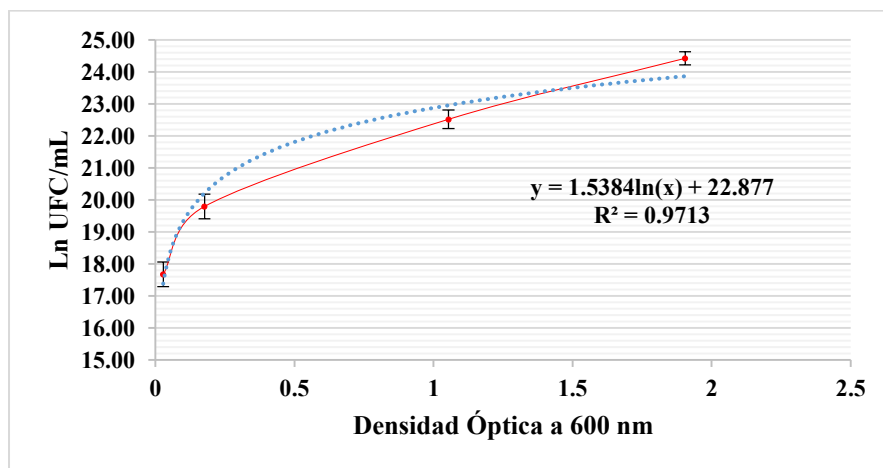


Figura 23. Correlación de D.O a 600 nm con Ln UFC / mL de *E. faecalis* F en medio BHI incubado a 37 °C a 250 rpm por un periodo de 6 h. Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos dos réplicas.

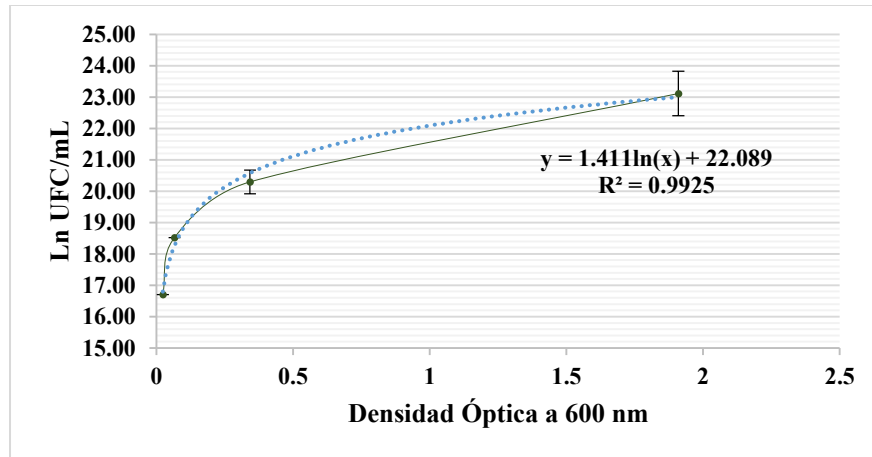


Figura 24 Correlación de D.O a 600 nm con Ln UFC / mL de *L. monocytogenes* en medio BHI incubado a 37 °C a 250 rpm por un periodo de 6 h. Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos dos réplicas.

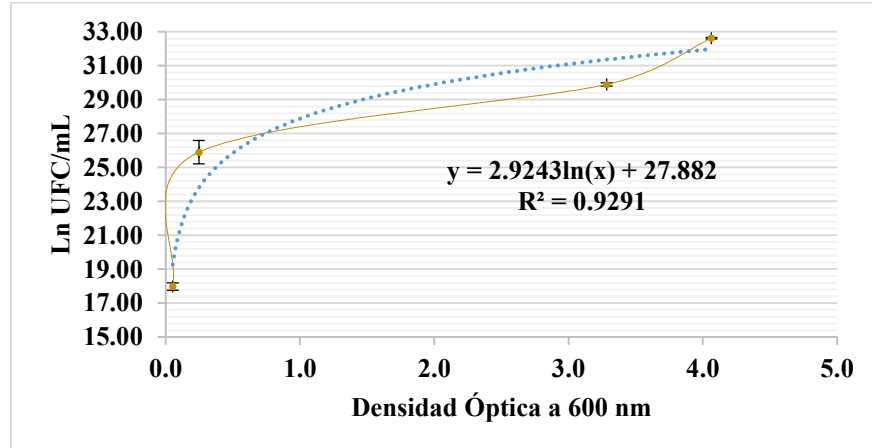


Figura 25. Correlación de D.O a 600 nm con Ln UFC / mL de *S. aureus* en medio BHI incubado a 37 °C a 250 rpm por un periodo de 6 h. Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos dos réplicas.

De los gráficos anteriores, se hizo uso de las regresiones de cada una de ellas para poder estandarizar la concentración inicial de cada bacteria durante cada prueba de co-cultivo a realizar. Para ello es necesario conocer la concentración inicial de la cual se quiere partir y



el volumen del medio de cultivo en el cual se va a llevar a cabo la prueba de co-cultivo. En la parte de Anexo se muestra un ejemplo de cálculo para obtener el volumen a inocular de cada bacteria durante una prueba de co-cultivo.

8.3. Pruebas de co-cultivo.

Para determinar la actividad antibacteriana de la cepa F de *E. faecalis*, fue necesario inocularla en conjunto con *L. monocytogenes* o *S. aureus* (co-cultivo) tanto en medio BHI como MLS. A su vez se varió la concentración inicial de cada bacteria en 1:1, 100:1 y 1:100 durante cada reto, así como también se midió el pH del medio con el fin de verificar si la inhibición pudiera ser debida a la producción de ácido por parte de la BAL.

8.3.1. Pruebas de co-cultivo entre *E. faecalis* F y *L. monocytogenes* en una relación 1:1 tanto en medio de cultivo BHI como MLS.

Se inoculó a *E. faecalis* y *L. monocytogenes*, ambas a una concentración inicial de 1×10^6 UFC/mL tanto en medio BHI, como en medio MLS (Figura 26), para así observar la actividad antibacteriana que posee la BAL cuando ambas bacterias se encuentran a la misma concentración, y compararla con respecto a su misma actividad pero a diferentes concentraciones iniciales. De igual forma se muestra la variación del pH del medio de co-cultivo con respecto al tiempo producida por el desarrollo de únicamente *E. faecalis*, esto con la finalidad de observar si el descenso del pH es capaz de inhibir a la bacteria patógena.



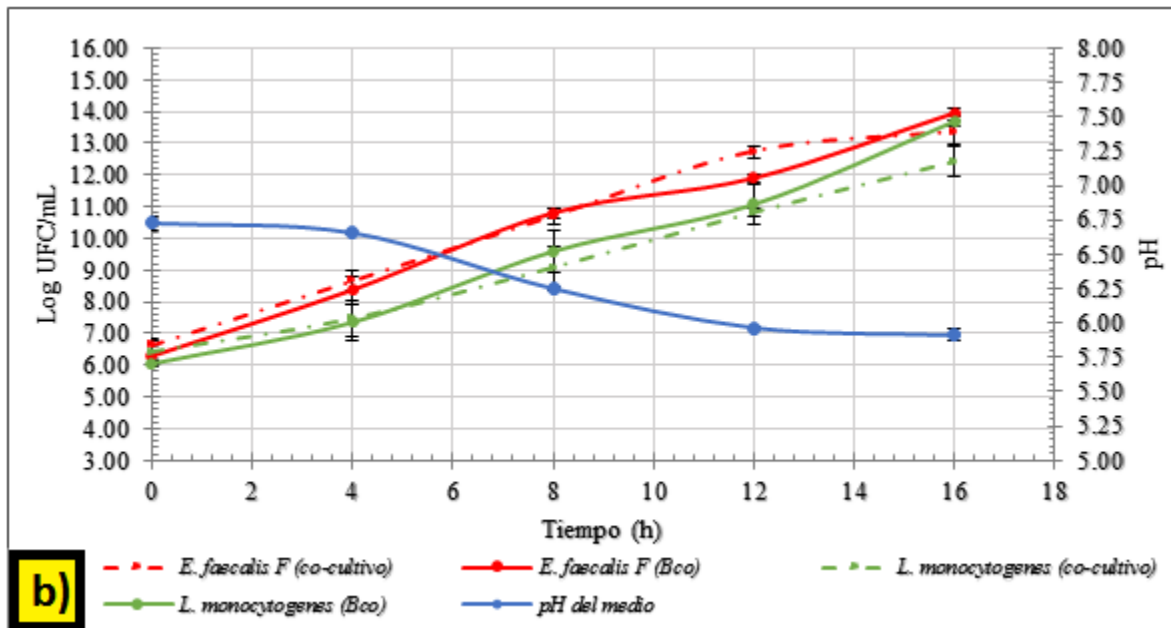
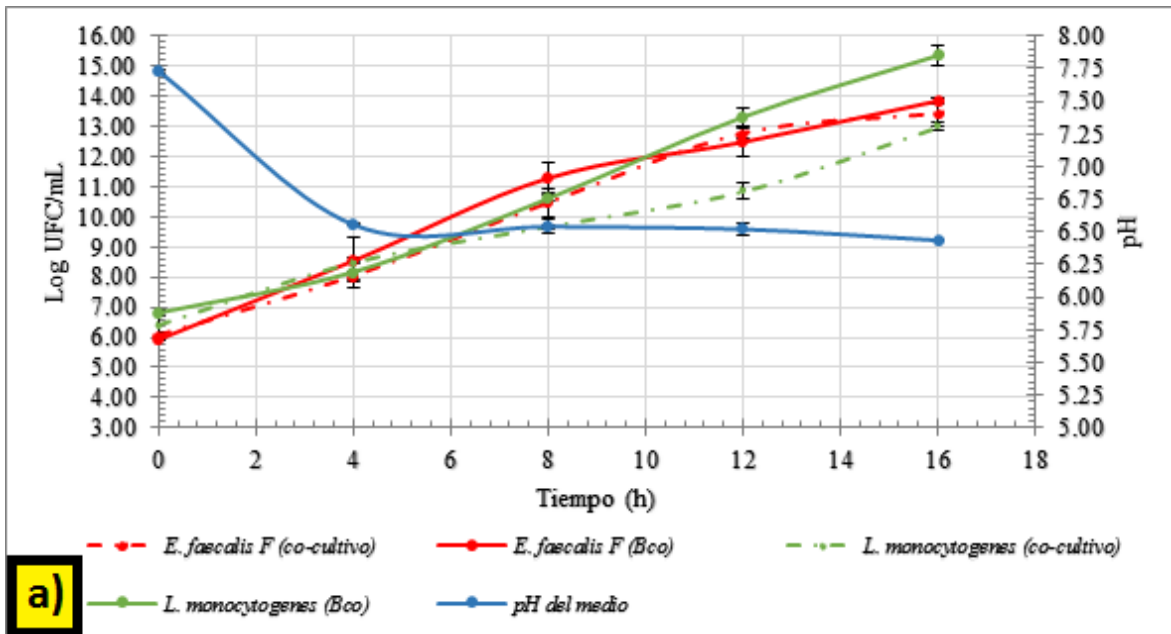


Figura 26. Prueba de co-cultivo en medio **a)** BHI y **b)** MLS entre *E. faecalis F* y *L. monocytogenes*, cuando ambas bacterias se encuentran a una concentración inicial aproximada de 10^6 UFC/mL. Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos dos réplicas.



En este caso en el cual la BAL y el patógeno se encuentran a una concentración inicial a una relación 1:1, se observó que, en ambos medios de cultivo, existe una disminución de la cuenta del patógeno; sin embargo, es más evidente esa disminución en el medio BHI que en el MLS, la cual es de cerca de dos y un ciclo logarítmico, respectivamente. Esta diferencia en la actividad podría ser debida a la cantidad de NaCl que contiene cada uno de los medios y a su respectiva actividad bacteriostática sobre *L. monocytogenes*, así como también sobre el desarrollo de *E. faecalis* y su producción de compuestos con actividad antibacteriana. Por un lado, en el medio BHI el NaCl se encuentra al 0.25 % mientras que en el MLS se encuentra cerca del 5 %. La literatura reporta que *E. faecalis* es capaz de proliferar en presencia de NaCl al 6.5 % (Murray, 2013) y *L. monocytogenes* a una concentración de NaCl al 10 % (Jay *et al.*, 2006), por lo que ambos fueron capaces de desarrollarse en ambos medios sin dificultad alguna.

En la Tabla 8 se observa que tanto el medio BHI como del MLS, son muy distintos composicionalmente, por lo que de igual forma esto pudo haber afectado al desarrollo de ambas bacterias y en el caso de *E. faecalis* a su producción de compuestos con actividad antibacteriana.

Tabla 8. Comparación composicional entre el medio BHI y MLS.

	Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI)	Medio lácteo con sal (MLS)
Fuente de carbono	Glucosa	Lactosa Ácidos grasos (triacilgliceridos)
Fuente de nitrógeno	Peptona Infusión cerebro de ternera Infusión corazón de buey	Caseínas (α , β y γ) Proteínas del suero (β -lactoalbúmina y β -lactoglobulina)
Vitaminas	---	Vit. A, D, E, K, B1, B2, B6, B12 y C
Minerales	---	Potasio, Calcio, Cloro, Fosforo, Sodio, Azufre, Magnesio



Por otro lado, se observó que el desarrollo del patógeno es un poco más lento en medio MLS comparado con el del medio BHI. Cabe mencionar que esto no se observó para *E. faecalis*; esto puede ser debido a la fuente de carbono que posee un medio con respecto al otro, en el caso del medio BHI se tiene como fuente de carbono a la glucosa, la cual es un monosacárido que es fácilmente utilizado por las bacterias. Por otra parte, en el medio MLS la fuente de carbono es la lactosa, el cual es un disacárido que debe ser hidrolizado enzimáticamente por la bacteria a glucosa y galactosa para ser utilizado para su propio desarrollo.

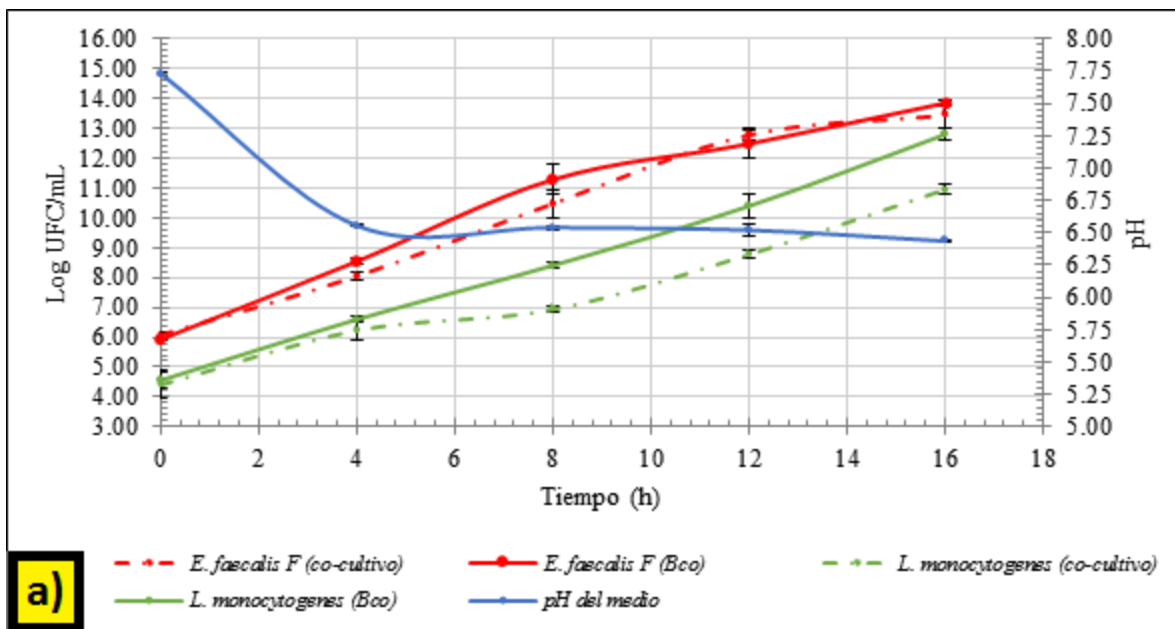
No obstante, cabe mencionar que la concentración y la disponibilidad de los nutrientes en el medio MLS es menor comparada con el BHI, puesto que la leche es un sistema complejo donde el 79 % es agua y el resto son nutrientes (10 % proteínas, 7 % grasa, 3 % lactosa y 1 % cenizas), los cuales se encuentran en suspensión (como es el caso de las micelas de caseína), en emulsión (como es el caso de las grasas y las vitaminas solubles en grasa) y en solución (como es el caso de la lactosa, algunas proteínas séricas y minerales) (Badui, 2014), los cuales no son fácilmente aprovechables para las bacterias como lo es en el caso del medio BHI, donde además de que todos los nutrientes se encuentran en una mayor concentración, se encuentran simplemente disueltos en agua sin formar ningún tipo de arreglo estructural estable.

Finalmente, con respecto a los valores de pH registrados durante el co-cultivo, en ningún caso el pH disminuyó hasta 5.0, con lo cual se descarta que la disminución de la cuenta bacteriana sea debida a la acidificación del medio de cultivo, esto debido a que en la literatura se tiene reportado que *L. monocytogenes* es capaz de proliferar en un rango de pH de 4.1 a 9.6 (Jay *et al.*, 2006), por lo tanto la actividad antibacteriana observada puede ser debida a otro tipo de metabolito producido por *E. faecalis* F o de igual forma, por competencia microbiana por los sustratos del medio de cultivo.



8.3.2. Pruebas de co-cultivo entre *E. faecalis* F y *L. monocytogenes* en una relación 100:1 tanto en medio de cultivo BHI como MLS.

Para este caso, *E. faecalis* y *L. monocytogenes* se inocularon a una concentración inicial de 1×10^6 y 1×10^4 UFC/mL respectivamente tanto en medio BHI, como en medio MLS (Figura 27), para así determinar si la actividad antibacteriana se ve influenciada por la concentración de la BAL. De igual forma se muestra la variación del pH del medio de co-cultivo con respecto al tiempo producida por el desarrollo de únicamente *E. faecalis*, esto con la finalidad de observar si el descenso del pH es capaz de inhibir a la bacteria patógena.



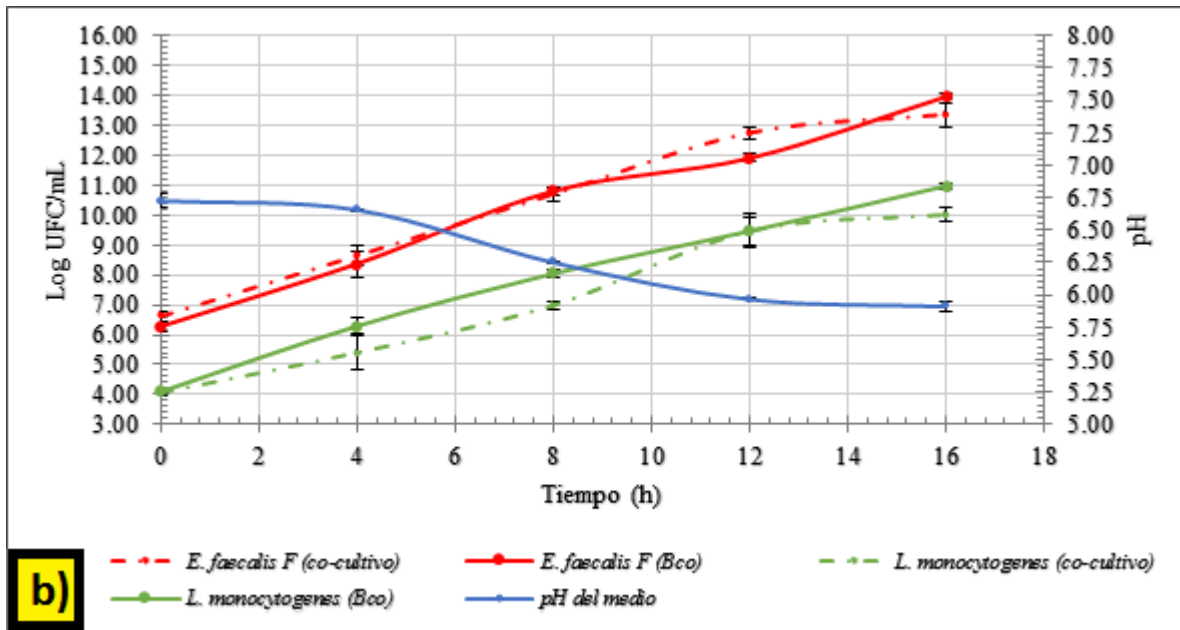
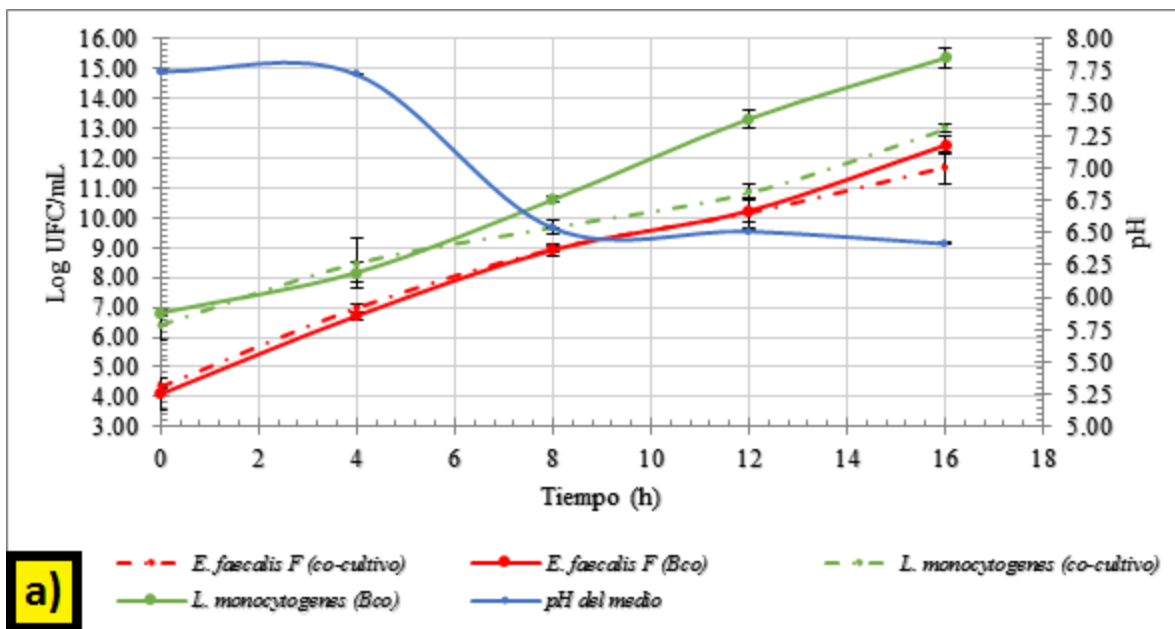


Figura 27. Prueba de co-cultivo en medio a) BHI y b) MLS entre *E. faecalis F* y *L. monocytogenes*, cuando se encuentran a una concentración inicial aproximada de 10^6 y 10^4 UFC/mL respectivamente. Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos dos réplicas.

Durante esta prueba de co-cultivo en la cual la BAL se encuentra a una concentración 100 veces mayor que la bacteria patógena, se observa que la actividad antibacteriana se presenta en un periodo menor que en la prueba de co-cultivo donde ambas bacterias se encuentran en una relación 1:1, posiblemente es debido a que la BAL se encuentra en mayor concentración y por lo tanto el aprovechamiento de los nutrientes del medio de cultivo es mucho mayor, al igual que la producción de metabolitos con actividad antibacteriana. De igual forma que en la anterior prueba de co-cultivo, se apreció una mayor disminución de la cuenta bacteriana de *L. monocytogenes* en el medio BHI comparada con el MLS, la cual fue de aproximadamente dos y un ciclo logarítmico, respectivamente.

8.3.3. Pruebas de co-cultivo entre *E. faecalis* F y *L. monocytogenes* en una relación 1:100 tanto en medio de cultivo BHI como MLS.

En la Figura 28 se presenta el co-cultivo entre *E. faecalis* y *L. monocytogenes* a una concentración inicial de 1×10^4 y 1×10^6 UFC/mL respectivamente tanto en medio BHI, como en medio MLS, al igual que los casos anteriores, se muestra la variación del pH del medio de co-cultivo con respecto al tiempo producida por el desarrollo de únicamente *E. faecalis*, esto con la finalidad de observar si el descenso del pH es capaz de inhibir a la bacteria patógena.



a)



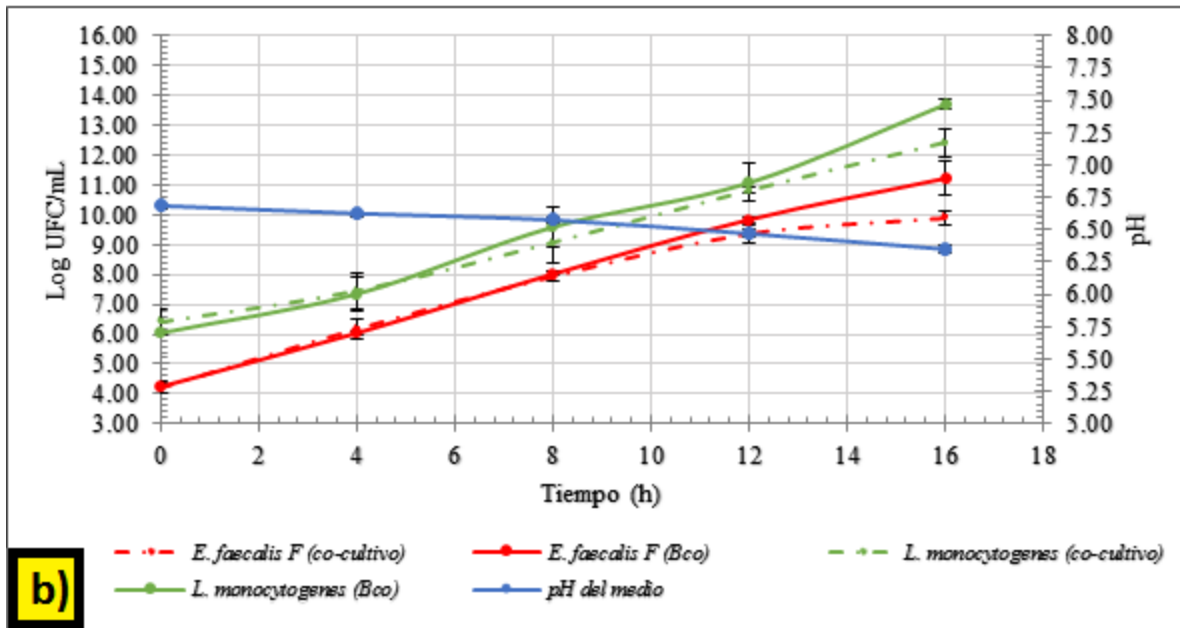


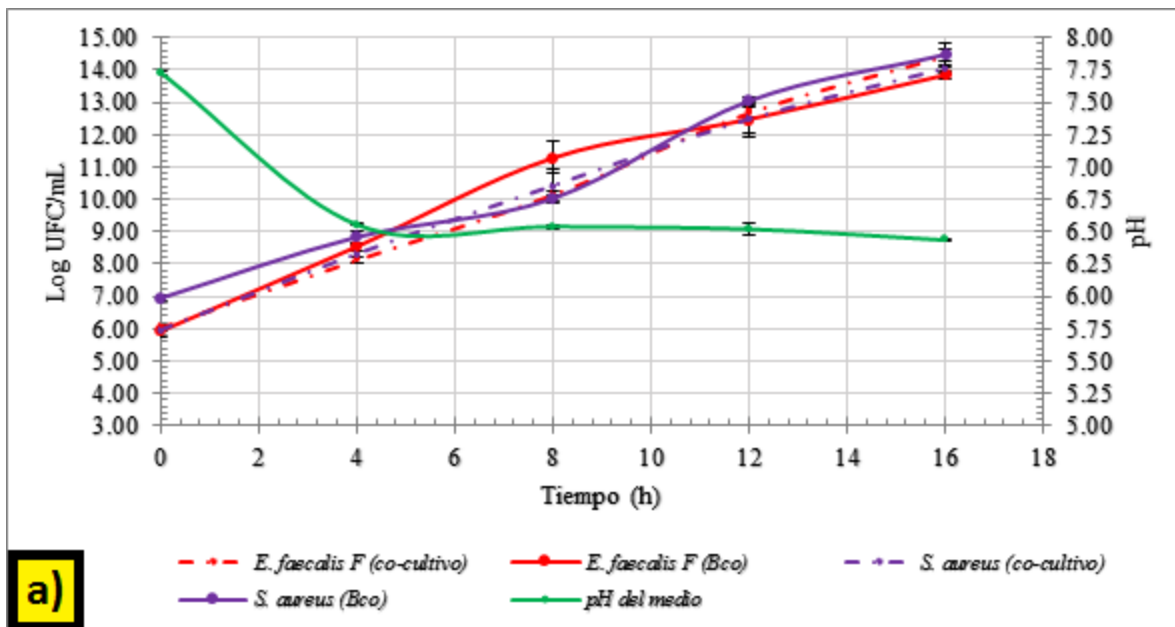
Figura 28. Prueba de co-cultivo en medio a) BHI y b) MLS entre *E. faecalis F* y *L. monocytogenes*, cuando se encuentran a una concentración inicial aproximada de 10^4 y 10^6 UFC/mL respectivamente. Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos dos réplicas.

Finalmente, para el co-cultivo en el cual la bacteria patógena se encuentra a una concentración 100 veces mayor que la BAL, se observó lo mismo que en los casos anteriores: una mayor disminución de la cuenta del patógenos en medio BHI, la cual fue aproximadamente de dos ciclos logarítmicos, comparada con la del medio MLS que fue cerca de un ciclo logarítmico. Cabe destacar que la BAL a pesar de que se encuentra en una menor concentración, sigue presentando la misma actividad comparada cuando esta misma se encuentra en igual concentración con la patógena.

Con respecto al pH, los valores registrados durante todo el co-cultivo, al igual que en los casos anteriores, no disminuyó a valores por debajo de 5.0, con lo cual se descarta que la disminución de la cuenta bacteriana es debida a la acidificación del medio de cultivo.

8.3.4. Pruebas de co-cultivo entre *E. faecalis* F y *S. aureus* en una relación 1:1 tanto en medio de cultivo BHI como MLS.

Se inoculó a *E. faecalis* y *S. aureus* a una concentración inicial de 1×10^6 UFC/mL tanto en medio BHI, como en medio MLS (Figura 29), para así observar la actividad antibacteriana que posee la BAL cuando ambas bacterias se encuentran a la misma concentración, y compararla con respecto a su misma actividad pero a diferentes concentraciones iniciales. De igual forma se muestra la variación del pH del medio de co-cultivo con respecto al tiempo producida por el desarrollo de únicamente *E. faecalis*, esto con la finalidad de observar si el descenso del pH es capaz de inhibir a la bacteria patógena.



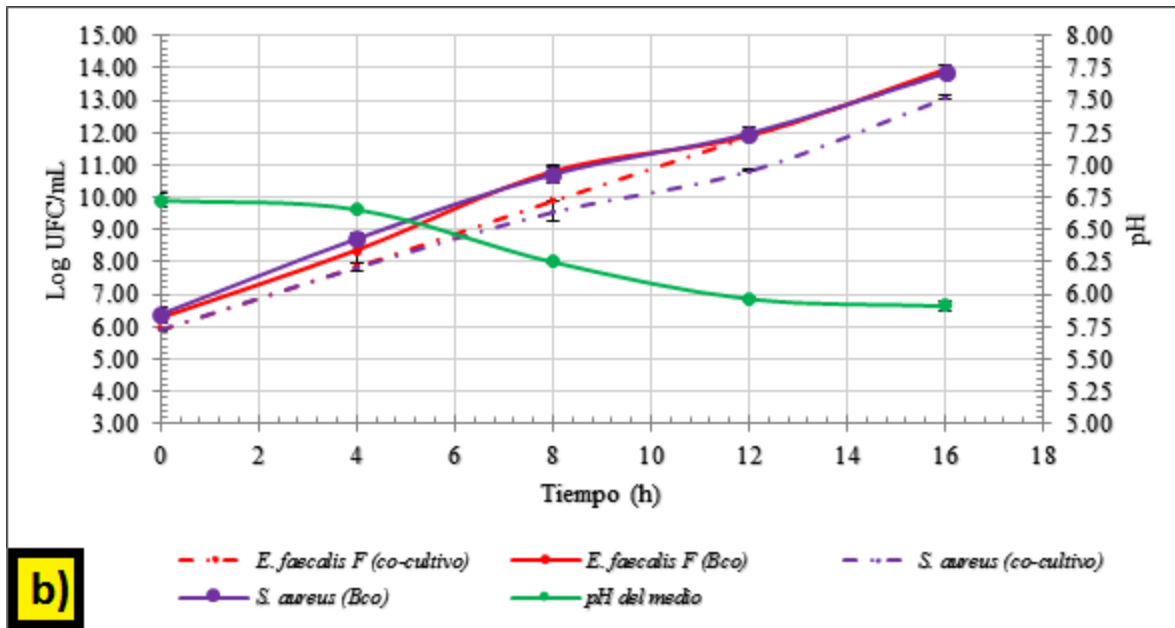


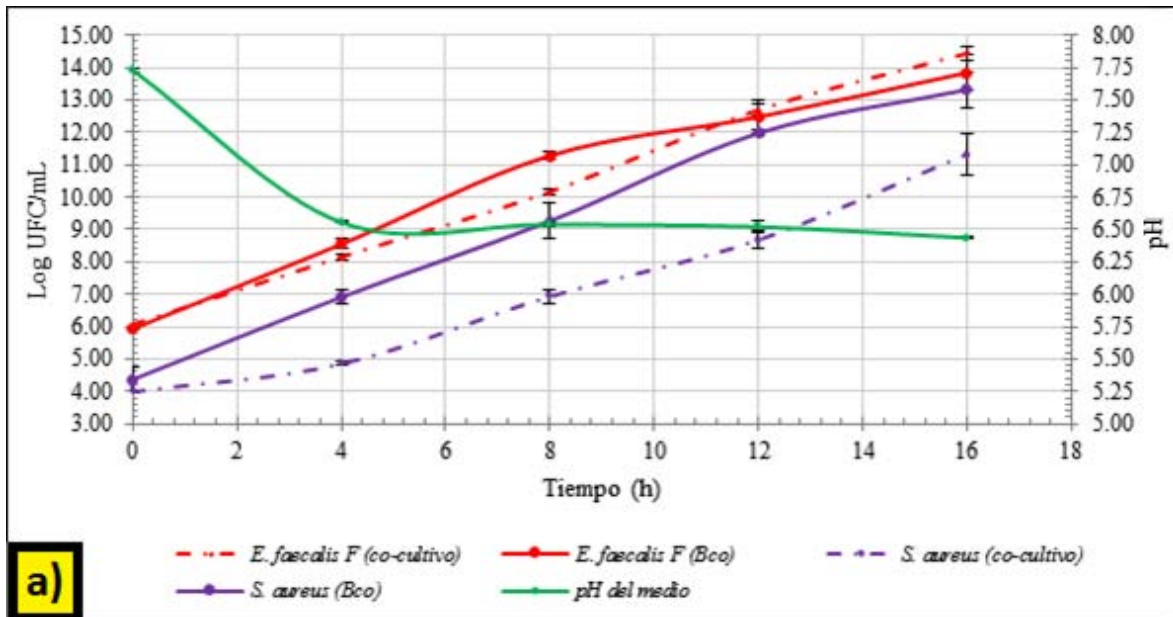
Figura 29. Prueba de co-cultivo en medio a) BHI y b) MLS entre *E. faecalis* F y *S. aureus*, cuando ambas bacterias se encuentran a una concentración inicial aproximada de 10^6 UFC/mL. Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos dos réplicas.

Durante esta prueba de co-cultivo en la cual la BAL y el patógeno se encuentran a la misma concentración; se presentó una mayor disminución de la cuenta del patógeno en el medio MLS, la cual fue de cerca de un ciclo logarítmico, mientras que en el medio BHI fue inferior a un ciclo logarítmico. Esto como ya se mencionó anteriormente, puede ser debido a que en el medio MLS los nutrientes no son fácilmente aprovechados por las bacterias, en específico por *S. aureus*, por lo que su crecimiento se ve más lento y esto en conjunto con la actividad antibacteriana de *E. faecalis*, hace que la cuenta del patógeno sea poco más disminuida.

Con respecto a la variación del pH del medio de cultivo durante toda la prueba de co-cultivo, se observa que el pH no disminuye lo suficiente como para afectar el desarrollo de *S. aureus*, el cual prolifera en un rango de pH de 4.0 a 9.6 (Murray, 2013), por lo cual se descarta que la disminución de la cuenta del patógeno sea debida por la acidificación del medio de cultivo.

8.3.5. Pruebas de co-cultivo entre *E. faecalis* F y *S. aureus* en una relación 100:1 tanto en medio de cultivo BHI como MLS.

Para este caso, *E. faecalis* y *S. aureus* se inocularon a una concentración inicial de 1×10^6 y 1×10^4 UFC/mL respectivamente tanto en medio BHI, como en medio MLS (Figura 30), para así determinar si la actividad antibacteriana se ve influenciada por la concentración de la BAL. De igual forma se muestra la variación del pH del medio de co-cultivo con respecto al tiempo producida por el desarrollo de únicamente *E. faecalis*, esto con la finalidad de observar si el descenso del pH es capaz de inhibir a la bacteria patógena.



a)



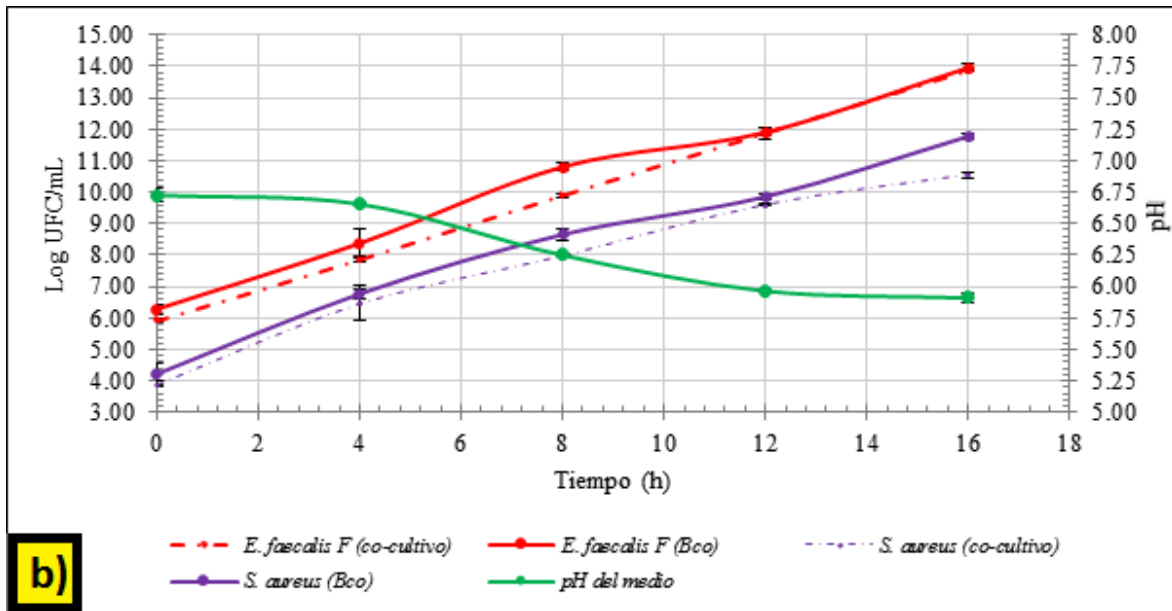
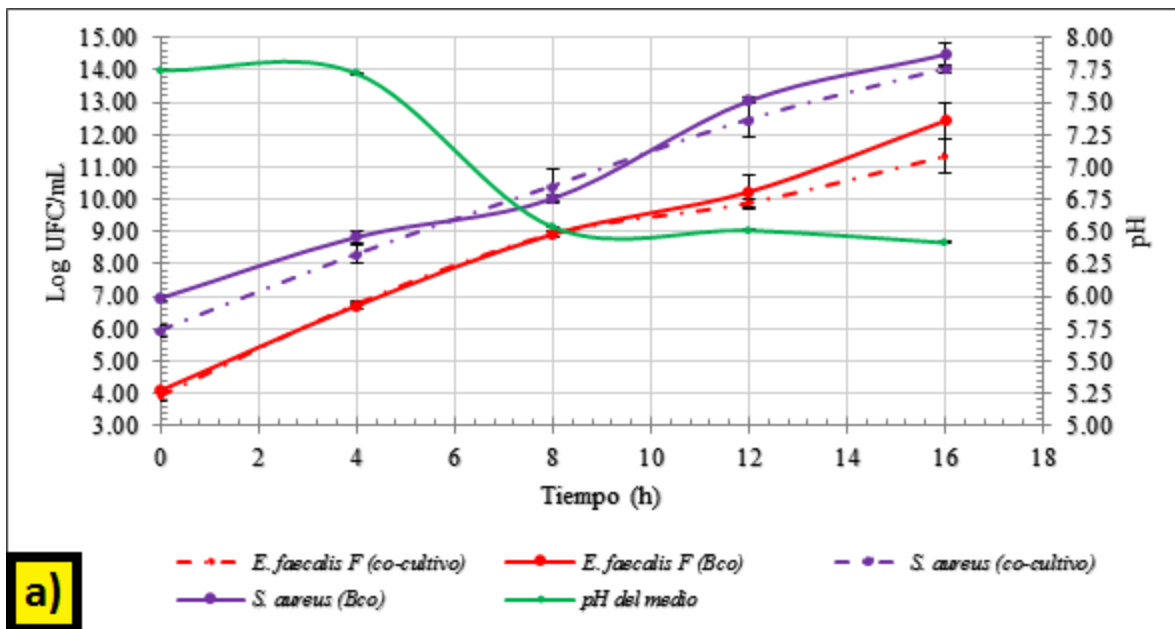


Figura 30. Prueba de co-cultivo en medio a) BHI y b) MLS entre *E. faecalis F* y *S. aureus*, cuando se encuentran a una concentración inicial aproximada de 10^6 y 10^4 UFC/mL respectivamente. Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos dos réplicas.

Para esta prueba de co-cultivo donde la BAL se encuentra a una concentración 100 veces mayor que la patógena, se observó que la actividad antibacteriana fue mucho mayor en medio BHI y a su vez fue mayor que en el caso del co-cultivo anterior donde ambas bacterias se encontraban en una relación 1:1, esto posiblemente sea debido a que la concentración inicial de la BAL era mucho mayor que la bacteria patógena, por lo tanto el aprovechamiento de los nutrientes del medio de cultivo sería mucho mayor e igualmente sería mayor la producción de metabolitos antimicrobianos. Para el caso del medio BHI, la cuenta del patógeno disminuyó cerca de dos ciclos logarítmicos, mientras que en el medio MLS, la cuenta del patógeno disminuyó cerca de un ciclo logarítmico. De igual forma el pH no parece ser el responsable de la disminución de la cuenta de *S. aureus*.

8.3.6. Pruebas de co-cultivo entre *E. faecalis* F y *S. aureus* en una relación 1:100 tanto en medio de cultivo BHI como MLS.

En la Figura 31 se presenta el co-cultivo entre *E. faecalis* y *S. aureus* a una concentración inicial de 1×10^4 y 1×10^6 UFC/mL respectivamente tanto en medio BHI, como en medio MLS, al igual que los casos anteriores, se muestra la variación del pH del medio de co-cultivo con respecto al tiempo producida por el desarrollo de únicamente *E. faecalis*, esto con la finalidad de observar si el descenso del pH es capaz de inhibir a la bacteria patógena.



a)



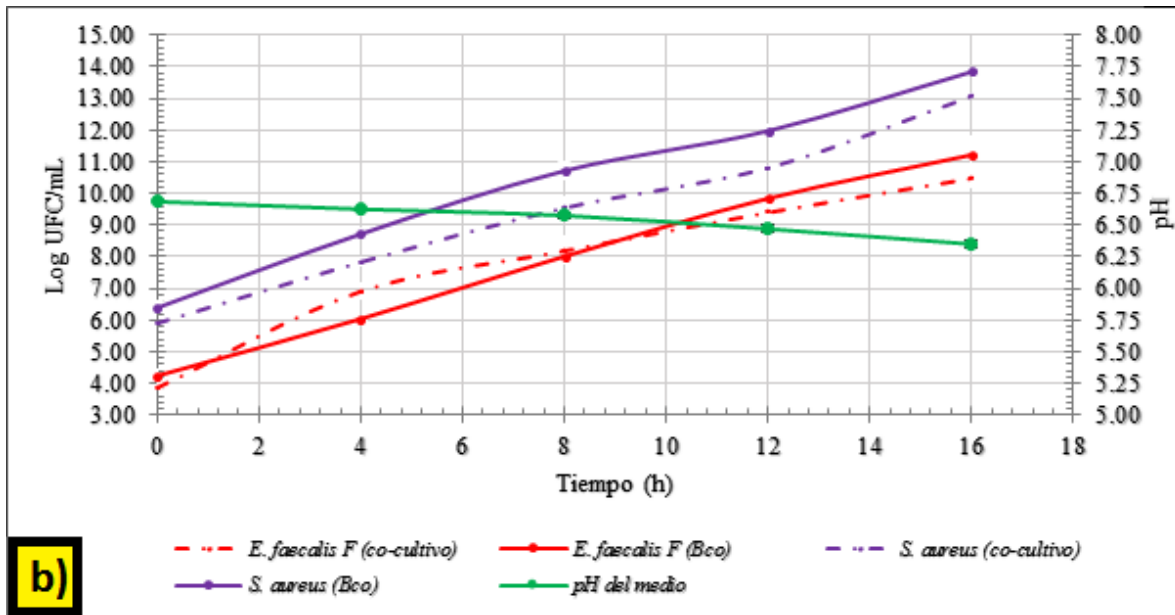


Figura 31. Prueba de co-cultivo en medio a) BHI y b) MLS entre *E. faecalis F* y *L. monocytogenes*, cuando se encuentran a una concentración inicial aproximada de 10^4 y 10^6 UFC/mL respectivamente. Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos dos réplicas.

Por último se tiene el co-cultivo en el que la bacteria patógena se encuentra a una concentración inicial 100 veces mayor que la BAL, se presentó una mayor disminución en la cuenta del patógeno en el medio MLS, lo cual posiblemente sea debido de igual forma a la composición de los medios de cultivo y a la afinidad de cada bacteria por el medio. Se observó que la disminución de la cuenta del patógeno en medio MLS fue de aproximadamente un ciclo logarítmico, mientras que en el medio BHI fue por debajo de un ciclo logarítmico. De igual forma se observó que el pH no logró disminuir a valores por debajo de 5.0, por lo cual de igual forma que en los anteriores casos, se descarta que la actividad antibacteriana observada sea debido al aumento de la acidez durante todo el co-cultivo.

En resumen, durante las pruebas de co-cultivo se observó lo siguiente:

- Se presentó la mayor actividad antibacteriana cuando *E. faecalis* F se encontraba a una concentración inicial 100 veces mayor que ambas bacterias patógenas.
- En el caso del co-cultivo con *L. monocytogenes*, se observó una mayor disminución de la cuenta del patógeno en el co-cultivo con medio BHI, mientras que en el co-cultivo con *S. aureus*, la mayor disminución de la cuenta del patógeno fue en el medio MLS.
- La composición de los medios de cultivo afecta el desarrollo de las bacterias, por un lado el medio BHI contiene una mayor concentración y disponibilidad los nutrientes para ser utilizados por las bacterias, además de que la concentración que posee de NaCl es muy baja, afectando en lo mínimo al desarrollo bacteriano, mientras que en el caso del medio MLS, la leche al ser un sistema muy complejo, sus nutrientes no se encuentran tan disponibles como en el caso del medio BHI, además de que están en una menor concentración, eso sin mencionar su alta concentración de NaCl que en primera instancia no inhibe el desarrollo bacteriano, pero si lo pudiera haber afectado. Todo esto en conjunto pudiera haber afectado la manera en la que se desarrolla *E. faecalis* y a su respectiva síntesis de uno u otro metabolito que pudiera haber sido el responsable de la disminución de la cuenta de ambas bacterias patógenas, o simplemente pueda ser debido a la competencia microbiana por los sustratos del medio de cultivo.
- El pH del medio de cultivo no disminuyó hasta niveles en los cuales las bacterias patógenas se vieran afectadas, por lo cual se descartó que la actividad antimicrobiana presentada sea debida a la producción de ácidos orgánicos por parte de la BAL.

En cuanto al posible uso biotecnológico de la cepa F de *E. faecalis*, se sabe que es una bacteria muy adaptable tanto a la temperatura, pH, concentración de sal y a los sustratos. En consecuencia este microorganismo puede encontrarse en alimentos elaborados con materia prima cruda (leche o carne) o tratada térmicamente (Vallejo *et al.*, 2013), siendo así parte importante de la microbiota del alimento fermentado.



Por medio de las pruebas de co-cultivo se observó que la cepa F de *E. faecalis* posee un efecto bacteriostático sobre ambos patógenos en un periodo de 16 h, lo cual posiblemente a largo plazo, por ejemplo un mes, se llegue a ver mucho más afectado su desarrollo, como pudiera serlo en el queso Cotija, un alimento que es madurado por un tiempo mínimo de tres meses. Por lo cual tiene potencial de ser empleado como un cultivo iniciador en la elaboración de alimentos fermentados.

En años recientes, los informes sobre el uso de los enterococos como cultivos iniciadores han aumentado considerablemente. Su utilización en la elaboración de alimentos es fuertemente debatido desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, debido a que se han identificado algunas cepas de enterococos como patógenos nosocomiales, que causan bacteriemia (Murray, 2013), particularmente de las especies *faecium* y *faecalis*. Varios estudios realizados en este laboratorio, sobre estas dos principales especies bacterianas aisladas de alimentos, han demostrado que poseen genes que codifican para factores de virulencia (sustancias de agregación y proteínas de superficie); sin embargo, solamente se relacionan con la capacidad de colonizar el intestino (Olvera, 2013). Además de que resultados experimentales indican que poseen un papel importante en los alimentos fermentados, el cual es, el desarrollo de la inocuidad del producto, debido a la producción de sustancias con actividad antibacteriana; por lo que el riesgo de una infección enterococal por el consumo de queso Cotija, sería bajo (Olvera, 2013). De hecho no existen registros de infecciones gastrointestinales que estén relacionadas con este origen (Vallejo *et al.*, 2013).

Con el fin de saber si la presencia del género *Enterococcus* en alimentos pone en riesgo la salud del consumidor es necesario deslindar cepas inocuas de patógenas. Un método de tipificación de cepas es MLST (Tipificación por secuenciación Multilocus) donde se comparan siete sitios del genoma de la bacteria; sin embargo, la mayoría de los estudios con MLST se han centrado en aislados clínicos de humanos y animales, y la información de aislados de alimentos es escasa, aunque el número de clonas analizadas de origen alimentario va en aumento. (Franz *et al.*, 2003). En un estudio de tipificación realizado por Guzmán en el 2015 y Olvera (en proceso), con cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* aislados del queso Cotija “Región de Origen”, se observó que dichas bacterias no se encuentran relacionadas con las bacterias asociadas con infecciones nosocomiales (*E. faecium*



complejo clonal 17 y *E. faecalis* complejos clonales 2, 9 y 21), por lo cual se aporta un elemento más para afirmar que su presencia en el queso Cotija no representa un riesgo para quien lo consuma.

8.4. Perfil electroforético e identificación de las proteínas con actividad antibacteriana.

Debido a que tanto para *L. monocytogenes* como *S. aureus* se presentó una disminución de su cuenta bacteriana en ambos medios de cultivo, y que a su vez se descartó que dicha actividad fuera debida al aumento de la acidez del medio de cultivo debido a la producción de algún ácido orgánico por parte de *E. faecalis*, se trató de identificar si esa actividad antibacteriana era de carácter proteínico, por lo cual se realizó una precipitación de las proteínas en ambos medios de cultivo.

Anteriormente (Serrano, 2010) realizó varias metodologías previas a la electroforesis en las cuales comparó la calidad de la resolución del perfil electroforético obtenido con cada una de ellas. Reportando que la mejor resolución obtenida fue cuando se precipitaban y purificaban las proteínas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y TCA. Primero se llevó a cabo una primera precipitación de las proteínas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y posteriormente se llevó a cabo una segunda precipitación y purificación de las proteínas con TCA, con el fin de concentrar la mayor cantidad de proteína pura posible y a su vez disminuir la cantidad de carbohidratos que pudiera contener la muestra, evitando así que esta se caramelize y oscurezca el gel, obteniendo una buena resolución del perfil electroforético.

Las proteínas purificadas y concentradas de la cepa F de *E. faecalis* desarrollado en medio BHI y MLS, se sometieron a una electroforesis con el fin de separar las proteínas por su peso molecular y su carga eléctrica, para posteriormente determinar sus pesos moleculares y a su vez con ayuda de la zimografía, identificar aquellas proteínas que poseen actividad lítica frente a *M. lysodeikticus*.

El perfil electroforético y zimograma de *E. faecalis* F cuando se desarrolla en medio BHI se muestra en la Figura 32.



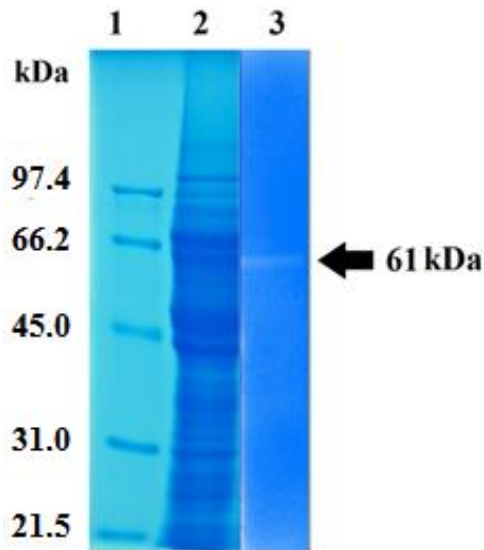


Figura 32. Perfil electroforético y zimograma de la cepa F de *E. faecalis* en gel tris-glicina al 10 %. (1) Marcador de peso molecular bajo, (2) Perfil electroforético de los sobrenadantes de la cepa F de *E. faecalis* en medio BHI, (3) Zimograma de actividad lítica contra *M. lysodeikticus* de los sobrenadantes de la cepa I de *E. faecalis* en medio BHI. Carril 1 y 2 teñidos con azul de Coomasie y carril 3 teñido con azul de metileno.

Se observó que dentro de las proteínas purificadas de *E. faecalis* F, se presentó solo una banda con actividad lítica contra *M. lysodeikticus* con un peso de 61 kDa, se podría pensar que al ser de carácter proteínico podría ser atribuida a la producción de una enterocina, sin embargo estas poseen un peso molecular bajo (por debajo de los 10 kDa), por lo tanto fue necesario mandar a identificar a la proteína con actividad lítica.

La muestra fue analizada por el método de identificación de proteínas por LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masas capaces de producir espectros en tándem), el cual permite identificar proteínas a partir del espectro de masas de su huella peptídica. Posteriormente, las secuencias de los péptidos se analizaron mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, National Center of Biotechnology Information) para encontrar regiones de similitud con secuencias de otras proteínas reportadas en la base de datos.

La secuencia obtenida fue la siguiente (se resaltan en negritas y color amarillo la ubicación de los péptidos dentro de la secuencia):

MKKSLLSAVMVCSMTLTAVASPIAAAAEDFDSQIQEQDAKIADLQNQQADAQAQIDALESQVADINTQAO
 DLLNKQASLRDESAKLEKDIADLQERIEKREDTIKKQARDAQVQNTSSNYVDAVLNADSFADAVGRVQAM
 TTMVRANNELINQQKADKKAIVEDKKAENEAK**LQEIASNQAVLESQKGDLLSKQADLNVAKASLAAEQATA**
EDKKAELNRKKEEAEAEQARIREEQRLAEVARQQAQQQAEEEARQQAEAEAAAQQQQQTQASSSETVQE
 STVSTEASSSQSEAATSESTAASDSASSESTTNSSETASSETTTSSSESTPSTEESSSTADTSSTGETSTQPS
 TDTSSNTSNSGTGSSSSNTGTTNTNTGNSTNTGTTNTNTSNTTNNGGTSNTNTGGTTTTPTQPVTTPPASSV
 NGAAIVAEAQKYIGVPYVWGGRTPSGFDCSGLTQYVYKQVTGR**DIGSWTVPQESAGTRISVSQAQPGDLL**
FWGSAGGTYHVAISLGGGQYIHAPRPGQNVITIGSTQWFTPDFAVRVL

Esta proteína posee un peso molecular de 56.5 kDa y tiene una región de NlpC/P60, la cual pertenece a una superfamilia con dominios bien conservados. Las proteínas NlpC/P60 definen una familia de peptidasas de la pared celular (peptidoglucano hidrolasas o PGH) que están ampliamente representadas en varios linajes bacterianos (Anantharaman y Aravind, 2003). Dicha actividad endopeptidasa es responsable de la actividad observada contra *M. lysodeikticus* (Gram positiva). Actúa degradando los enlaces peptídicos del peptidoglucano de la pared celular, ocasionando la muerte celular.

Es posible que la PGH identificada sea en parte responsable de la actividad antibacteriana que presentó la cepa F de *E. faecalis* contra *S. aureus* y *L. monocytogenes* durante las pruebas de co-cultivo, debido a que ambas bacterias son Gram positivas y se espera que posea la misma actividad observada en el zimograma contra *M. lysodeikticus*.

Anteriormente en el grupo de trabajo se observó la producción de varias PGHs de diferente peso molecular por parte de *E. faecalis* desarrollado en medio MRS, sin embargo se observó que existía una que presentaba una banda de actividad mucho mayor que las restantes (76 kDa) (Figura 33), lo cual indica que la producción de un metabolito antibacteriano u otro depende mucho de la composición del medio de cultivo en el que se



desarrolla la BAL. Esta PGH de 76 kDa posee una actividad de N-actilglucosaminidasa llamada At1A y fue previamente descrita y caracterizada por Eckert *et. al* en el 2006.

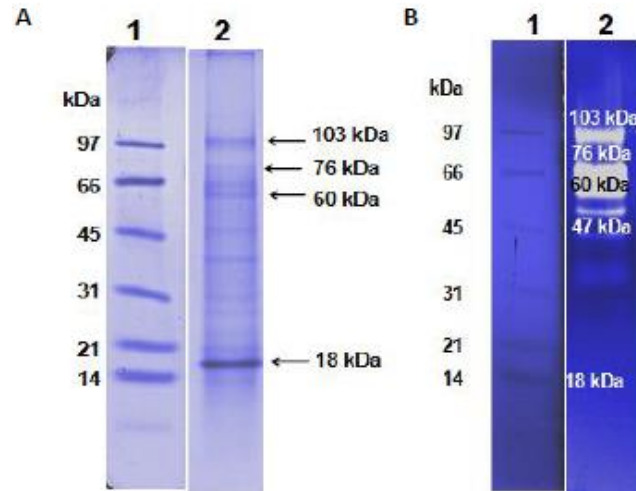


Figura 33. A: Perfil electroforético de los sobrenadantes concentrados de la cepa F (*E. faecalis*) (2). Marcador de peso molecular bajo (1). Gel SDS-Tris-Glicina, 10 % de poliacrilamida. **B:** Zimograma de actividad lítica contra *M. lysodeikticus* de los sobrenadantes concentrados de la cepa F (*E. faecalis*) (2). Marcador de peso molecular bajo (1). Gel SDS-Tris-Tricina, 10 % de poliacrilamida (Serrano, 2010).

Para el caso del perfil electroforético y zimograma de *E. faecalis* F desarrollado en medio MLS, no se logró obtener un gel con una buena resolución de bandas con el protocolo empleado, debido a que no se logran separar de manera eficiente todos los componentes de la leche (Imagen no mostrada).

Es bien conocido que la leche es un coloide complejo en el cual la grasa está dispersa como glóbulos finos en una fase acuosa que contiene lactosa, minerales y proteínas en solución verdadera, junto con una dispersión coloidal de la caseína en forma micelar (Badui, 2014). Por lo tanto se tendría que encontrar la manera de desestabilizar el sistema para poder separar de una manera más adecuada cada uno de los componentes hasta quedarse solamente con la fracción proteínica de la leche.

9. Conclusiones.

- Los medios de cultivo Agar Vogel Jonhson adicionado con 10g/L LiCl y el Agar Kanamicina, Esculina y Azida de sodio adicionado con Kanamicina a una concentración de 20 µg/mL, mostraron alta selectividad y permitieron una inequívoca cuenta en placa de cada una de las bacterias durante las pruebas de co-cultivo.
- Se presentó una mayor disminución en la cuenta bacteriana tanto de *Listeria monocytogenes* como de *Staphylococcus aureus* durante las pruebas de co-cultivo frente a la cepa F de *E. faecalis*, cuando esta última bacteria se encontraba en una concentración inicial 100 veces mayor que las dos restantes. Para el caso de *L. monocytogenes* la disminución de la cuenta fue de dos ciclos logarítmicos en medio BHI, mientras que para *S. aureus*, la disminución de su cuenta fue de un ciclo logarítmico en medio MLS.
- La composición del medio de cultivo afectó el desarrollo de las bacterias, mostrándose un mayor disminución de la cuenta bacteriana de *Listeria monocytogenes* durante el co-cultivo en medio BHI, mientras que en las pruebas de co-cultivo de *Staphylococcus aureus* lo fue en el medio MLS.
- Se identificó una proteína de 56.5 kDa producida por la cepa F de *Enterococcus faecalis*, la cual corresponde a una proteína con una región NlpC/P60 muy conservada en bacterias, que está implicada en la degradación del peptidoglucano de la pared celular. Solo se observó una actividad lítica contra una bacteria Gram positiva (*M. lysodeikticus*).



10. Perspectivas.

- Establecer los procesos previos a realizar antes de llevar a cabo la precipitación de las proteínas de la cepa K de *E. faecalis* desarrollado en el medio MLS, con el fin de desestabilizar el sistema en el cual se encuentran agrupados los nutrientes de la leche, para así obtener una mejor resolución del perfil electroforético y zimografía.
- Caracterizar la PHG producida por la cepa K de *E. faecalis* desarrollado en el medio BHI y a su vez, comparar su actividad antibacteriana contra la PHG producida por la misma bacteria desarrollada en medio MRS.



11. Bibliografía

- Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas López, R., Gálvez, A. 2008. La doble faceta del género *Enterococcus* y su importancia en alimentos. Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental. Vol. 21, n. 1, pp. 65-84.
- Aliño, M., López, J., Navarro, R., Duperval, P. 2007. Aminoglucósidos: mirada actual desde su historia. Revista Cubana de Pediatría. Vol. 79, n.2.
- Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., De Laurenzi, V. 2015. Review Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria. Vol. 6, pp. 1-10.
- Álvarez, R., Barragán, E., Chombo, P. 2005. Reglas de uso Marca Colectiva. Queso Cotija Región de Origen. México, pp. 5-10.
- Anantharaman, V., Aravind, L. 2003. Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. Genome Biology. Vol. 4, pp. 87-98.
- Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: Classification and Physiology **En:** S. Salminen, A. Wright y A. Ouwehand eds. Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 3ª Edición. New York: Marcel Dekker. Cap. 1.
- Azadnia, P., Zamani, M.H., Shah Ahmad Ghasemi, Khalegh Babaki, A., Karimi Jashni, M., Taarof, N. 2011. Isolation and identification of thermophilic *Lactobacillic* from tradicional yogurts of tribes of Kaserum. Journal of Animal and Veterinary Advances. Vol 10, n. 3, pp. 774-776.
- Badui, S. 2014. Química de los alimentos, 5ta edición, México: Pearson. pp.626 – 629.
- Becerra, Ma. B. 2013. Detección de *Listeria monocytogenes* en queso Cotija artesanal madurado. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, D.F.
- Beristain, S.C., Palou, E., López, A. 2012. Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. Vol. 6, n. 2, pp. 64-78.



- Bravo, A. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas del queso Cotija. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, D.F.
- Cabeen MT, Jacobs-Wagner C. 2005. Bacterial cell shape. *Nat. Rev. Microbiol.* Vol. 3, pp. 601-610.
- Cabeza Herrera, E.A. 2015. El papel y la aplicación de los Enterococos: un rompecabezas en la alimentación y la salud humana. Universidad de Pamplona; Colombia.
- Cameán, A., Ma. Mellado, E., Repetto, M. 2012. Contaminantes Biológicos. **En:** A. Ma. Cameán y M. Repetto eds. Toxicología alimentaria. Madrid: Diaz de Santos, pp. 251.
- Carr, F.J., Chill, D., Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology.* Vol. 28, n. 4, pp. 281-370.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for food, *Nature Reviews of Microbiology.* Vol. 3, pp. 777-788.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2012. Listeria (Listeriosis) [En línea] (Actualizado al 22 de Octubre de 2015). Disponible en: <http://www.cdc.gov/listeria/index.html> [Último acceso el 6 de Enero de 2016].
- Chin, J. 2001. El control de las enfermedades transmisibles. Organización Panamericana de la Salud, n. 581, pp. 382-386.
- Delgado, E. 2013. Producción de compuestos antibacterianos por bacterias ácido lácticas aisladas del queso Cotija. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, D.F.
- Díaz, M., Rodríguez, C., Zhurbenko, R. 2010. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.* Vol. 48, n.2, pp. 147-161.
- Díaz, M., Rodríguez, C., Zhurbenko, R. 2013. *Enterococcus*, medios de cultivo convencionales y cromogénicos. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.* Vol. 51, n.1, pp. 97-110.
- Doyle, M.P., Beuchat, L.R. 2012 *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*, Washington D.C: ASM Press. Cap. 22.



- Ecker, C., Lecerf, M., Dubost, L., Arthur, M., Mesnage, S. 2006. Funcional Analysis of AtlaA, the Major N-Acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*. 188, pp. 8513-8519.
- Ennahar. S., Deschamps, N. 2000. Anti-Listeria effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* Vol. 88, n. 3, pp. 449-457.
- Erginkaya, Z., Kalkan, S., Ünal, E. 2014. Microbial Metabolites as Biological Control Agents in Food Safety. **En:** A. Malik, Z. Erginkaya, S. Ahmad y H. Erten eds. *Food Processing: Strategies for Quality Assessment*. New York: Springer, pp. 225-260.
- Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 47, pp. 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, ME; Schleifer, K.H y Holzapfel W.H, 2003. Enterococci in foods aconundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 105-122.
- Frirdich, E., Gaynor, EC. 2013. Peptidoglycan hydrolases, bacterial shape, and pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* Vol. 16. n. 6. pp. 767-778
- García-Cano, I., Serrano-Maldonado, C.E., Olvera-García, M., Delgado- Arciniega, E., Peña-Montes, C., Mendoza-Hernández, G., Quirasco, M. 2014. Antibacterial activity produced by *Enterococcus* spp. isolated from an artesanal Mexican dairy product, Cotija cheese. *LTW Food Science and Technology*. Vol. 59, pp. 26-34.
- García, M., Revah, S., Gómez, L. 2002. Productos lácteos. **En:** M. García, R. Quintero, A. López-Munguía eds. *Biotecnología Alimentaria*, México, DF: Limusa Noriega Editores. pp. 153-207.
- García, M.T., Marínez Cañamero, M., Lucas, R., Ben Omar, N., Pérez Pulido, R., Gálvez, A. 2004. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin EJ97 produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Int. J. Food Microbiol.* Vol. 90, n. 2, pp. 161-170.
- Gänzle M.G., Vogel R.F. 2003. Studies on the mode of action of reutericyclin. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 69, no. 2, pp. 1305 – 1307.
- Gänzle, M.G. 2004 Reutericyclin: biological activity, mode of action, and potential applications. *Appl. Microbiol Biotechnol.* Vol 64, no.3, pp. 326 - 332.



- Giraffa, G. 2002. Enterococci from foods. FEMS Microbiology Reviews. Vol. 26, pp. 163-171.
- Guzmán, A. 2015. Estudio genético poblacional de cepas de *Enterococcus faecium* aisladas del queso Cotija artesanal madurado. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, D.F.
- Hernández, A. 2010. Caracterización de la actividad bactericida de péptidos producidos por bacterias ácido lácticas aisladas de un queso tradicional mexicano. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, D.F.
- Hernández, V. 2007. Queso Cotija: Estudio del análisis fisicoquímico, proximal y actividad antioxidante. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, D.F.
- Hennekinne, J.A., Dragacci, S. 2014. Staphylococcal Enterotoxins. **En:** D. Liu ed. Manual of Security Sensitive Microbes and Toxins, New York: CRC Press. pp. 533-544.
- Jay, J., Loessner, M., Golden, D. 2006. Modern Food Microbiology. 7° ed. New York: Board. pp. 591-612.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. Vol. 227, n. 5259, pp. 680-685.
- Law, JW-F., Ab Mutalib, N-S., Chan, K-G., Lee L-H. 2015. An insight into the insolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food. Front. Microbiol. Vol. 6, pp. 1-15.
- Leclerc D., Asselin A. 1989. Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing gel electrophoresis. Canadian Journal of Microbiology. Vol. 35, pp. 749-753.
- Liu, D., Busse H.J. 2009. *Listeria*. **En:** D. Liu ed. Molecular Detection of Foodborne Pathogens. New York: CRC Press. pp. 207-220.
- Manfredi, E.A., Leotta, G.A., Rivas, M. 2010. PCR múltiple para la detección de los genes sea, seb, sec, sed y see de *Staphylococcus aureus*: Caracterización de aislamientos de origen alimentario. Rev. Argent. Microbiol. Vol. 42, n. 3, pp. 212-215.



- Manual terrestre de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2014. Capítulo 2.9.7 *Listeria monocytogenes*. [En línea] (Actualizado al 30 de Septiembre de 2015). Disponible en: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/> [Último acceso el 9 de Febrero de 2016].
- Matamoros, S. 2010. Influencia de compuestos extracelulares de bacterias ácido lácticas sobre *S. aureus* y *E. coli* en un medio lácteo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México; D.F.
- Miles, A.A., Misra, S.S. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hygiene*. Vol. 38, n. 6, pp. 732-749.
- Moroni, P., Pisoni, G., Cremonesi, P., Castiglioni, B. 2009. *Staphylococcus*. **En:** D. Liu ed. *Molecular Detection of Foodborne Pathogens*. New York: CRC Press. pp. 245-258.
- Muñoz, A., Ananou, S., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A., Maqueda, M., Valdivia, E. 2007. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat. *International Dairy Journal*, Vol. 17, pp. 760-769.
- Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M. 2013. *Microbiología médica*. 7ª edición. Barcelona: Elsevier. pp. 205-208.
- Naidu, A.S., Clemens, R.A. 2000. Probiotics. **En:** A. S. Naidu ed. *Natural food antimicrobial system*. New York: CRC Press. pp. 431-462.
- Norma Mexicana NMX-F-735-COFOCALEC-2011. Sistema Producto Leche-Alimentos-Lácteos-Alimento lácteo regional- Queso Cotija artesanal madurado-Denominación, especificaciones y métodos de prueba.
- Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Ogier, J.C., Serror, P. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms. The *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* Vo.126, pp. 291-301.
- Olson, D., Aryana, K. 2008. An excessively high *Lactobacillus acidophilus* inoculation level in yogurt lowers product quality during storage. Vol. 41, pp. 911-918.



- Olvera, M. 2013. Evaluación de la inocuidad de *Enterococcus* spp. aislados del queso Cotija. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM, México, D.F.
- Olvera, M. En proceso. Caracterización genómica de cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de un alimento artesanal. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM, México, D.F.
- Osorio, D., Roldan, J. 2003. Lácteos y derivados. Ed. Bogotá: Grupo Latino. pp. 44
- Ouwehand, A.C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. **En:** S. Salminen y A. von Wright. eds. Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects. 2^{da} edición. Marcel Dekker Inc: New York. pp. 139-160.
- Ouwehand, C., Vesterlund, S. 2004. Antimicrobial Components from lactic acid bacteria. **En:** S. Salminen, A. Wright y A. Ouwehand eds. Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 3^a Edición. New York: Marcel Dekker. Cap. 11.
- Ozkaya, F., Aslim, B., Ozkaya, M. 2007. Effect of exopolysaccharides (EPSs) produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria. LTW. Vol. 40, pp. 564-568.
- Pascual, A. 2009. Microbiología y patogenia de las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. **En:** A. Pahissa ed. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. Barcelona: Marge. pp. 15-32.
- Parguel, P., Monterrubio, R., Quiñones, E., Reyes, B. 2011. Informe de la misión IPN-COFOCALEC-FAO sobre el Queso Cotija. México.
- Parra, Ricardo A. 2010. Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Vol.8, n.1, pp. 93-105.
- Ramírez-López, C., Vélez-Ruiz, J.F. 2012. Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos. Vol. 6, n. 2, pp. 131-148.
- Sagdic, O., Tornuk, F., Öztürk, I., Karasu K., Yilmaz, M. 2014. Biological Preservation of Foods. **En:** V. Ravishankar Rai y Jamuna A. Bai eds. Microbial Food Safety and Preservation Techniques. New York: CRC Press. pp. 453-476



- Salto, I. 2013. Identificación y cuantificación de *Staphylococcus aureus* en queso Cotija artesanal madurado. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, D.F.
- Savadogo, A., Ouattara, A.T., Bassole, H.N., Traore S.A. 2006. Review. Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview. African Journal of Biotechnology. Vol. 5, n. 9, pp. 678-683.
- Seoane, M. 2013. *Listeria monocytogenes*. Rev. Chilena Infectol, Vol. 30, n. 4, pp. 405-406.
- Serrano, C. 2010. Caracterización de la actividad antibacteriana producida por cepas de BAL aisladas de un alimento artesanal mexicano. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, D.F.
- Schwartz, B., Hexteer, D., Broome C.V., Gaventa, S., Brown, G.R., Gellin, B.G., Hightower A.W., Hirschhorn, R.B., Porter, J.D., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Lorber, B., Faris, D.G. 1989. Investigation of an outbreak of Listeriosis: New hypotheses for the etiology of epidemic *L. monocytogenes* infection. J. Infect Dis. Vol. 159, pp. 680-685.
- Stewart. C.M., Cole, M.B., Legan, J.D., Slade, L., Schaffner, D.W. 2005. Solute-specific effects of osmotic stress on *Staphylococcus aureus*. Journal of Applied Microbiology, Vol. 96, pp. 193-202.
- Torres, M.R. 2002. Flora intestinal, probióticos y salud. 2ª edición, Formas finas. Guadalajara, Jal.
- Vallejo, M., Ledesma, P., Marguet, E.R. 2013. Caracterización parcial de enterocinas producidas por una cepa de *Enterococcus faecium* aisladas de leche ovina. Rev. Soc. Ven. Microbiol. Vol. 33, n.1, pp. 28-34.
- Vásquez, S.M., Suárez, H., Zapata, B.S. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Revista chilena de nutrición, Vol. 36, n. 1, pp. 64-71.
- Voet, D., Voet Judith, G. 2004 Bioquímica. 3ª edición. México: Panamericana. pp. 387,388.
- Vollmer, W., Blanot, D., de Pedro, M.A. 2008a. Peptidoglycan structure and architecture. FEMS Microbiol. Rev. Vol. 3, pp. 149 – 167.



- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., Foster, S. 2008b. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. FEMS Microbiology Reviews. Vol. 32, pp. 259 – 286.
- World Health Organization. 2004 Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Microbiological risk assessment series 4. pp. 7-15.
- Zúñiga, B. 2009. Descripción e identificación de la comunidad bacteriana presente en el Cotija por métodos moleculares. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM, México, D.F.



12. Anexo.

I. Medios de cultivo empleados

❖ Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) Becton Dickinson ®

Es un medio líquido de uso general utilizado en el cultivo de microorganismos exigentes y no exigentes, incluyendo bacterias aerobias y anaerobias, a partir de una variedad de materiales clínicos y no clínicos.

Composición del medio de cultivo:

Formula	g/L
Infusión de cerebro de ternera	7.7
Infusión de corazón de res	9.8
Peptona especial	10.0
Dextrosa	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato disódico	2.5
pH 7.4 ± 0.2 a 25 °C	

Fundamento

Es un medio muy rico en nutrientes, que proporciona un adecuado desarrollo microbiano. La infusión de cerebro de ternera, la infusión de corazón de res y la peptona, son la fuente de carbono, nitrógeno, azufre y vitaminas. La dextrosa es el carbohidrato fermentable (energía), el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el fosfato disódico otorga capacidad buffer.

Preparación del medio de cultivo

Suspender 37g del polvo en 1L de agua purificada. Mezclar bien. Esterilizar en autoclave a 121 ° durante 15 minutos.

Al medio de cultivo se le puede adicionar 1% de Agar antes de esterilizarlo. Enfriar a 50 °C y vaciar en cajas Petri estériles.



❖ **Agar Vogel Johnson Oxoid®**

Medio utilizado para la rápida detección de estafilococos coagulasa positivo fermentadores de manitol, a partir de alimentos y otros materiales de importancia sanitaria y clínica.

Composición del medio de cultivo:

Formula	g/L
Triptona	10.0
Extracto de levadura	5.0
Manitol	10.0
Fosfato dipotásico	5.0
Cloruro de litio	5.0
Glicina	10.0
Rojo de fenol	0.025
Agar	16.0
pH 7.2 ± 0.2 a 25 °C	

Fundamento

En el medio de cultivo, la triptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano. El manitol es el carbohidrato fermentable. El telurito de potasio, el cloruro de litio y la alta concentración de glicina inhiben el desarrollo de la microbiota habitual de tracto respiratorio superior y de algunas especies de microorganismos Gram positivos y negativos, permitiendo el crecimiento selectivo de estafilococos. El rojo fenol es el indicador de pH y el agar es el agente solidificante.

Es diferencial por la fermentación de manitol y reducción de telurito a telurio.

Los estafilococos coagulasa positivo, fermentan el manitol, produciendo la acidificación del medio y el viraje del indicador de pH al color amarillo, y también reducen el telurito a telurio observándose como colonias de color negro.



Preparación del medio de cultivo

Suspender 61g en 1 litro de agua destilada y llevar suavemente a ebullición para disolver completamente. Esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos. Enfriar a 50 ° C y añadir 5.7 ml de solución estéril de telurito de potasio al 3.5 % SR0030 (equivalente a 20 mL de telurito de potasio al 1 %), homogeneizar y vaciar el medio en cajas Petri.

❖ **Agar Kanamicina Esculina y Azida Oxoid (KAA) ®**

Medio de cultivo selectivo para el aislamiento, la diferenciación y la cuenta de enterococos en los alimentos, el agua y otros materiales.

Composición del medio:

Formula	g/L
Peptona de caseina	20.0
Extracto de levadura	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Citrato de sodio	1.0
Azida sódica	0.15
Esculina	1.0
Citrato de amonio hierro (III)	0.5
Almidón	0.6
Agar	10.0
pH 7.0 ± 0.2 a 25 °C	

Fundamento

La selectividad de este medio para los enterococos es muy elevada e incluso superior a la de otros medios comparables. La kanamicina y la azida sódica inhiben el crecimiento de la microbiota acompañante, mientras que los enterococos pueden crecer sin restricción. A su vez estos microorganismos hidrolizan la esculina con la producción de glucosa y esculetina,



la cual reacciona con el amonio hierro (III) citrato para dar un complejo de color variable entre el verde y el negro.

Preparación del medio de cultivo

Suspender 22.6 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Añadir un vial de Suplemento Kanamicina Sulfato Oxoid SR0092E reconstituido como se indica (0.01g kanamicina/2mL agua destilada). Llevar a ebullición. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Vaciar en cajas Petri.

En caso de no contar con el suplemento, se puede adicionar kanamicina a una concentración final de 20 µg / mL al medio de cultivo ya estéril y a una temperatura de 45-50 °C. Vaciar en cajas Petri estériles.

❖ **Agar Bair Parker Becton Dickinson ®**

Es un medio moderadamente selectivo y de diferenciación para el aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus* en alimentos, muestras ambientales y clínicas.

Composición del medio:

Formula	g/L
Triptona	10.0
Extracto de carne	5.0
Extracto de levadura	1.0
Glicina	12.0
Piruvato de sodio	10.0
Cloruro de litio	5.0
Agar	20.0
pH 6.8 ± 0.3 a 25 °C	



Fundamento

Por la presencia del cloruro de litio y el telurito de potasio se inhibe el crecimiento de microorganismos no deseados. Por la presencia del piruvato de sodio y la glicina se favorece el crecimiento de los estafilococos. A su vez el telurito de potasio combinado con la acción de la yema de huevo permite diferenciar los estafilococos. El *S. aureus* da colonias negras, por la reducción del telurito de potasio a telurio, rodeadas de un halo de transparencia debido a la actividad lecitinasa.

Preparación del medio de cultivo

Suspender 63 g del polvo en 1 L de agua purificada, calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50 °C y añadir asépticamente 50 mL de la emulsión yema de huevo-telurito Difco™ (Contiene 30 % de yema de huevo con 0.15 % de telurito de potasio), homogeneizar y vaciar en cajas Petri estériles.

❖ Medio Lácteo con Sal (MLS)

Es un medio que fue elaborado por (Matamoros, 2010), el cual hablando composicionalmente (Tabla A) y fisicoquímicamente (Tabla B), es similar a la cuajada utilizada para la elaboración del queso Cotija.

Tabla A. Comparación de la composición química reportada para la cuajada producida en la elaboración del queso Cotija y la composición química del medio lácteo con sal (MLS) (Hernández, 2007; Matamoros, 2010).

Componente	Cuajada	MLS
	% (p / v)	
Carbohidratos	No reportado	4.80
Lípidos	3.70	3.40
Proteínas	3.00	3.10
Sal de grano	5.00	5.00



Tabla B. Comparación de los parámetros fisicoquímicos reportados para la cuajada producida en la elaboración del queso Cotija y la composición química del medio lácteo con sal (MLS) (Hernández, 2007; Matamoros, 2010).

Parámetro	Cuajada	MLS
% acidez	0.14 a 0.16	0.14
pH	6 a 7	6.36
a_w	0.90 a 0.99	0.946

Fundamento

La composición química del medio provee de nutrientes aprovechables por varios microorganismos. En tanto que la elevada concentración de sal y los parámetros fisicoquímicos limitan el desarrollo de muchos otros que no toleren esas condiciones.

Preparación del medio de cultivo

Se usó leche entera UHT marca Alpura Selecta® y sal de grano comercial marca Elefante®. Se colocaron 2.48 g de sal de grano en un matraz Erlenmeyer de 250 mL estéril. Posteriormente, en condiciones asépticas se le adicionaron 50 mL de leche entera UHT, a este sistema se le denominó medio lácteo con sal (MLS) (Matamoros, 2010).



II. Metodología empleada para la estandarización de los inóculos de cada bacteria.

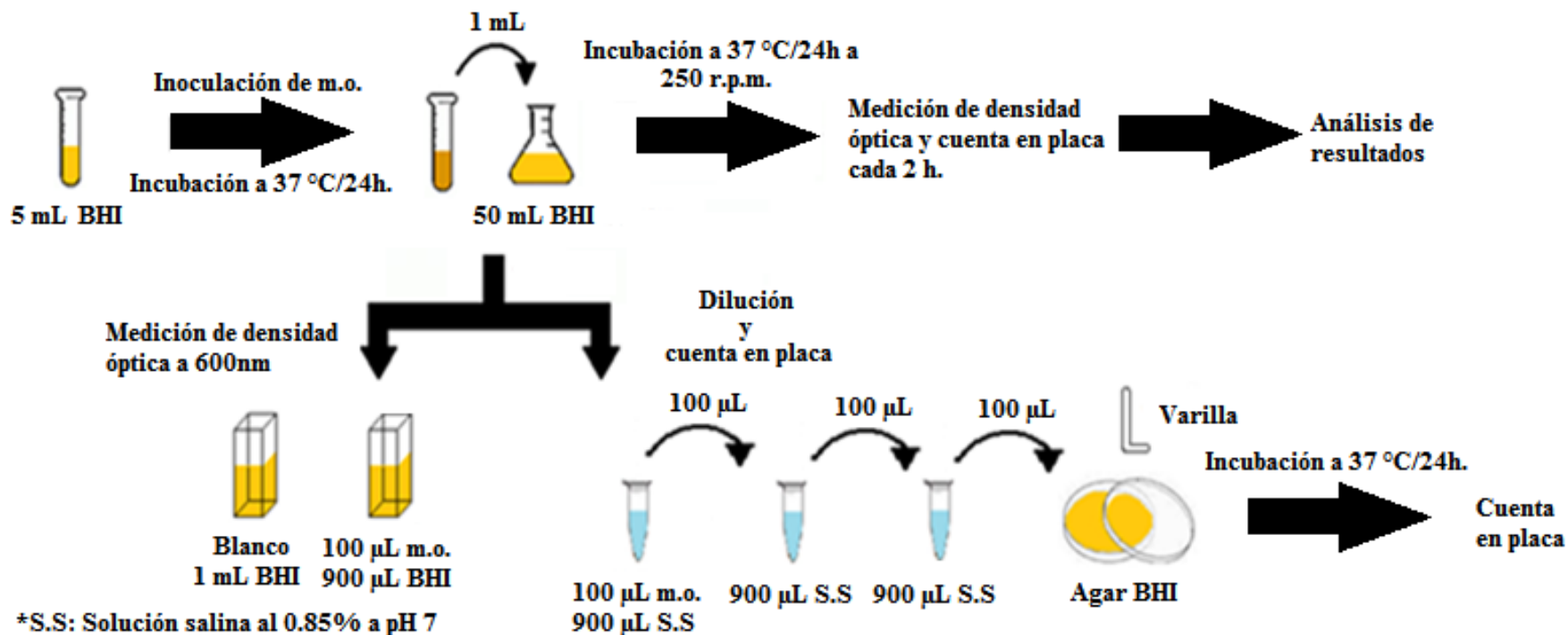


Figura A. esquema de la metodología empleada para llevar a cabo la estandarización de los inóculos de *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. faecalis* F en medio BHI.

III. Diluciones llevadas a cabo durante cada una de las pruebas de co-cultivo tanto en medio BHI como en MLS.

- **Tabla C.** Diluciones realizadas durante la prueba de co-cultivo entre *E. faecalis* F y *L. monocytogenes*, ambas a una concentración inicial de 10^6 UFC/mL en medio BHI.

Tiempo (h)	Diluciones					
	<i>Enterococcus faecalis</i> F			<i>Listeria monocytogenes</i>		
0	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
4	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
8	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
12	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
16	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}

- **Tabla D.** Diluciones realizadas durante la prueba de co-cultivo entre *E. faecalis* F y *L. monocytogenes*, a una concentración inicial de 10^6 y 10^4 UFC/mL respectivamente, en medio BHI.

Tiempo (h)	Diluciones					
	<i>Enterococcus faecalis</i> F			<i>Listeria monocytogenes</i>		
0	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	Directo	10^{-1}	10^{-2}
4	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
8	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
12	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
16	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}



- **Tabla E.** Diluciones realizadas durante la prueba de co-cultivo entre *E. faecalis* F y *L. monocytogenes*, a una concentración inicial de 10^4 y 10^6 UFC/mL respectivamente, en medio BHI.

Tiempo (h)	Diluciones					
	<i>Enterococcus faecalis</i> F			<i>Listeria monocytogenes</i>		
0	Directo	10^{-1}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
4	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
8	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
12	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
16	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}

- **Tabla F.** Diluciones realizadas durante la prueba de co-cultivo entre *E. faecalis* F y *L. monocytogenes*, ambas a una concentración inicial de 10^6 UFC/mL en medio MLS.

Tiempo (h)	Diluciones					
	<i>Enterococcus faecalis</i> F			<i>Listeria monocytogenes</i>		
0	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
4	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
8	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
12	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
16	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}



- **Tabla G.** Diluciones realizadas durante la prueba de co-cultivo entre *E. faecalis* F y *L. monocytogenes*, a una concentración inicial de 10^6 y 10^4 UFC/mL respectivamente, en medio MLS.

Tiempo (h)	Diluciones					
	<i>Enterococcus faecalis</i> F			<i>Listeria monocytogenes</i>		
0	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	Directo	10^{-1}	10^{-2}
4	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
8	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
12	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
16	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}

- **Tabla H.** Diluciones realizadas durante la prueba de co-cultivo entre *E. faecalis* F y *L. monocytogenes*, a una concentración inicial de 10^4 y 10^6 UFC/mL respectivamente, en medio MLS.

Tiempo (h)	Diluciones					
	<i>Enterococcus faecalis</i> F			<i>Listeria monocytogenes</i>		
0	Directo	10^{-1}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
4	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
8	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
12	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
16	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}



- **Tabla I.** Diluciones realizadas durante la prueba de co-cultivo entre *E. faecalis* F y *S. aureus*, ambas a una concentración inicial de 10^6 UFC/mL en medio BHI.

Tiempo (h)	Diluciones					
	<i>Enterococcus faecalis</i> F			<i>Staphylococcus aureus</i>		
0	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
4	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
8	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
12	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
16	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}

- **Tabla J.** Diluciones realizadas durante la prueba de co-cultivo entre *E. faecalis* F y *S. aureus*, a una concentración inicial de 10^6 y 10^4 UFC/mL respectivamente, en medio BHI.

Tiempo (h)	Diluciones					
	<i>Enterococcus faecalis</i> F			<i>Staphylococcus aureus</i>		
0	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	Directo	10^{-1}	10^{-2}
4	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
8	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
12	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
16	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}



- **Tabla K.** Diluciones realizadas durante la prueba de co-cultivo entre *E. faecalis* F y *S. aureus*, a una concentración inicial de 10^4 y 10^6 UFC/mL respectivamente, en medio BHI.

Tiempo (h)	Diluciones					
	<i>Enterococcus faecalis</i> F			<i>Staphylococcus aureus</i>		
0	Directo	10^{-1}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
4	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
8	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
12	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
16	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}

- **Tabla L.** Diluciones realizadas durante la prueba de co-cultivo entre *E. faecalis* F y *S. aureus*, ambas a una concentración inicial de 10^6 UFC/mL en medio MLS.

Tiempo (h)	Diluciones					
	<i>Enterococcus faecalis</i> F			<i>Staphylococcus aureus</i>		
0	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
4	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
8	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
12	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
16	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}



- **Tabla M.** Diluciones realizadas durante la prueba de co-cultivo entre *E. faecalis* F y *S. aureus*, a una concentración inicial de 10^6 y 10^4 UFC/mL respectivamente, en medio MLS.

Tiempo (h)	Diluciones					
	<i>Enterococcus faecalis</i> F			<i>Staphylococcus aureus</i>		
0	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
4	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
8	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
12	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
16	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}

- **Tabla N.** Diluciones realizadas durante la prueba de co-cultivo entre *E. faecalis* F y *S. aureus*, a una concentración inicial de 10^4 y 10^6 UFC/mL respectivamente, en medio MLS.

Tiempo (h)	Diluciones					
	<i>Enterococcus faecalis</i> F			<i>Staphylococcus aureus</i>		
0	Directo	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
4	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
8	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
12	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
16	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}



IV. Ejemplos de cálculo de UFC/mL y esquema de la metodología empleada durante las pruebas de co-cultivo.

- **Ajuste de la concentración inicial de los inóculos para realizar las pruebas de co-cultivo.**

Supongamos que se tienen dos inóculos; uno de *E. faecalis* F y otro de *L. monocytogenes*, se dejaron incubando por 2 h a 37 °C a 250 rpm y posteriormente se les midió su densidad óptica a 600 nm, obteniéndose los siguientes valores: D.O. a 600 nm de *E. faecalis* F: 0.035

D.O. a 600 nm de *L. monocytogenes*: 0.01

Con ayuda de las ecuaciones de las curvas de la relación entre densidad óptica a 600 nm y el Ln UFC/mL se calcula el volumen de cada inóculo a adicionar a un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de caldo BHI o MLS.

Para *E. faecalis* F se tiene la siguiente ecuación: $Y = 1.5384 \ln(x) + 22.877$, siendo “Y” el Ln UFC/mL y “X” la densidad óptica. Se sustituye el valor de densidad óptica obtenido y se resuelve la ecuación.

$$Y = 1.5384 \ln(0.035) + 22.877$$

$$Y = 17.72 \rightarrow 17.72 \ln \text{ UFC/mL}$$

Posteriormente se transforma a UFC/mL.

$$e^{17.72} = 49624737.14 \text{ UFC/mL, lo que equivale a } 5 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$$

Dependiendo la concentración de la bacteria con la cual se desea iniciar el co-cultivo, se obtiene el volumen a adicionar a “X” volumen de medio de cultivo. Para este caso, las pruebas de co-cultivo se realizaron en 50 mL de medio BHI o MLS.

$$C1V1 = C2V2$$

Siendo C1: Concentración actual de la bacteria (UFC/mL)

C2: Concentración inicial deseada para las pruebas de co-cultivo (UFC/mL)

V1: Volumen a adicionar de la bacteria



V2: Volumen del medio de cultivo

En este caso, la prueba de co-cultivo se desea iniciar a una concentración de 1×10^6 UFC/mL.

Despejando V1 se tiene lo siguiente:

$$V1 = \frac{\left(1 \times 10^6 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}\right)(50\text{mL})}{5 \times 10^7 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}} = 1 \text{ mL} = 1000 \mu\text{L}$$

Entonces, para iniciar con una concentración de 1×10^6 UFC/mL de ese cultivo de *E. faecalis* F, se tiene que adicionar 1 mL a 50 mL de caldo BHI.

Se realizan los mismos cálculos para *L. monocytogenes*, solo que su ecuación de la curva es diferente ($Y = 1.411 \ln(x) + 22.089$), obteniéndose como volumen a adicionar 8.47 mL de ese cultivo de *L. monocytogenes* a 50mL de caldo BHI, para que su concentración inicial sea de 1×10^6 UFC/mL.

- **Calculo de UFC/mL por el método de Miles y Misra.**

Supóngase que se obtiene la siguiente cuenta bacteriana para *L. monocytogenes*

Tiempo (h)	Numero de colonias								
	Dilución 1: 10^{-2}			Dilución 2: 10^{-3}			Dilución 3: 10^{-4}		
0	Int.	Int.	Int.	60	88	75	13	9	12

*Int.: Incontable

El método de cuenta variable en superficie (Miles y Misra, 1938), estipula que se deben tomar en cuenta solo aquellas diluciones donde el número de colonias es inferior a 30, por lo cual se tomarían únicamente las cuentas de la dilución 3. Se calcula el promedio y posteriormente las UFC/mL.

$$\bar{x} = \frac{13+9+12}{3} = 11.33$$

$$\text{Número de bacterias por mL} = \frac{N \times f}{V}$$



Siendo N: Número promedio de colonias

f: Inverso del factor de dilución

V: Volumen de la gota (mL)

Cabe resaltar que en la metodología de Miles y Misra se inoculan solamente 20 μL de cada dilución por triplicado, por lo cual se tiene que convertir las unidades a mL para poder calcular las UFC/mL

$$(20 \mu\text{L}) \left(\frac{1\text{mL}}{1000 \mu\text{L}} \right) = 0.02 \text{ mL}$$

$$\frac{(11.33 \text{ colonias}) \left(\frac{1}{10^{-4}} \right)}{0.02 \text{ mL}} = 5.7 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$$



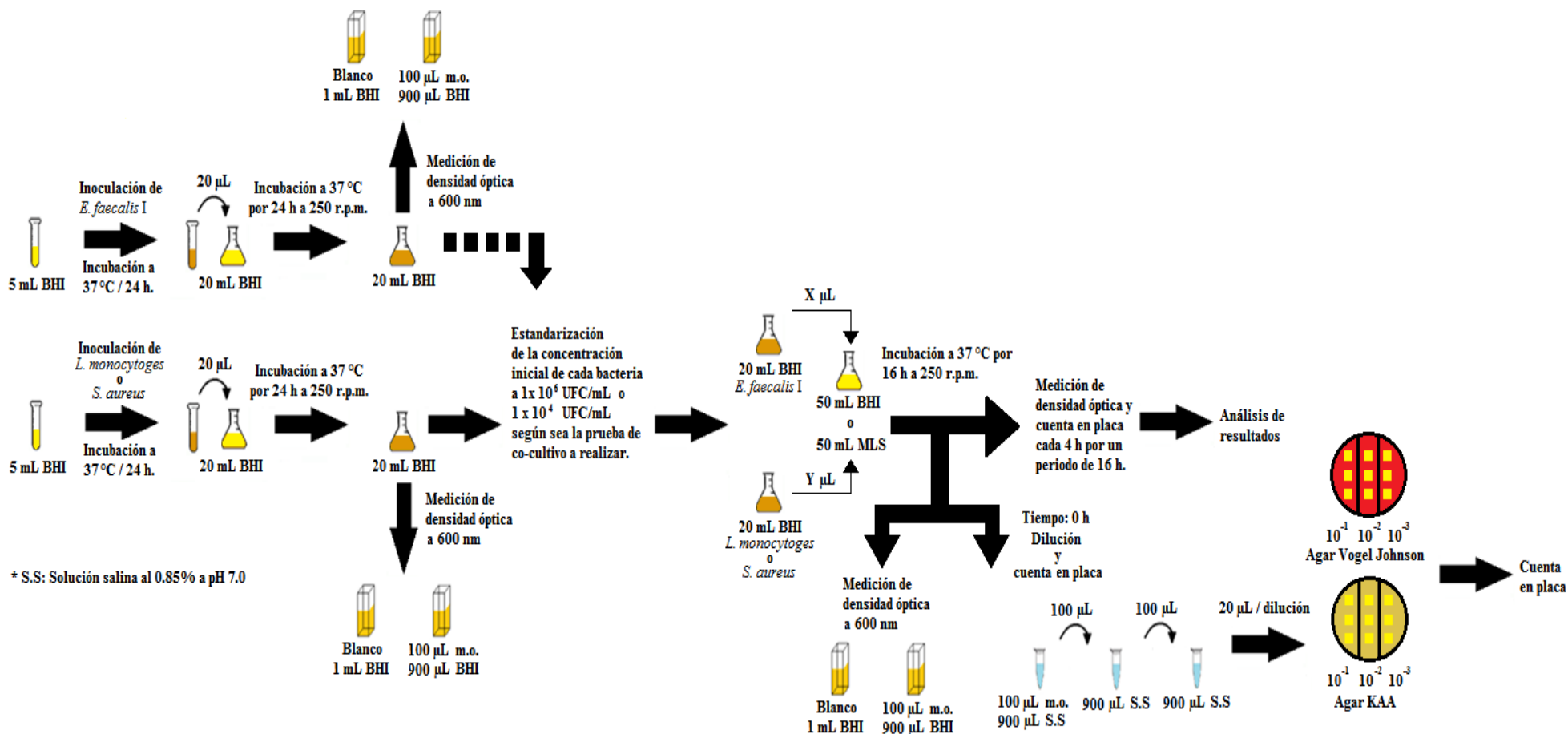


Figura B. Metodología empleada para las pruebas de co-cultivo entre *E. faecalis* F contra *L. monocytogenes* y *E. faecalis* F contra *S. aureus*, tanto en medio BHI como MLS.



V. Preparación de reactivos para geles SDS-PAGE.

- **Gel separador al 10 % (v/v) de solución de acrilamida.**

Formulación	Para 1 gel
Agua desionizada	3.5 mL
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.12 mL
Solución de acrilamida al 30 %	2.80 mL
SDS al 10 % (w/v)	85 µL
APS al 10 % (w/v)	75 µL
TEMED (Biorad)	7.5 µL

Elaboración:

Adicionar y mezclar solución de 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, SDS al 10 % (w/v), agua desionizada y solución de acrilamida al 30 % (w/v).

Posteriormente adicionar APS al 10 % (w/v) y TEMED.

Dejar que la acrilamida polimerice hasta formar un gel.

Para la elaboración del zimograma, lleva adicionalmente 17 mg de *M. lysodeikticus* liofilizado (Sigma) o el equivalente a 0.2 % de células del microorganismo indicador.

- **Gel concentrador al 4 % (v/v) de solución de acrilamida.**

Formulación	Para 1 gel
Agua desionizada	1.81 mL
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	250 µL
Solución de acrilamida al 30 %	415 µL
SDS al 10 % (w/v)	25 µL
APS al 10 % (w/v)	30 µL
TEMED (Biorad)	3 µL

Elaboración:

Adicionar y mezclar solución de 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, SDS al 10 % (w/v), agua desionizada y solución de acrilamida al 30 % (w/v).

Posteriormente adicionar APS al 10 % (w/v) y TEMED.

Dejar que la acrilamida polimerice hasta formar un gel.



- **1.5M Tris-HCl, pH 8.8.**

Formulación	Para 100 mL de preparación
Tris base (Biorad)	18.15 g
Agua desionizada	100 mL

Elaboración:

Disolver tris base en agua desionizada, ajustar a pH 8.8 y almacenar a 4 °C.

- **0.5M Tris-HCl, pH 6.8.**

Formulación	Para 100 mL de preparación
Tris base (Biorad)	6.0 g
Agua desionizada	100 mL

Elaboración:

Disolver tris base en agua desionizada, ajustar a pH 6.8 y almacenar a 4 °C.

- **Solución de acrilamida al 30 % (w/v).**

Formulación	Para 100 mL de preparación
Acrilamida (Biorad)	29.2 g
N'N'-bis-metilen-acrilamida (Biorad)	0.8 g
Agua desionizada	100 mL

Elaboración:

Agregar acrilamida y N'N'-bis-metilen-acrilamida, disolverlos en agua desionizada, almacenar a 4 °C en condiciones de obscuridad.

Usar equipo de seguridad puesto que la acrilamida es cancerígena.



- **SDS 10 % (w/v).**

Formulación	Para 100 mL de preparación
SDS (Biorad)	10.0 g
Agua desionizada	100 mL

Elaboración:

Disolver SDS en agua desionizada y caliente, posteriormente almacenar a temperatura ambiente.

- **Persulfato de amonio (APS) 10 % (w/v).**

Formulación	Para 1 mL de preparación
APS (Biorad)	100 mg
Agua desionizada	1 mL

Elaboración:

Disolver y homogeneizar APS en agua desionizada, almacenar a -20 °C.

- **Buffer de carga.**

Formulación	Para 9.5 mL de preparación
0.5M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 mL
Glicerol (Sigma)	2.5 mL
SDS 10 % (w/v)	2.0 mL
Azul de bromofenol 0.5 % (w/v)	0.2 mL
Agua desionizada	3.55 mL

A 950 μ L de buffer de carga adicionar 50 μ L de β -mercaptoetanol (Sigma) antes de utilizar.

Diluir la muestra al menos 1:2 con el buffer de carga.

Elaboración:

Disolver y homogeneizar 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, glicerol y agua desionizada.

Adicionar a la mezcla la solución de SDS 10 % (w/v), agitando suavemente.

Adicionar azul de bromofenol 0.5 % (w/v), realizar alícuotas y adicionar β -mercaptoetanol. Almacenar a 4 °C.



- **10x Buffer de corrida o tanque desnaturante, pH 8.3.**

Formulación	Para 1 L de preparación
Tris base (Biorad)	30.3 g
Glicina (Biorad)	144.0 g
SDS (Biorad)	10.0 g
Agua desionizada	1 L

Elaboración:

Adicionar poco a poco la glicina en aproximadamente 800 mL de agua desionizada hasta disolver por completo.

Adicionar tris base hasta disolverlo y llevar el volumen a 1 L con agua desionizada.

Una vez ajustado el volumen adicionar espátula a espátula SDS hasta disolverlo por completo, almacenar a 4 °C.

- **Marcador de bajo peso molecular.**

Formulación	Para 60 µL de preparación
SDS PAGE STD Low range (Biorad)	3 µL
Buffer de carga	57 µL

Elaboración:

Adicionar y mezclar SDS PAGE Low range con buffer de carga desnaturante, calentar solución a 95 °C durante 5 minutos y almacenar a -20°C.

- **Solución teñidora de azul de Coomassie.**

Formulación	Para 100 mL de preparación
Azul de Coomassie G-250 (Biorad)	100.0 mg
Metanol (Baker)	25 mL
Ácido acético glacial (Baker)	5 mL
Agua desionizada	70 mL

Elaboración:

Disolver y homogeneizar azul de Coomassie G-250 en metanol, posteriormente adicionar ácido acético glacial y agua desionizada. Almacenar a temperatura ambiente.



- **Solución desteñidora.**

Formulación	Para 100 mL de preparación
Metanol (Baker)	10 mL
Ácido acético glacial (Baker)	10 mL
Agua desionizada	80 mL

Elaboración:

Adicionar y homogeneizar metanol, ácido acético glacial y agua desionizada.

Almacenar a temperatura ambiente.

- **Solución renaturalizante.**

Formulación	Para 100 mL de preparación
Tritón x-100 (Sigma)	5 mL
100 mM buffer de fosfatos de potasio pH 7.5	95 mL

Elaboración:

Disolver y homogeneizar tritón x-100 en 100 mM buffer de fosfatos de potasio pH 7.5.

Almacenar a temperatura ambiente.

- **100 mM buffer de fosfatos de potasio, pH 7.5.**

Formulación	Para 100 mL de preparación
KH_2PO_4	0.23 g
K_2HPO_4	1.45 g
Agua desionizada	100 mL

Elaboración:

Agregar KH_2PO_4 y K_2HPO_4 , disolverlos en agua desionizada, ajustar a pH 7.5.

Esterilizar en autoclave (121 °C / 15 min) y almacenar a 4 °C.

