



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ÁREA ACADÉMICA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“EFECTO DE LA NISINA EN LA INFECCIÓN POR *Staphylococcus aureus*
EN NEUMOCITOS TIPO II”

TESIS

Que para obtener el título de

Médico Veterinario Zootecnista

PRESENTA

FLORES VENEGAS MAGALI BETZABET

DIRECTOR

DRA. NAYELI SHANTAL CASTREJÓN JIMÉNEZ

CODIRECTOR

DR. JUAN CARLOS HERNÁNDEZ GONZÁLEZ

JUNIO 2026



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Agropecuarias

Institute of Agricultural Sciences

Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Academic Area of Veterinary Medicine and Zootecnia

Tulancingo de Bravo, Hidalgo., a 16 junio de 2026

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuly del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar de la UAEH

Por este conducto y con fundamento en el Título Cuarto, Capítulo I, Artículo 40 del Reglamento de Titulación, le comunico que el jurado que le fue asignado al pasante de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia, **Magali Betzabet Flores Venegas** quien presenta el trabajo de Tesis denominado **"Efecto de la nisina en la infección por *Staphylococcus aureus* en neumocitos tipo II"**, que después de revisarlo en reunión de sinodales, ha decidido autorizar la impresión de este, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los miembros del jurado:

DIRECTORA DRA. NAYELI SHANTAL CASTREJÓN JIMÉNEZ

CODIRECTOR DR. JUAN CARLOS HERNÁNDEZ GONZÁLEZ

ASESOR M.C. KARLA CECILIA GRESS MOGICA

ASESOR MVZ. GEBIM LAZCANO HERNÁNDEZ

Sin otro particular por el momento, me despido de usted.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

Dra. Maricela Ayala Martínez
Coordinadora del PEMVZ



"Amor, Orden y Progreso"



Av. Universidad No. 133, Col. San Miguel Huatengo, Santiago
Tulantepec. C.P. 43775. Hidalgo, Mexico.
Teléfono: 7717172000 Ext. 42105
alfonso_munoz@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Virología e Inmunología Investigación, del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección de la Dra. Nayeli Shantal Castrejón Jiménez y el Dr. Juan Carlos Hernández González.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Nayeli Shantal Castrejón Jiménez, por su invaluable apoyo, paciencia, confianza y cariño a lo largo de mi formación académica. Por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto bajo su dirección y de compartir conmigo sus conocimientos, experiencia y enseñanza, que han contribuido a mi crecimiento profesional y personal. Gracias por ser una inspiración y una luz en momentos importantes de mi vida.

Al Dr. Juan Carlos Hernández González, por el apoyo, la confianza y la paciencia que me ha brindado durante este proceso. Agradezco sus consejos, orientación y palabras de aliento, que me motivaron a seguir adelante y fortalecieron mi desarrollo académico y profesional.

A mis compañeros, Maried Garduño, Karla Gress, Cyntia Reyes y Gebim Lazcano, por hacer del laboratorio un lugar agradable. Gracias por su amistad, apoyo y compañía durante la realización de este proyecto, así como por compartir conmigo sus conocimientos, experiencias y palabras de ánimo en cada etapa de este trabajo.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a Olga Peralta y Juan Mondragón, quienes han sido para mí verdaderos padres por elección y por amor. Gracias por acompañarme en mi formación personal y académica. Valoro cada esfuerzo realizado para verme crecer y enseñarme con su ejemplo, el valor de la perseverancia, el trabajo y el amor sincero. Este logro también es para ustedes, porque han sido una parte fundamental de cada paso que he dado.

A Brayan Mondragón, mi esposo, compañero de vida y mi mayor apoyo. Gracias por caminar a mi lado en cada etapa de este camino académico, por celebrar mis triunfos y por sostenerme en momentos difíciles. No existen palabras suficientes para expresar lo agradecida que estoy por tenerte a mi lado ni para describir todo el amor que siento por ti. Este logro también es tuyo, porque tu apoyo ha sido esencial para alcanzarlo.

A Ángel Mondragón, Azul Mondragón, Verónica Venegas, Alisson Venegas y Eduardo Venegas por formar parte de mi vida y acompañarme en cada una de sus etapas. Gracias por su cariño, su apoyo incondicional y las palabras de aliento que me brindaron en los momentos más difíciles. Este logro también es para ustedes.

A mis amigos y compañeros Daniel Melo, Miriam López, Sinaí Bautista, Jessica Monreal, Maried Garduño, Karla Gress, Cyntia Reyes y Gebim Lazcano, por darle un toque especial a mi vida. Gracias por cada sonrisa, por las palabras de ánimo, por su amistad sincera, su respeto, su cariño y por estar presentes en los momentos más importantes de este camino. Su compañía hizo que los desafíos fueran más llevaderos y que cada logro tuviera un significado aún más especial.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIAS.....	v
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.1.1 Características generales.....	4
2.1.2. Factores de virulencia.....	4
2.2 <i>S. aureus</i> puede infectar neumocitos tipo II A549 y causar neumonía.....	11
2.3 Problemática de la resistencia antimicrobiana de <i>S. aureus</i>	12
2.3.1 Definición de resistencia antimicrobiana.....	12
2.3.2 Resistencia antimicrobiana de <i>S. aureus</i>	12
2.3.3. Afectación económica de <i>S. aureus</i> resistente a los antimicrobianos	12
2.4 Alternativas terapéuticas prometedoras para el remplazo de antibióticos	13
2.4.1 Péptidos Antimicrobianos.....	13
2.4.2 Clasificación de las bacteriocinas	13
2.5 <i>Nisina</i>	15
2.5.1 Industria alimentaria	15
2.6 <i>Aplicaciones biomédicas</i>	16
2.6.1 Nisina como antimicrobiano	16
2.6.2 Nisina con efecto anticancerígeno.....	16
2.6.3 Nisina en la microbiota intestinal.....	16
2.6.4 Nisina como inmunomodulador	16
2.7 Mecanismo de acción de la nisina frente a bacterias	17
III. ANTECEDENTES.....	18
IV. JUSTIFICACIÓN	20
V. HIPÓTESIS.....	21
VI. OBJETIVO GENERAL	22

VII.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
VIII.	METODOLOGÍA.....	23
8.1	Líneas celulares	23
8.2	Bacteria.....	23
8.3	Preparación de nisina.....	23
8.4	Suspensión bacteriana de trabajo para concentración mínima bactericida.....	24
8.5	Suspensión bacteriana de trabajo para infección celular.....	24
8.6	Perfil de resistencia y sensibilidad de <i>S. aureus</i> a antimicrobianos.....	24
8.7	Determinación de la concentración mínima bactericida y sobrevida relativa	25
8.8	Monocapas celulares para MTT y NBT	25
8.9	Preparación MTT	26
8.10	Ensayo de viabilidad por el método de MTT	26
8.11	Preparación NBT.....	27
8.12	Ensayo de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)	27
8.13	Infección celular.....	28
8.14	Lisis celular.....	28
8.15	Diluciones para las unidades formadoras de colonia de <i>S. aureus</i> en la infección celular.....	29
8.16	Unidades Formadoras de Colonia.....	29
8.17	Análisis estadístico	29
IX.	RESULTADOS	30
9.1	Perfil de resistencia y susceptibilidad de <i>S. aureus</i> ATCC 29740	30
9.2	Determinación del efecto antimicrobiano y la concentración mínima bactericida de la nisina contra <i>S. aureus</i>	33
9.3	Efecto de la nisina sobre la viabilidad en neumocitos tipo II A549	35
9.4	Efecto de la nisina sobre la replicación bacteriana de <i>S. aureus</i> en neumocitos tipo II A549.....	38
9.5	Efecto de la nisina en la producción de especies reactivas de oxígeno en neumocitos tipo II A549.....	42
X.	DISCUSIÓN	43
XI.	CONCLUSIONES	47
XII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Mecanismo de acción de la nisina en bacterias	17
Figura 2.	Antibiograma de <i>S. aureus</i> ATCC 29740	31
Figura 3.	Efecto de la nisina sobre la sobrevivencia bacteriana de <i>S. aureus</i>	33
Figura 4.	Efecto bactericida de la nisina sobre <i>S. aureus</i> .	34
Figura 5.	Efecto de la nisina sobre la viabilidad de los neumocitos tipo II A549	35
Figura 6.	Micrografías de los neumocitos tipo II A549 tratados con nisina	37
Figura 7.	Efecto antimicrobiano de la nisina sobre la replicación de <i>S. aureus</i> en neumocitos tipo II A549	39
Figura 8.	Micrografías de neumocitos tipo II A549 infectados por <i>S. aureus</i> con nisina	41
Figura 9	Evaluación de especies reactivas de oxígeno mediante la reducción de NBT en neumocitos tipo II A549 tratadas con nisina	42

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	6
Tabla 2.	Clasificación de las bacterias ácido-lácticas	14
Tabla 3.	Antibiograma de <i>S. aureus</i> ATCC 29740	32

ABREVIATURAS

AMPs	Péptidos antimicrobianos
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NBT	Nitroazul de tetrazolio
PBS	Solución salina tamponada con fosfatos
RAM	Resistencia a los antimicrobianos
ROS	Especies reactivas del oxígeno
UFC	Unidades formadoras de colonia

RESUMEN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un problema importante de salud pública que ha impulsado la búsqueda de alternativas terapéuticas como los péptidos antimicrobianos. Los péptidos antimicrobianos son moléculas naturales con actividad antimicrobiana frente a diversos patógenos, incluidos los resistentes a los antibióticos convencionales. *Staphylococcus aureus* es un patógeno oportunista capaz de internalizarse en células epiteliales pulmonares, evadiendo la respuesta inmune y causando infecciones graves. Algunas cepas han mostrado ser resistentes a diversos antibióticos. El objetivo de este estudio fue demostrar el efecto de la nisina, una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*, sobre la infección por *S. aureus* ATCC 29740 en un modelo de neumocitos tipo II A549. Los resultados de este trabajo mostraron que *S. aureus* ATCC 29740 resistente a ampicilina, cefotaxima, dicloxacilina y penicilina; la concentración mínima bactericida (CMB) de la nisina contra *S. aureus* fue de 30 µg/µL y la IC₅₀ de 16.38 µg/µL. En el modelo celular, interesantemente, los ensayos de citotoxicidad y la evaluación de especies reactivas del oxígeno (ROS) demostraron que la nisina no es citotóxica para los neumocitos tipo II A549 y no induce estrés oxidativo a la alta concentración de 300 µg/µL, manteniendo la viabilidad celular cercana a la de las células sin tratamiento. En los ensayos de infección celular, se observó que el tratamiento con nisina redujo significativamente la carga bacteriana de forma dependiente de la concentración. Mientras que a las concentraciones de 200 y 300 µg/µL de nisina se observó ausencia total de colonias viables y no se observaron cambios en la estructura celular de la monocapa. Estos hallazgos sugieren que la nisina es una alternativa terapéutica prometedora y segura para combatir las infecciones pulmonares asociadas a *S. aureus*.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, nisina, neumocitos tipo II, péptidos antimicrobianos, viabilidad celular.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) is a major public health problem that has driven the search for therapeutic alternatives, including antimicrobial peptides. Antimicrobial peptides are naturally occurring molecules with antimicrobial activity against various pathogens, including those resistant to conventional antibiotics. *Staphylococcus aureus* is an opportunistic pathogen capable of internalizing into pulmonary epithelial cells, evading the immune response, and causing serious infections. Some strains have shown resistance to various antibiotics. The aim of this study was to demonstrate the effect of nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*, on *S. aureus* ATCC 29740 infection in an A549 lung epithelial cell model.

The results of this work showed that *S. aureus* ATCC 29740 was resistant to ampicillin, cefotaxime, dicloxacillin, and penicillin. The minimum bactericidal concentration (MBC) of nisin against *S. aureus* was 30 µg/µL, and the IC₅₀ was 16.38 µg/µL. Interestingly, in the cell model, cytotoxicity assays and reactive oxygen species (ROS) assessment demonstrated that nisin is not cytotoxic to type II pneumocytes and does not induce oxidative stress at high concentrations of 300 µg/µL, maintaining cell viability close to that of untreated cells. In cell-based infection assays, nisin treatment significantly reduced the bacterial load in a concentration-dependent manner. At nisin concentrations of 200 and 300 µg/µL, a complete absence of viable colonies was observed, and no changes in the cell monolayer structure were noted. These findings suggest that nisin is a promising and safe therapeutic alternative to combat *S. aureus*-associated lung infections.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, nisin, type II pneumocytes, antimicrobial peptides, cell viability

I. INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es un coco Gram positivo que coloniza múltiples hospederos. La bacteria se considera un patógeno oportunista importante en la medicina humana y veterinaria debido al riesgo que representa al causar infecciones de la piel y de tejidos blandos, así como otras de mayor gravedad, como la osteomielitis, artritis séptica, bacteriemia, septicemia, endocarditis y neumonía (Howden BP *et al.*, 2023; Olanipekun *et al.*, 2025). Estas enfermedades afectan de manera significativa el bienestar animal y generan grandes pérdidas económicas (Haag *et al.*, 2019).

S. aureus es el agente etiológico de la mastitis en bovinos y pequeños rumiantes, una de las enfermedades de mayor impacto económico en la industria lechera. Se estima que, a nivel mundial, las pérdidas asociadas a esta enfermedad oscilan entre 19,7 y 32 millones de dólares anuales, al reducir la producción y la calidad de la leche, al aumentar los costos de tratamiento y al reemplazar animales afectados (Touaitia *et al.*, 2025). Además de la mastitis en bovinos, se asocia también a dermatitis, forunculosis, gastroenteritis, osteomielitis, meningitis, endocarditis, neumonías e infecciones graves en heridas (Tong *et al.*, 2015).

En conejos, las infecciones suelen manifestarse inicialmente como lesiones cutáneas, que pueden progresar a dermatitis, mastitis y abscesos localizados, pododermatitis, piometra y enfermedades respiratorias graves (J. Wang *et al.*, 2021). Asimismo, en aves, es un agente etiológico de la sinovitis, la condronecrosis con osteomielitis, la artritis y la endocarditis (Benrabia *et al.*, 2020). Por otra parte, los perros y los gatos suelen presentar infecciones de la piel y de los tejidos blandos (Haag *et al.*, 2019), mientras que, especialmente en los caballos, la cepa resistente a meticilina está asociada a infecciones de la piel y de los tejidos blandos, bacteremia, artritis séptica, osteomielitis, infecciones relacionadas con implantes, metritis, onfalitis, infecciones relacionadas con catéteres y neumonía (Morgan, 2008). Por otro lado, en humanos, este microorganismo es capaz de causar

infecciones cutáneas y en tejidos blandos, neumonía, endocarditis, osteomielitis, bacteremia y síndrome de choque tóxico (Linz *et al.*, 2023; Tong *et al.*, 2015).

S. aureus se ha asociado con enfermedades respiratorias en diversas especies animales, incluidas conejos, aves, caballos y rumiantes, lo que contribuye a pérdidas productivas (Haag *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021).

A nivel pulmonar, los neumocitos tipo II desempeñan un papel fundamental en la homeostasis del tejido pulmonar, ya que son responsables de la síntesis y secreción del surfactante pulmonar, una sustancia indispensable para reducir la tensión superficial alveolar y prevenir el colapso de los alvéolos durante la respiración. Además, participan en la respuesta inmunitaria innata mediante la producción de citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos, lo que contribuye a los mecanismos de defensa frente a los microorganismos (Barkauskas *et al.*, 2013). Debido a estas funciones, los neumocitos tipo II constituyen una de las líneas de barrera celular frente a los patógenos respiratorios. Un estudio ha demostrado que *S. aureus* puede adherirse, internalizarse y persistir en células epiteliales pulmonares, lo que favorece la recurrencia de infecciones respiratorias tanto en humanos como en animales (Goldman *et al.*, 2024).

Además, uno de los principales desafíos asociados a *S. aureus* es su creciente resistencia a los antibióticos; en particular, se han identificado cepas resistentes a la metilicina y a la vancomicina. También se han reportado cepas resistentes a beta-lactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas y macrólidos (Touaitia R *et al.*, 2025). Este panorama conlleva una reducción de la eficacia de los tratamientos convencionales y limita las opciones terapéuticas disponibles. Esta problemática ha impulsado la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas orientadas a reducir la resistencia a los antibióticos. Entre las alternativas prometedoras se encuentran los bacteriófagos, los probióticos, los prebióticos y los péptidos antimicrobianos de origen bacteriano (bacteriocinas) (Heinzinger *et al.*, 2023).

Los péptidos antimicrobianos son moléculas pequeñas producidas de forma natural por diversos organismos que protegen al huésped frente a microorganismos

patógenos. Estos compuestos presentan actividad antimicrobiana de amplio espectro contra diversos microorganismos, incluyendo bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos y virus (Zhang *et al.*, 2021). Los péptidos antimicrobianos son efectivos contra bacterias multirresistentes y se caracterizan por una baja probabilidad de desarrollar resistencia (Seo *et al.*, 2012).

Dentro de este grupo se encuentran las bacteriocinas, péptidos antimicrobianos termoestables, sintetizados por ribosomas, producidos por un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas que poseen actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos, parásitos, virus e incluso contra estructuras naturales como los biofilms (Hernández *et al.*, 2021). Dentro de la clasificación de las bacteriocinas, se destaca la nisina, un lantibiótico producido por *Lactococcus lactis*, ampliamente utilizado como conservante alimentario por su actividad frente a patógenos transmitidos por alimentos y por su capacidad para inhibir bacterias resistentes a los antibióticos (Charest *et al.*, 2024).

El presente estudio tiene como finalidad evaluar el efecto de la nisina sobre la viabilidad de *S. aureus* y determinar sus efectos en neumocitos tipo II A549 infectados, contribuyendo al conocimiento de nuevas alternativas terapéuticas para el control del patógeno de importancia médica y veterinaria.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 *Staphylococcus aureus*

La bacteria *S. aureus* fue descrita en 1880 por el cirujano Alexander Ogston, quien observó que la infección en heridas quirúrgicas era causada por esta bacteria, al observar un absceso de uno de sus pacientes al microscopio. En el año de 1884, el cirujano alemán Anton J. Rosenbach identificó dos cepas de *Staphylococcus* y las denominó de acuerdo con la pigmentación que producían: *S. aureus*, del latín “*aurum*”, para el pigmento color oro y *Staphylococcus albus*, del latín “*albus*” para el pigmento color blanco (Pasachova *et al.*, 2019).

2.1.1 Características generales

En su morfología microscópica, son cocos Gram positivos en racimos, anaerobios facultativos, inmóviles, oxidasa negativos, no formadores de esporas y catalasa y coagulasa positivos. Mide entre 0,5 y 1,5 μm de diámetro y se caracteriza por presentar una estructura en agrupaciones irregulares, similares a racimos de uvas (Farhab *et al.*, 2021). La pared celular de *S. aureus* consta de una capa gruesa de peptidoglicano y de ácidos teicoicos, que le confieren rigidez y mantienen la forma celular. La membrana celular está compuesta por una bicapa de fosfolípidos que actúa como barrera semipermeable para mantener concentraciones adecuadas de nutrientes y proteger a la bacteria frente a sustancias nocivas, como los antibióticos (Nikolic & Mudgil, 2023).

2.1.2. Factores de virulencia

S. aureus se caracteriza por poseer múltiples factores de virulencia (Tabla 1), que comprenden una amplia variedad de moléculas que la bacteria emplea para invadir

al huésped, evadir la respuesta del sistema inmunológico, formar biopelículas y establecer la infección (D. Wang *et al.*, 2025)

Tabla 1. Factores de virulencia de *S. aureus*

Factor de virulencia	Función	Referencia
Polisacáridos capsulares	Los polisacáridos capsulares es una capa externa de azúcar que envuelve a la bacteria, pueden evadir la fagocitosis de <i>S. aureus</i> por las células del sistema inmune innato como neutrófilos y macrófagos, promoviendo la supervivencia intracelular y reducir la eficacia de agentes antimicrobianos.	(Rao <i>et al.</i> , 2025)
Formación de biopelículas (Biofilm)	<i>S. aureus</i> secreta una sustancia polimérica extracelular (actuando como “pegamento” de proteínas y polisacáridos) que se adhieren a una superficie la cual ayudara a la célula bacteriana a resistir a cambios de temperatura, limitaciones de nutrientes y deshidratación y la protege contra fármacos bacterianos.	(Idrees <i>et al.</i> , 2021)
Componentes de la superficie microbiana que reconocen MSCRAMM		
Proteínas de unión a la fibronectina	Las proteínas de unión a la fibronectina (FnBPs) se expresan en la superficie celular de <i>S. aureus</i> durante su fase exponencial de crecimiento. Las adhesinas FnBPA y FnBPB, se unen a la fibronectina, una glicoproteína que está presente en el plasma sanguíneo y en la matriz extracelular de los tejidos del hospedador. La fibronectina interactúa con la integrina $\alpha 5 \beta 1$ presente en la superficie de las células del hospedador, estableciendo un puente entre la bacteria y la célula hospedadora. Esta interacción favorece la adhesión y colonización bacteriana, además de promover la internalización de <i>S. aureus</i> en células no fagocíticas, por ejemplo, células epiteliales o los osteoclastos. Asimismo, las FnBPs participan en la	(Speziale & Pietrocola, 2020; Pasachova Garzón <i>et al.</i> , 2019; Alkuraythi, 2024)

	formación de biopelículas, lo que contribuye a la persistencia bacteriana y dificulta la eliminación de la infección.	
Proteínas de unión al fibrinógeno (factor a la aglutinación A y B)	El factor de aglutinación de <i>S. aureus</i> , está constituido por proteínas de superficie bacteriana que se unan específicamente al fibrinógeno que es una proteína del plasma sanguíneo presente en el hospedador. Las proteínas del factor de aglutinación A (ClfA) y B (ClfB) facilitan la adhesión de la célula bacteriana a los tejidos del huésped al unirse al fibrinógeno (fg). Esta adhesión permite que <i>S. aureus</i> forme agregados bacterianos, resista a la eliminación inmunitaria y desarrolle infección.	(Alkuraythi, 2024)
Proteína de unión a la elastina	La elastina es una proteína de mayor abundancia en tejidos que requieren elasticidad, como los pulmones, la piel y los vasos sanguíneos. Al unirse a la elastina, se adhiere a los tejidos del huésped, lo que favorece el inicio de una infección.	(Downer <i>et al.</i> , 2002)
Proteína de unión al colágeno (Cna)	La proteína de unión a la bacteria permite a <i>S. aureus</i> adherirse al colágeno presente en tejidos del huésped, como el cartílago, el hueso, las articulaciones y las válvulas cardíacas. La Cna está asociada en enfermedades como endocarditis, artritis, osteomielitis, queratitis y mastitis.	(Ross <i>et al.</i> , 2012)
Toxinas extracelulares		
Hemolisinas α	La hemolisina- α forma poros en la membrana conllevando a una lisis en las células del huésped principalmente queratinocitos, células endoteliales, monocitos, linfocitos T y plaquetas.	(Seilie & Bubeck Wardenburg, 2017)

Hemolisina β	No forma poros en la membrana; cataliza la hidrólisis de la esfingomielina abundante en la capa externa de la membrana plasmática celular, cuya función es la señalización de membrana y de proteínas. La degradación de la esfingomielina conduce a la lisis de eritrocitos y neutrófilos, y a la muerte de linfocitos humanos. Las enfermedades asociadas a la hemolisina β son la queratitis, la mastitis y el daño pulmonar mediado por neutrófilos.	(Jia <i>et al.</i> , 2024; Divyakolu <i>et al.</i> , 2019)
Hemolisina γ	Crea poros en la membrana celular del huésped ocasionando la lisis de eritrocitos. Las enfermedades asociadas a hemolisina γ son artritis séptica y el síndrome de shock tóxico.	(Divyakolu <i>et al.</i> , 2019)
Leucocidina Pantón-Valentine (PVL)	Es una citotoxina extracelular que se une a la membrana de neutrófilos y monocitos, donde se produce la lisis celular. Las enfermedades asociadas con la leucocidina en humanos son forúnculos e infecciones cutáneas, neumonía hemorrágica necrotizante y fascitis necrotizante.	(Hussain <i>et al.</i> , 2022)
Enterotoxinas		
Exfoliativa	Son conocidas como toxinas epidermolíticas, que tienen especificidad para humanos, ratones, monos y hámsteres. Las toxinas exfoliativas son responsables de causar enfermedades como el síndrome de piel escaldada estafilocócica, dermatitis exfoliativa, pénfigo neonatal, enfermedad de Lyell y enfermedad de Ritter. Las toxinas inciden en la desmogleína 1, una glicoproteína importante que mantiene la adhesión célula-a-célula de los queratinocitos en la epidermis superficial.	(Ladhani, 2003)
Toxina del síndrome del	Es una exotoxina proteica, pertenece al grupo de superantígenos. La TSST-1 se une a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II) y a los receptores de linfocitos T, evadiendo el procesamiento del antígeno convencional. Esta interacción altera	(Touaitia, Ibrahim, <i>et al.</i> , 2025)

shock tóxico (TSST-1)	la activación de los linfocitos T, lo que conduce a la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 e IFN- γ . Esta liberación de citocinas causa fiebre alta, hipotensión, erupción cutánea, daño multiorgánico y choque toxico.	
Enzimas		
Coagulasa	Es una proteína extracelular que se une a la protrombina. Causa la coagulación del plasma del huésped, provocando que el fibrinógeno se convierta en fibrina y la fibrina protege a <i>S. aureus</i> de la fagocitosis. Está asociada a enfermedades como la mastitis en animales, la formación de abscesos, la endocarditis y la neumonía.	(Mlynarczyk-Bonikowska & Rudnicka, 2025; Javid <i>et al.</i> , 2018)
Estafilocinasa	La estafilocinasa es un factor de virulencia extracelular que interactúa con el plasminógeno, promoviendo la activación de plasmina, una enzima capaz de degradar la fibrina. Esto favorece a la ruptura de la red de fibrina que rodea al absceso, permitiendo la entrada de <i>S. aureus</i> a tejidos más profundos.	(Bokarewa <i>et al.</i> , 2006)
Hialuronidasa	Es una enzima bacteriana que degrada el ácido hialurónico del huésped. El ácido hialurónico es un disacárido que tiene gran abundancia en la piel, tejido esquelético, el cordón umbilical, pulmones, válvulas cardíacas, el cerebro y otros tejidos.	(Ibberson <i>et al.</i> , 2014)
Lipasa	La lipasa producida por <i>S. aureus</i> es una enzima perteneciente al grupo de las hidrolasas que actúa sobre los ésteres de glicerol. Tiene persistencia en la piel del huésped, ya que hidroliza lípidos, generando ácidos grasos utilizados como nutrientes, lo que permite a <i>S. aureus</i> sobrevivir en zonas sebáceas, y esta colonización se asocia con dermatitis atópica.	(Tanaka <i>et al.</i> , 2018)

Fosfolipasas	La fosfolipasa (β -toxina) actúa hidrolizando el lípido esfingomielina presente en la membrana plasmática en ceramida y fosforilcolina. La β -toxina tiene la capacidad de lisar eritrocitos en ovinos.	(Herrera <i>et al.</i> , 2016)
Proteasas	<i>S. aureus</i> secreta dos tipos de proteasas de cisteína (estapofaína A y estapofaína B) , una proteasa de serina (V8) y una metaloproteínasa (aureolisina), con las que evaden la inmunidad del huésped al interactuar con neutrófilos, proteínas plasmáticas y péptidos antimicrobianos.	(Pietrocola <i>et al.</i> , 2017)

2.2 *S. aureus* puede infectar neumocitos tipo II A549 y causar neumonía

Diversos estudios han descrito que *S. aureus* puede causar neumonía (Wang J. *et al.*, 2019) demostraron que una cepa de *S. aureus*, FZHW001, aislada de conejos muertos, causó signos respiratorios y neumonía severa. Los pulmones de conejos infectados experimentalmente presentaron lesiones respiratorias graves. Además, el patógeno portaba 7 genes de virulencia y se clasificó como sensible a la meticilina (Wang J. *et al.*, 2019). La aparición y diseminación de cepas resistentes de *S. aureus* constituyen un problema de salud pública desde el enfoque “Una sola Salud”, debido a la transmisión potencial de estas cepas entre animales, humanos y el ambiente. Goldmann et al. (2024) investigaron la capacidad de *S. aureus* para colonizar e internalizarse en células epiteliales humanas, utilizando como modelo la línea celular A549, ampliamente empleada como modelo de los neumocitos alveolares tipo II. Los autores demostraron que *S. aureus* es capaz de internalizarse, persistir y multiplicarse intracelularmente en células epiteliales pulmonares observando un aumento significativo en las 2 y 4 h post infección y determinaron que la interacción del factor de virulencia de *S. aureus* α -hemolisina (Hla) y la proteína caveolina-1 presente en la membrana de las células epiteliales es crucial para este proceso de internalización, permitiendo al patógeno evadir la degradación lisosomal y contribuir a la recurrencia de infecciones respiratorias (Goldman *et al.*, 2024).

2.3 Problemática de la resistencia antimicrobiana de *S. aureus*

2.3.1 Definición de resistencia antimicrobiana

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) se define como la capacidad de los microorganismos, como bacterias, virus, hongos y parásitos, de sobrevivir y multiplicarse en presencia de agentes antimicrobianos que anteriormente eran eficaces para inhibirlos o matarlos (OMS, 2023). La problemática de las RAM representa una grave amenaza para la salud pública y animal, principalmente debido al uso no regulado de antimicrobianos en la medicina humana, la industria ganadera y la agricultura (Gonal *et al.*, 2025).

2.3.2 Resistencia antimicrobiana de *S. aureus*

Particularmente, la resistencia antimicrobiana de *S. aureus* a la meticilina (MRSA) asociada al ganado se ha convertido en un riesgo crítico para la salud pública debido a su capacidad de transmisión a los humanos mediante el contacto directo, la cadena alimentaria y el entorno (Moldovan *et al.*, 2026).

2.3.3. Afectación económica de *S. aureus* resistente a los antimicrobianos

S. aureus resistente a los antimicrobianos representa una amenaza económica crítica para la medicina veterinaria y la producción pecuaria a nivel global, debido a su alto impacto en patologías como la mastitis bovina y diversas enfermedades respiratorias. Se estima que la resistencia antibacteriana en el ganado, donde *S. aureus*, contribuirá a una pérdida acumulada del PIB mundial en el sector pecuario de aproximadamente 570,000 millones de dólares para el año 2050, lo que señala al patógeno el impacto en los sistemas de producción, afectación de la seguridad alimentaria y estabilidad económica a nivel global (Forecasting the Fallout from AMR, 2024).

2.4 Alternativas terapéuticas prometedoras para el remplazo de antibióticos

2.4.1 Péptidos Antimicrobianos

Debido al incremento de la resistencia antimicrobiana, existe la necesidad urgente de buscar alternativas terapéuticas naturales con actividad antimicrobiana y con menor capacidad de generar resistencia, en contraste con los antibióticos convencionales. Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son moléculas pequeñas de 12 a 60 aminoácidos, son secretados por diversos organismos; se han obtenido de animales, plantas, insectos e incluso de bacterias y hongos. Estas moléculas son anfifílicas, de naturaleza proteica y sintetizadas por el ribosoma (Olascoaga-Del Angel *et al.*, 2019).

Dentro de este grupo se encuentran las bacteriocinas, péptidos o proteínas bactericidas producidos por bacterias, principalmente ácido-lácticas, y por arqueas. Las bacteriocinas son moléculas catiónicas, cargadas positivamente, producidas por organismos fermentadores, anaerobios facultativos y tolerantes al ácido y son reconocidas como seguras (Darbandi *et al.*, 2022). Las bacterias ácido-lácticas son microorganismos Gram positivos, no formadores de esporas, cocos o bacilos, catalasa negativos, tolerantes a los ácidos y fermentativos, productoras de ácido láctico como principal producto de la fermentación de azúcares (Mokoena, 2017). Las bacteriocinas tienen actividad antimicrobiana y pueden inhibir el crecimiento o provocar la muerte de otras bacterias (Cubillo-Komarovova *et al.*, 2024). Además, presentan un gran potencial como conservador alimentario (Castellanos-Rozo *et al.*, 2022).

2.4.2 Clasificación de las bacteriocinas

Las bacteriocinas se clasifican según sus estructuras primarias, pesos moleculares, modificaciones postraduccionales y características genéticas. No existe una clasificación universalmente aceptada de las bacteriocinas; sin embargo, se reconocen cuatro clases (Tabla 2) (Mokoena, 2017).

Tabla 2. Clasificación de las bacterias ácido-lácticas

Clase	Características principales	Subclases	Organismos productores	Referencia
Clase I (lantibióticos)	Tienen peso molecular inferior a (5 kDa), termoestables. Tiene una alta proporción de aminoácidos como la lantionina y la β -metilantionina.	Clase Ia (lantibióticos) Clase Ib (laberintopeptinas) Clase Ic (sanctibióticos)	<i>*Lactobacillus lactis subsp. lactis</i> <i>*Leuconostoc gelidium</i> <i>*Enterococcus faecium</i> <i>*Lactobacillus helveticus</i>	(Hernández-González <i>et al.</i> , 2021; Mokoena, 2017)
Clase II (no lantibióticos)	Péptidos de bajo peso molecular (<10kDa), de 25 a 70 aminoácidos sin modificar.	Clase IIa (pediocin) Clase IIb (dos péptidos) Clase IIc (cíclicas) Clase IId (lineales de un solo péptido)	<i>*Pediococcus acidilactici</i> <i>*Lactobacillus sakei</i> <i>*Lactococcus lactis</i> <i>*Enterococcus faecalis</i>	(Bédard & Biron, 2018; Bahrami <i>et al.</i> , 2024)
Clase III (péptido no modificado)	Péptidos de alto peso molecular (>30 kDa) y son termolábiles.	Clase IIIa (bacteriolisina) Clase IIIb (no lítica) Clase IIIc (tailocina)	<i>*Bacillus megaterium</i> <i>*Klebsiella pneumoniae</i> <i>*Lactobacillus helveticus</i> <i>*Enterococcus faecalis</i>	(Negash & Tsehai, 2020; Putri <i>et al.</i> , 2024)

2.5 Nisina

La nisina es una bacteriocina polipeptídica, catiónica, hidrofóbica y termoestable perteneciente a la clase I (lantibióticos), y se sintetiza por el ribosoma; es producida por cepas de *Lactococcus lacti* subs. *lactis*, comprende 34 aminoácidos y contiene cuatro aminoácidos: deshidrolanina, deshidrobutirina, lantionina y β -metil-lantionina (Batista *et al.*, 2022). Se caracteriza por incluir aminoácidos con carga positiva, que interactúan con los fosfolípidos con carga negativa de la membrana celular de bacterias susceptibles (Chan *et al.*, 2023).

La nisina fue considerada segura para su uso en alimentos por la FAO y la OMS en 1969, y en 1983 fue aprobada por la FDA como segura para su uso en productos pasteurizados y quesos procesados para inhibir el crecimiento de *Clostridium botulinum* (Jozala *et al.*, 2015). Se caracteriza por un amplio espectro de acción contra bacterias Gram positivas de los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pediococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Mycobacterium* (Małaczewska & Kaczorek-Łukowska, 2021).

El mecanismo de acción de la nisina consta de múltiples etapas que afectan directamente la pared bacteriana, principalmente en bacterias Gram positivas. Inicialmente, se une al lípido II, un precursor esencial de la síntesis del peptidoglicano de la pared celular. Posteriormente, el complejo nisina-lípido II favorece la formación de poros en la membrana citoplasmática, lo que provoca una caída de la fuerza motriz de los protones, la fuga de metabolitos intracelulares y, finalmente, la muerte de la célula bacteriana (Figura 1) (Setiarto *et al.*, 2023).

Aplicaciones de la nisina

2.5.1 Industria alimentaria

La nisina se ha utilizado como conservante natural de alimentos, ya que tiene la capacidad de inhibir infecciones transmitidas por alimentos, incluidas *Listeria*

monocytogenes y *S. aureus*, lo que puede prolongar su vida útil y conservarlos, como en productos lácteos, cárnicos y de pescado (R. Wang *et al.*, 2023).

2.6 Aplicaciones biomédicas

2.6.1 Nisina como antimicrobiano

La nisina es una bacteriocina eficaz como antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas, a concentraciones nanomolares. Se ha reportado que la nisina tiene actividad contra la mastitis, infecciones respiratorias, gastrointestinales y cutáneas tanto en humanos como en animales (Shin *et al.*, 2016). Un estudio demostró que la nisina es altamente efectiva contra *S. aureus* y *Streptococcus agalactiae* en infusiones intramamarias en bovinos con mastitis subclínica causada por dichos agentes, donde se logró un alto índice de recuperación superior al 90% en estreptococos y se redujo el conteo de células somáticas en la leche (Wu *et al.*, 2007).

2.6.2 Nisina con efecto anticancerígeno

Por otra parte, los péptidos antimicrobianos han demostrado ser agentes prometedores para el tratamiento del cáncer, en los que se han observado efectos citotóxicos de la nisina mediante la inducción de la apoptosis selectiva en células tumorales humanas, incluyendo células de cáncer cervical, hematológico, colorrectal, de piel y hepatocelular (Mohammadi *et al.*, 2024).

2.6.3 Nisina en la microbiota intestinal

La nisina puede influir en la microbiota intestinal y controlar patógenos específicos asociados a enfermedades intestinales crónicas. Recientemente, se evidenció que la nisina, cuando se suplementa en la dieta de las aves de corral, modula de manera beneficiosa la ecología gastrointestinal y mejora el crecimiento (Field *et al.*, 2023).

2.6.4 Nisina como inmunomodulador

Interesantemente, la nisina también puede ejercer un efecto inmunomodulador multifactorial que resulta en combatir infecciones de forma directa, actuando a través de la regulación de citocinas y la modulación de células del sistema inmune innato (monocitos, macrófagos y neutrófilos), así como células del sistema inmune adaptativo (linfocitos B y T) (Tavares *et al.*, 2024).

2.7 Mecanismo de acción de la nisina frente a bacterias

El mecanismo de acción que posee la nisina consta de múltiples etapas, la cual afecta directamente a la integridad de la célula bacteriana, especialmente de bacterias Gram positivas:

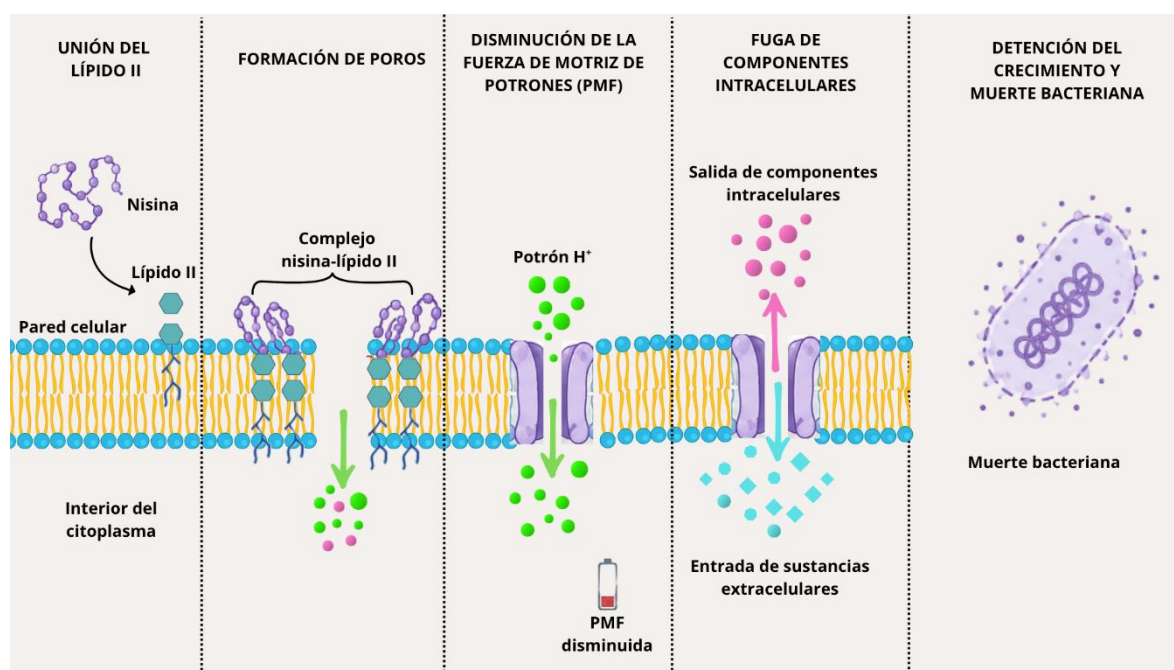


Figura 1. Mecanismo de acción de la nisina en bacterias. Consta de múltiples etapas que afectan la integridad de la célula bacteriana, especialmente en las bacterias Gram positivas. 1. Unión al lípido II: el primer paso fundamental es la formación de un complejo entre la nisina y el lípido II de la pared bacteriana. 2. Formación de poros: el contacto directo de este complejo entre la nisina y el lípido II con la membrana citoplasmática de la célula altera su estabilidad, lo que da lugar a la formación de poros en la membrana. 3. Disminución de la fuerza motriz de los protones (PMF): La formación de estos poros provoca una caída de la PMF, necesaria para el metabolismo celular. 4. Fuga de componentes intracelulares: Debido a la pérdida de la membrana, las moléculas intracelulares se filtran hacia el exterior, mientras que sustancias extracelulares pueden entrar de forma descontrolada a la célula. Esto detiene la capacidad de crecimiento de las células bacterianas sensibles y, finalmente, provoca su muerte (Setiarto *et al.*, 2023).

III. ANTECEDENTES

La nisina es un péptido antimicrobiano perteneciente al grupo de los antibióticos de la clase I, producido por la bacteria Gram positiva de *Lactococcus lactis* (Shin *et al.*, 2016). Este péptido antimicrobiano se ha utilizado en aplicaciones de conservación alimentaria, sin embargo, la investigación de la nisina en los últimos años se ha expandido al campo biomédico, con aplicaciones antimicrobianas, contra el cáncer y en enfermedades bucales (Tavares *et al.*, 2024).

Diversos estudios han reportado el efecto de la nisina como agente antimicrobiano, donde Zhu y colaboradores (2021), reportaron que la nisina posee efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus suis in vitro*, donde determinaron que las CMI fueron de 0.12 µg/mL a 4 µg/mL y las CMB fue de 0.25 µg/mL a 8.0 µg/mL, al igual que observaron mediante la microscopia electrónica que la nisina destruye la integridad de la membrana celular bacteriana de *S. suis*, donde hay fuga de contenido intracelular y lisis celular (Zhu *et al.*, 2021).

Por otro lado, Jensen y colaboradores en el 2020, evaluaron cepas de *S. aureus* pertenecientes a productos alimenticios como son productos de cerdo y pollo, determinaron que la concentración mínima inhibitoria de la nisina fue de 6.4-12.8 µg/mL (Jensen *et al.*, 2020).

Cunha y colaboradores en el 2019, evaluaron las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas de la nisina frente a enterococos aislados en perros con periodontitis, donde los valores de la CMI oscilaron de 8.5 y 26.75 µg/mL y sus valores de la CMB fueron 5 veces superiores a los de la CMI, donde el valor promedio de la CMB fue de 66.63 ± 19.55 µg/mL y un aislado de presento una CMB superior a 100 µg/mL de nisina (Cunha *et al.*, 2018).

Aunque diversos estudios han demostrado la actividad antimicrobiana de la nisina frente a *S. aureus* y otros patógenos Gram positivos, así como su baja citotoxicidad en neumocitos tipo II A549, existe información limitada sobre su efecto en modelos de infección pulmonar por *S. aureus*. En particular, se desconoce si la nisina puede reducir la carga bacteriana asociada a los neumocitos tipo II A549 sin afectar la

viabilidad celular. Por ello, resulta necesario evaluar el efecto de este péptido antimicrobiano en células A549 infectadas por *S. aureus*.

IV. JUSTIFICACIÓN

S. aureus es un patógeno oportunista y zoonótico que puede causar diversas enfermedades, como mastitis bovina, infecciones respiratorias, dermatitis, abscesos, septicemias y enfermedades posquirúrgicas, lo que genera pérdidas económicas importantes y afecta el bienestar animal. Uno de los principales desafíos de esta bacteria es su resistencia a los antibióticos, lo que provoca el fracaso del tratamiento con antibióticos convencionales. Por ello, es necesario buscar alternativas naturales con actividad antimicrobiana y menor posibilidad de desarrollar resistencia. Las bacteriocinas son moléculas sintetizadas de forma ribosomal por bacterias, con actividad antimicrobiana y menor probabilidad de generar resistencia debido a su naturaleza peptídica. Este trabajo busca evaluar la nisina como péptido antimicrobiano con capacidad bactericida contra *S. aureus* y determinar sus efectos en un modelo de neumocitos tipo II A549 infectados. Los resultados permitirán generar conocimiento sobre nuevas alternativas terapéuticas para el control de patógenos de importancia médica y veterinaria.

V. HIPÓTESIS

La nisina inhibe el crecimiento de *S. aureus* y, en neumocitos tipo II A549 infectados, disminuye la sobrevivencia bacteriana, preserva la viabilidad celular y modula la producción de especies reactivas de oxígeno.

VI. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana de la nisina contra *S. aureus* y determinar su efecto sobre la viabilidad celular y la producción de especies reactivas de oxígeno.

VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el perfil de resistencia y susceptibilidad a antimicrobianos de *S. aureus* ATCC 29740.
- Determinar la concentración mínima bactericida de la nisina contra *S. aureus*.
- Evaluar el efecto citotóxico de la nisina en neumocitos tipo II A549 mediante ensayos de viabilidad celular.
- Demostrar el efecto antimicrobiano de la nisina en neumocitos tipo II A549 infectadas por *S. aureus* mediante ensayos de replicación.
- Determinar si la nisina modula la expresión de especies reactivas de oxígeno en neumocitos tipo II A549.

VIII. METODOLOGÍA

8.1 Líneas celulares

La línea celular de neumocitos tipo II A549 (ATCC CLL-185) fue obtenida de tejido pulmonar humano y mantenida a 37 °C y 5% de CO₂ en medio Ham's F12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) suplementado con suero fetal bovino (SFB; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU) al 10% y con una mezcla de antibióticos (10,000 UI/mL de penicilina y 10 mg/mL de estreptomicina; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.).

8.2 Bacteria

En este estudio se utilizó la cepa 29740 de *Staphylococcus aureus*. La bacteria se cultivó en caldo de infusión de cerebro-corazón (BHI; MDC Lab, Ciudad de México, México) hasta alcanzar la fase de crecimiento logarítmica.

8.3 Preparación de nisina

Se preparó la nisina de *Lactococcus lactis* (GoldBio, St. Louis, MO, EE. UU.) a 15 mg/mL en agua bidestilada estéril con 0.05 % de ácido acético, hasta diluir en un microtubo estéril de 1.5 mL, obteniéndose una concentración final de 15 mg/mL. Se hicieron diluciones 1:10, en las que se tomaron 50 µL de la primera dilución de nisina y se colocaron en otro microtubo estéril de 1.5 mL con 450 µL de agua bidestilada estéril y 0.05 % de ácido acético, hasta diluir, obteniendo una concentración de 1.5 µg/µL.

8.4 *Suspensión bacteriana de trabajo para concentración mínima bactericida*

Para preparar la solución bacteriana de trabajo, se tomó 1 mL de bacteria en fase de crecimiento logarítmica en un microtubo estéril de 1.5 mL y se centrifugó en la microcentrífuga a 13,000 rpm durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y el pellet bacteriano se lavó tres veces con solución salina balanceada de Hanks (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Finalmente, se ajustó la bacteria con PBS (Solución salina tamponada con fosfatos) al 0,5 del nefelómetro de McFarland.

8.5 *Suspensión bacteriana de trabajo para infección celular*

En todos los ensayos realizados se utilizó la bacteria en fase de crecimiento logarítmica. Se colocó 1 mL del cultivo bacteriano en un microtubo estéril de 1.5 mL y se centrifugó en la microcentrífuga a 13,000 rpm durante 5 min; se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet bacteriano con solución salina balanceada de Hanks. Después de realizar tres lavados con Hanks, el pellet bacteriano se suspendió en PBS hasta ajustar la turbidez al número 1 del nefelómetro de McFarland.

8.6 *Perfil de resistencia y sensibilidad de S. aureus a antimicrobianos*

La sensibilidad antimicrobiana de la cepa *S. aureus* ATCC 29740 se determinó mediante la técnica de difusión en agar (Kirby-Bauer), siguiendo los criterios estandarizados del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Se utilizó la suspensión bacteriana ajustada con PBS al estándar 0.5 del nefelómetro de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL). Posteriormente, se realizó una siembra en la superficie de placas de agar Mueller-Hinton (BD Bioxon®, México) con un hisopo

estéril. Posteriormente se colocaron discos de antibióticos del sistema comercial Multibac I.D para bacterias Gram positivas (PT34®, México), los cuales fueron colocados individualmente. Se incubaron en condiciones aerobias a 35 °C durante 18 h.

8.7 Determinación de la concentración mínima bactericida y sobrevida relativa

Para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) de nisina frente a *S. aureus*, se emplearon 7.5×10^6 bacterias, las cuales fueron tratadas a distintas concentraciones del péptido antimicrobiano (12.5, 25, 30 y 40 µg/mL). Se incluyeron bacterias sin tratamiento como control positivo y bacterias inactivadas por calor como control negativo. El ensayo se realizó en microtubos de 1.5 mL, en los que se añadieron 150 µL de caldo BHI y 50 µL de la suspensión bacteriana ajustada a 0.5 del nefelómetro de McFarland. Los microtubos se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se sembraron 10 µL de cada condición en agar BHI. El crecimiento bacteriano se evaluó mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) en un espectrofotómetro (BioTek Instruments, Winooski, VT, EE. UU.) y se determinó el porcentaje de viabilidad bacteriana utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{Viabilidad} = \frac{DO_{600, \text{tratamiento}}}{DO_{600, \text{control}}} \times 100$$

8.8 Monocapas celulares para MTT y NBT

A botellas de cultivo celular confluentes se les retiró el medio de cultivo, se les adicionaron 2 mL de verseno-tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 5 min. Las células desprendidas se transfirieron a tubos estériles de 15 mL y se les agregó medio F12, con el mismo volumen de verseno-tripsina utilizado. La suspensión celular se centrifugó a 1500

rpm durante 5 min. El botón celular se resuspendió en un volumen conocido de F12. Se tomó una alícuota de las células; posteriormente, se tiñeron con azul tripano al 0.4 % y se cuantificaron en una cámara de Neubauer. Se colocaron 40,000 células por pozo en una placa de cultivo celular de 96 pozos. Las monocapas se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 h y a cada pozo se le colocaron las concentraciones de 12.5, 25, 30, 40, 60, 100, 200 y 300 µg/mL de nisina posteriores a las 24 h. Para el control negativo se agregó ácido ursólico a una concentración de 10 µg/µL.

8.9 Preparación MTT

Se preparó una solución de stock de MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (Gold Biotechnology, St. Louis, MO, EE. UU.) a 5 mg/mL en solución de Hanks. La solución se disolvió por completo, se esterilizó por filtración a través de una membrana de nylon de 0.22 µm, se cubrió de la luz y se conservó refrigerada a 4 °C.

8.10 Ensayo de viabilidad por el método de MTT

Para determinar la viabilidad celular, se realizaron monocapas celulares en placas de 96 pozos con una densidad de 40,000 células por cada pozo y se incubaron por 24 h para su adhesión. Posteriormente, se adicionaron diferentes concentraciones de nisina: 12.5, 25, 30, 40, 60, 100, 200 y 300 µg/mL por triplicado. Como control negativo, se emplearon células sin tratamiento y, como control positivo, células tratadas con 5 µL ácido ursólico (10 µg/µL). Posteriormente, las monocapas celulares se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, el medio de cultivo se desechó para eliminar la nisina, se añadieron 50 µL de MTT (5 mg/mL) y se incubó durante 3 h. Al finalizar el tiempo de incubación, se retiró el MTT, se adicionaron 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido, Bio Basic Inc.,

Canadá) y se resuspendió uniformemente en cada pozo. Finalmente se registró la lectura de la placa en el espectrofotómetro (BioTek Instruments, Winooski, VT, EE. UU.) a una longitud de onda de 490 nm (DO_{490}). Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad celular con respecto al control negativo, con la siguiente fórmula:

$$\%Viabilidad = \frac{DO_{490, tratamiento}}{DO_{490, control}} \times 100$$

8.11 Preparación NBT

Se preparó en oscuridad una solución de NBT (nitroazul de tetrazolio) MCE (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, EE. UU.) a 1.6 mg/mL en solución de Hanks; una vez solubilizada, se filtró a través de una membrana de 0.22 μ m para esterilizarla. Una vez estéril, el NBT se cubrió con luz y se conservó a 4 °C.

8.12 Ensayo de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para determinar ROS mediante el método de NBT, se realizaron monocapas celulares en placa de 96 pozos con una densidad de 40,000 células por pozo, las cuales se incubaron por 24 h para su adhesión. Posteriormente, las células se trataron con 12.5, 25, 30, 40, 60, 100, 200 y 300 μ g/mL de nisina y como control positivo se utilizaron células sin tratamiento. Las placas se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 h. Después del periodo de incubación, se retiró el medio de cultivo para eliminar los restos de nisina y se agregó 100 μ L de NBT a cada pozo y se incubó por 45 minutos a 37° C y 5 % de CO₂. Posteriormente, se retiró el NBT y se realizaron 2 lavados con solución salina Hanks estéril, y se adicionaron 108 μ L de KOH y 92 μ L de DMSO (Bio Basic Inc., Canadá) y se resuspendió de manera uniforme en cada pozo para solubilizar los cristales de formazán. Finalmente, la

placa se leyó en el espectrofotómetro (BioTek Instruments, Winooski, VT, EE. UU.) a 630 nm (DO₆₃₀). Los resultados se normalizaron con respecto al grupo control para obtener las unidades relativas de ROS, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$ROS(\text{unidades relativas}) = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del control}}$$

8.13 Infección celular

Se realizaron monocapas en una placa de cultivo celular de 24 pozos con una densidad de 250,000 células por pozo. Tras 24 h de incubación a 37 °C con 5 %, la monocapa se lavó 3 veces con solución salina de Hanks estéril para eliminar células no adheridas; posteriormente, a cada pozo se le adicionaron 500 µL de la suspensión bacteriana a una multiplicidad de infección (MOI) de 1:10 en medio F12 con 1 % de SFB y sin antibióticos. Las células se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ y se siguió la cinética de infección durante 3 h. Después de 3 h de infección, se lavaron con solución de Hanks tres veces en cada pozo y se agregaron 500 µL de medio F12 (suplementado con 1 % de SFB) y cada una de las concentraciones de nisina: 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 y 300 µg/mL.

8.14 Lisis celular

Tras 24 h del tratamiento de las células infectadas con nisina, se realizaron 3 lavados con solución de Hanks en cada pozo. Posteriormente, se agregaron 500 µL de SDS al 0.25 % y 500 µL de albúmina al 4 %. Cada lisado se colocó en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 mL y se guardó a -20 °C para su posterior sembrado.

8.15 Diluciones para las unidades formadoras de colonia de *S. aureus* en la infección celular

Se realizaron diluciones seriadas a partir de los lisados de las células infectadas. Se realizaron diluciones seriadas 1:10. Se tomaron 20 μ L del lisado y 180 μ L de PBS; esta es la dilución 10^{-1} . Después, se tomaron 20 μ L de la dilución 10^{-1} y se diluyeron en 180 μ L de PBS; esta fue la dilución 10^{-2} . Finalmente, se tomaron 20 μ L de la dilución 10^{-1} y se diluyeron en 180 μ L de PBS; esta es la dilución 10^{-3} .

8.16 Unidades Formadoras de Colonia

El conteo de unidades formadoras de colonia se realizó en placas de agar BHI, se sembraron por la técnica de microgoteo 10 μ L de cada dilución por duplicado. Las placas se incubaron durante 24 horas y se realizó el conteo celular de cada condición experimental al microscopio estereoscópico.

8.17 Análisis estadístico

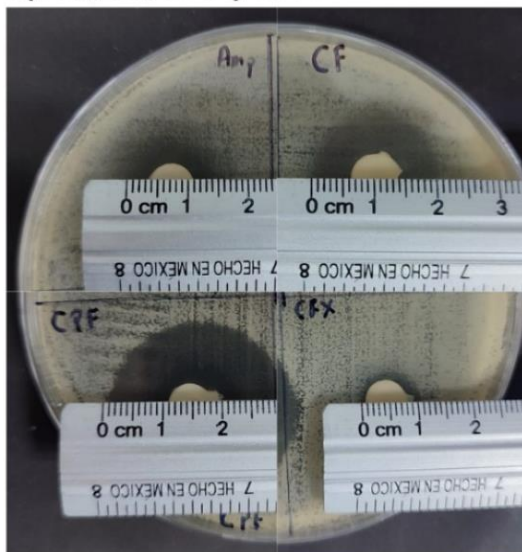
El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, aplicado a los ensayos de concentración mínima bactericida (CMB), citotoxicidad (MTT), producción de especies reactivas de oxígeno (NBT) y cuantificación de unidades formadoras de colonia (UFC) en el modelo de infección de neumocitos tipo II A549 por *Staphylococcus aureus*. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0 (64-bit; GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.), considerando diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

IX. RESULTADOS

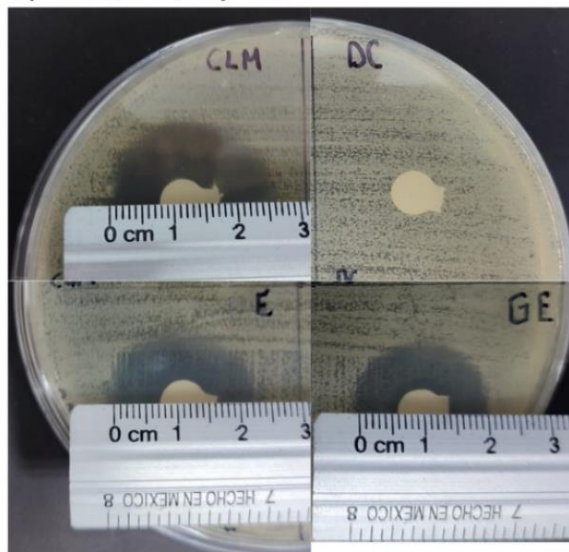
9.1 Perfil de resistencia y susceptibilidad de *S. aureus* ATCC 29740

Para conocer el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de *S. aureus* ATCC 29740 frente a diferentes antibióticos, se realizaron ensayos mediante el método de difusión en disco (Kirby-Bauer). Los resultados muestran que *S. aureus* ATCC 29740 es resistente a ampicilina, cefotaxima, dicloxacilina y penicilina. De acuerdo con el perfil de resistencia antimicrobiana, *S. aureus* ATCC 29740 puede clasificarse como una cepa resistente a los antibióticos β -lactámicos. Mientras que es sensible a ciprofloxacina, tetraciclina, clindamicina, eritromicina, cefalotina, sulfas/trimetoprima, gentamicina y vancomicina (Figura 2). Lo que indica que no presenta un perfil de multirresistencia.

A) AM, CF, CPF y CFX



B) CLM, DC, E y GE



C) PE, TE, STX y VA

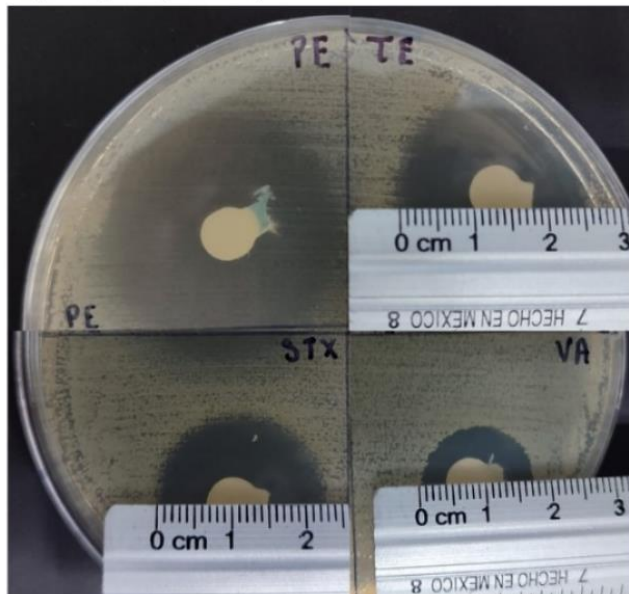


Figura 2. Antibiograma de *S. aureus* ATCC 29740. Se inocularon placas de agar Mueller–Hinton con una suspensión bacteriana de 1.5×10^8 UFC/mL de *S. aureus* ATCC 29740. Posteriormente, se colocaron discos de 12 antibióticos diferentes y las placas se incubaron durante 18 h. A) Halos de inhibición de los antibióticos ampicilina (AM), cefalotina (CF), ciprofloxacina (CPF) y cefotaxima (CFX). B) Halos de inhibición de los antibióticos clindamicina (CLM), dicloxacilina (DC), eritromicina (E) y gentamicina (GE). C) Halos de inhibición de los antibióticos penicilina (PE), tetraciclina (TE), sulfas/trimetoprim (STX) y vancomicina (VA). Se observa ausencia de halo para penicilina (PE) y doxiciclina (DC). En los antibióticos cefotaxima (CFX) y ampicilina (AM) se observa un halo de inhibición reducido de 11 mm y 16 mm, respectivamente. Las imágenes mostradas corresponden a uno de dos ensayos independientes realizados bajo las mismas condiciones experimentales.

Los halos de inhibición correspondientes a los antibióticos a los que la cepa fue susceptible oscilaron entre 16 y 30 mm, en contraste con los antibióticos resistentes, en los cuales no se observó halo de inhibición o este fue ≤ 16 mm (Tabla 3).

Tabla 3. Antibiograma de *S. aureus* ATCC 29740

Antibiótico	Abreviatura	Halo (mm)	Interpretación
Ciprofloxacina	CPF	31 ± 0	Sensible (S)
Tetraciclina	TE	30 ± 0	Sensible (S)
Clindamicina	CLM	28 ± 8	Sensible (S)
Eritromicina	E	25 ± 2	Sensible (S)
Cefalotina	CF	21.5 ± 0.5	Sensible (S)
Sulfas/Trimetoprima	STX	24 ± 8	Sensible (S)
Gentamicina	GE	21.5 ± 0.5	Sensible (S)
Vancomicina	VA	17 ± 2	Sensible (S)
Ampicilina	AM	16 ± 0	Resistente (R)
Cefotaxima	CFX	13.5 ± 12.5	Resistente (R)
Dicloxacilina	DC	0 ± 0	Resistente (R)
Penicilina	PE	0 ± 0	Resistente (R)

9.2 Determinación del efecto antimicrobiano y la concentración mínima bactericida de la nisina contra *S. aureus*

Para determinar el efecto antimicrobiano de la nisina y la CMI de *S. aureus*, las bacterias fueron tratadas con 12.5, 25, 30 y 40, $\mu\text{g/mL}$ de nisina. Los resultados mostraron una reducción significativa del crecimiento bacteriano desde la concentración más baja de 12.5 $\mu\text{g/mL}$ en comparación con el control no tratado. Además, se evidenció que el efecto de la nisina sobre el crecimiento de *S. aureus* depende de su concentración, ya que el crecimiento bacteriano disminuye gradualmente a medida que aumenta dicha concentración. El análisis de concentración-respuesta permitió calcular la concentración inhibitoria al 50 % (IC50) de 16.38 $\mu\text{g/mL}$ la cual reduce el 50% del crecimiento bacteriano (Figura 3). Asimismo, a 30 $\mu\text{g/mL}$ se observó ausencia de crecimiento bacteriano en placa, lo que sugiere una actividad bactericida de la nisina frente a *S. aureus* (Figura 4).

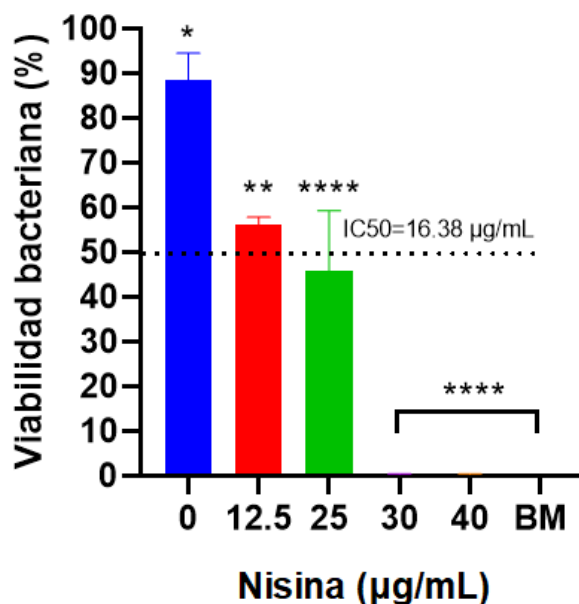


Figura 3. Efecto de la nisina sobre la sobrevivencia bacteriana de *S. aureus*. Se incubaron 7.5×10^6 UFC/mL de *S. aureus* con diferentes concentraciones de nisina (12.5, 25, 30, 40, 60, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$), bacteria muerta (BM) a 7.5×10^6 UFC/mL (control positivo) y sin tratamiento (control negativo). La IC50 fue de 16.38 $\mu\text{g/mL}$. Los datos se presentan como la media $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al grupo de control no tratado ($p < 0.05$; **** $p < 0.0001$).

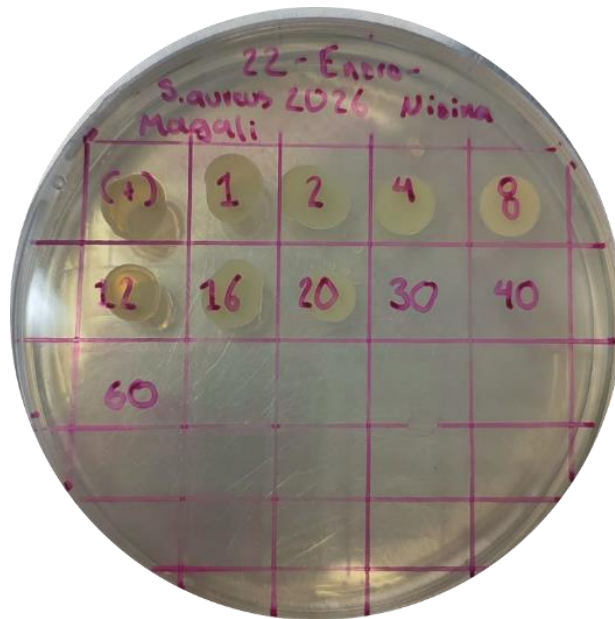


Figura 4. Efecto bactericida de la nisina sobre *S. aureus*. Se trataron 7.5×10^6 UFC/mL de *S. aureus* con diferentes concentraciones de nisina (12.5, 20, 25, 30, 40 y 60 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 h. Tras el tratamiento, las bacterias se sembraron en agar BHI y se incubaron durante 24 h para evaluar el crecimiento bacteriano. La imagen corresponde a un experimento representativo de tres ensayos independientes.

9.3 Efecto de la nisina sobre la viabilidad en neumocitos tipo II A549

Para evaluar si el tratamiento con nisina provoca un efecto citotóxico, se cultivaron neumocitos tipo II A549 en diferentes concentraciones de nisina (12.5, 25, 30, 40, 60, 100, 200 y 300 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados evidenciaron que la nisina no presenta efecto citotóxico, incluso a las concentraciones más altas. El porcentaje de viabilidad celular en todos los tratamientos se mantuvo cercano al de las células sin tratamiento, sin presentar una disminución significativa respecto al control de citotoxicidad (células tratadas con ácido ursólico) (Figura 5).

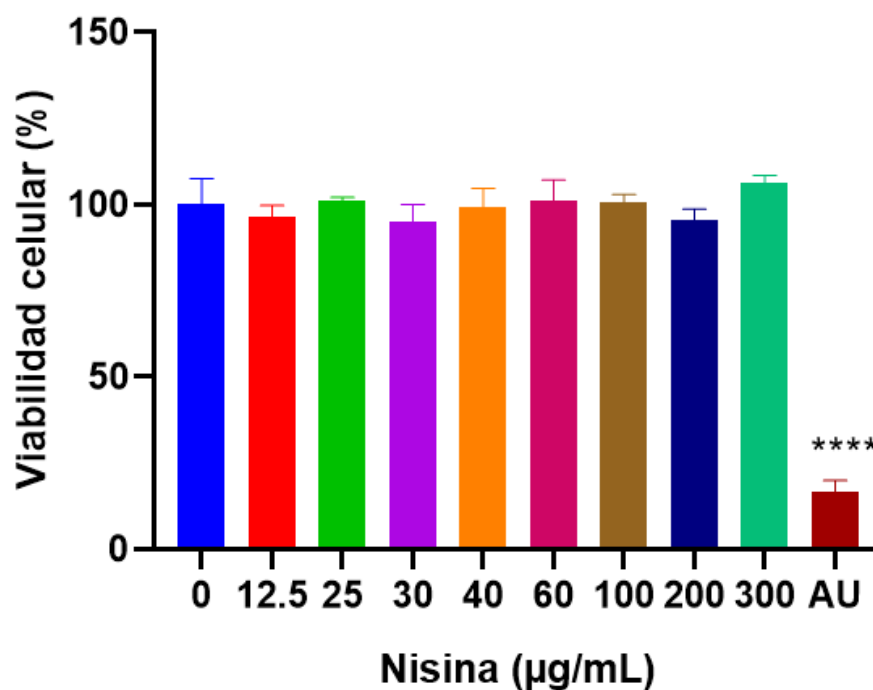


Figura 5. Efecto de la nisina sobre la viabilidad de los neumocitos tipo II A549. Se trataron 40,000 neumocitos tipo II A549 con diferentes concentraciones (12.5, 25, 30, 40, 60, 100, 200 y 300 $\mu\text{g/mL}$); como control negativo se utilizaron células sin tratamiento y como control positivo de citotoxicidad, células tratadas con ácido ursólico (AU). Los datos representan la media $\pm$ el error estándar de la media de los tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los asteriscos (****) indican diferencias significativas respecto al control positivo ($p < 0.0001$).

Para evidenciar los efectos microscópicos de la nisina sobre la morfología y la integridad de la monocapa celular, se obtuvieron micrografías de células tratadas con diferentes concentraciones del péptido antimicrobiano. Interesantemente, los resultados demostraron que las células tratadas con nisina, desde la concentración más baja (12.5 $\mu\text{g/mL}$) hasta la más alta (300 $\mu\text{g/mL}$), conservaron una monocapa confluyente, sin pérdida de continuidad celular, de la adherencia ni de alteraciones morfológicas. Las células se observaron alargadas, con morfología fusiforme, sin cambios respecto de las células sin tratamiento (Figura 6A-6I). En contraste, en las células tratadas con AU (control de citotoxicidad), estas se encuentran redondeadas, desprendidas y con una disminución de la confluencia celular (Figura 6J).

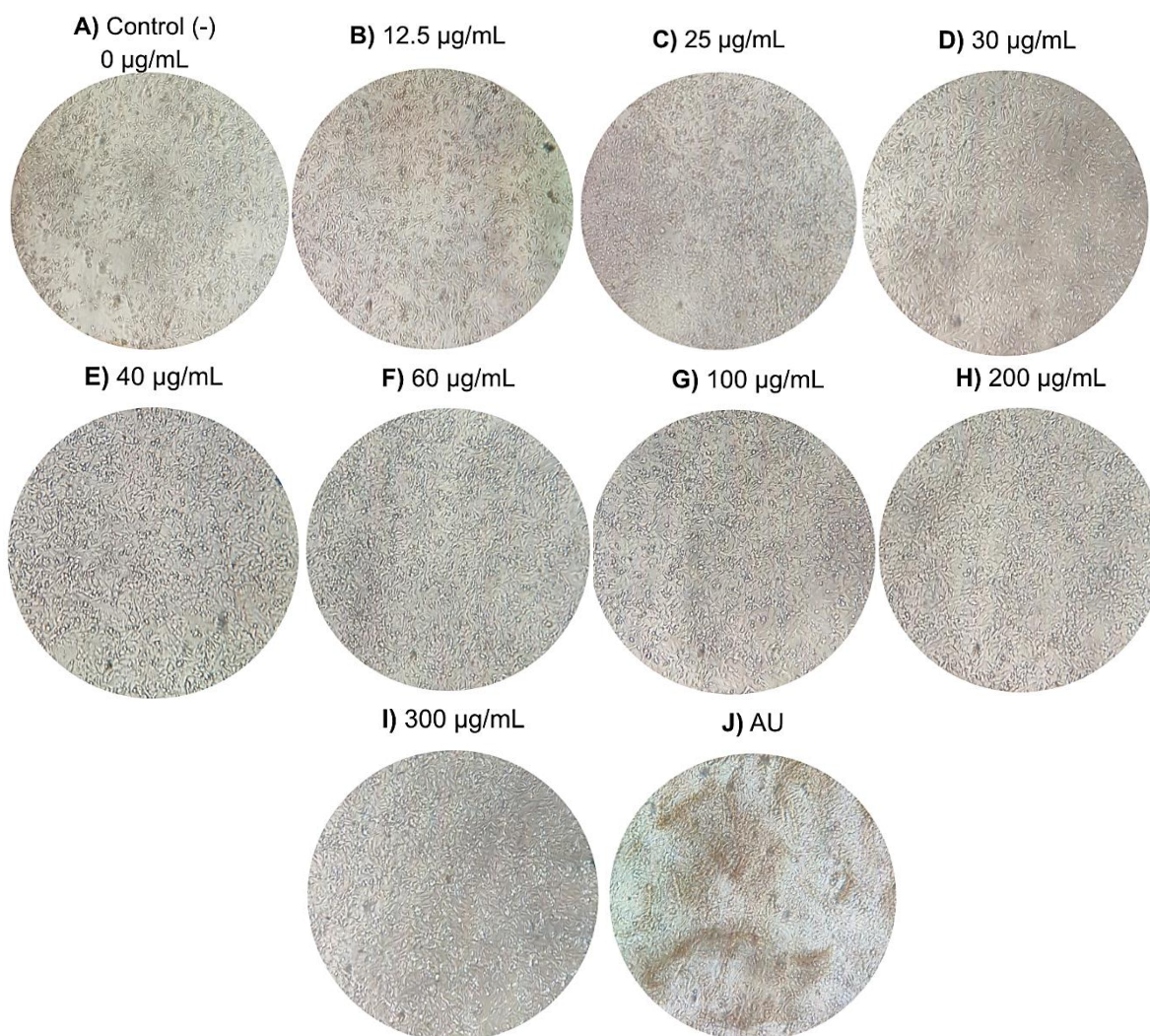


Figura 6. Micrografías de los neumocitos tipo II A549 tratados con nisina. Se cultivaron neumocitos tipo II A549 en monocapa y se expusieron a diferentes concentraciones de nisina: A) células sin tratamiento (control negativo), B) 12.5 µg/mL, C) 25 µg/mL, D) 30 µg/mL, E) 40 µg/mL, F) 60 µg/mL, G) 100 µg/mL, H) 200 µg/mL, I) 300 µg/mL y J) ácido ursólico (AU; 10 µg/µL) control de citotoxicidad (control positivo). Las micrografías se capturaron con un microscopio invertido a un aumento de 20x. Las imágenes corresponden a un experimento representativo de tres ensayos independientes.

9.4 Efecto de la nisina sobre la replicación bacteriana de *S. aureus* en neumocitos tipo II A549

Para determinar el efecto antimicrobiano de la nisina en un modelo de neumocitos tipo II infectados por *S. aureus*, se realizaron ensayos de replicación. Las células se infectaron por 3 h y se trataron con 12.5, 25, 50, 100, 200 y 300 µg/mL de nisina durante 24 h. Los resultados demostraron que el tratamiento con el péptido antimicrobiano redujo significativamente la carga bacteriana de *S. aureus* en neumocitos tipo II A549 infectadas. El tratamiento con nisina disminuyó marcadamente la carga bacteriana desde la concentración más baja (12.5 µg/mL) y, a partir de 50 µg/mL, las unidades formadoras de colonia descendieron a valores cercanos a 0. A concentraciones de 200–300 µg/mL no se cuantificaron colonias viables. Por el contrario, las células sin tratamiento presentaron una carga bacteriana de hasta 10^6 UFC/mL (Figura 7). Los resultados demostraron que la nisina puede contribuir a la reducción de la carga bacteriana a partir de las concentraciones más bajas, y eliminar al patógeno sin comprometer la viabilidad de los neumocitos tipo II A549.

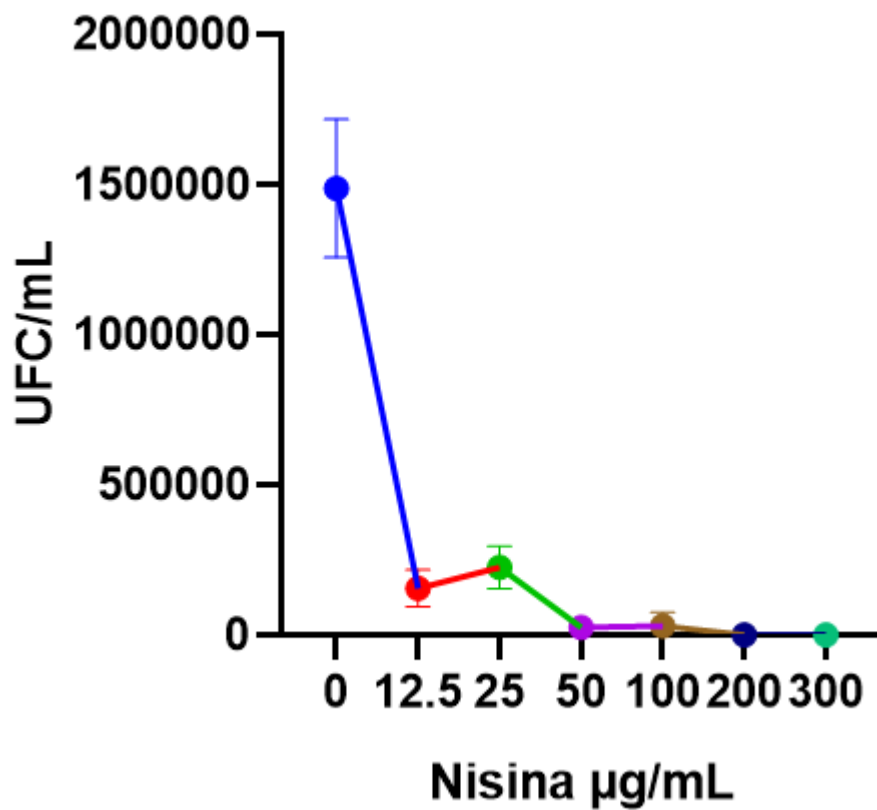


Figura 7. Efecto antimicrobiano de la nisina sobre la replicación de *S. aureus* en neumocitos tipo II A549. Se infectaron 250,000 células de neumocitos tipo II A549 por *S. aureus* durante 3 h. Posteriormente fueron tratadas con nisina (12.5, 25, 50, 100, 200 y 300 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 h. Como control positivo, se utilizaron células infectadas no tratadas. Se evaluó la carga bacteriana mediante el recuento de UFC/mL. Los datos representan la media $\pm$ el error estándar de la media de tres experimentos independientes.

Para corroborar el efecto antimicrobiano microscópico de la nisina sobre la infección celular, se tomaron micrografías con un microscopio invertido a un aumento de 20x (Figura 8). Se observaron cambios morfológicos en los neumocitos tipo II A549 infectadas con *S. aureus*, en contraste con las células tratadas con nisina a las concentraciones de 12.5, 25, 50, 100, 200 y 300 µg/mL.

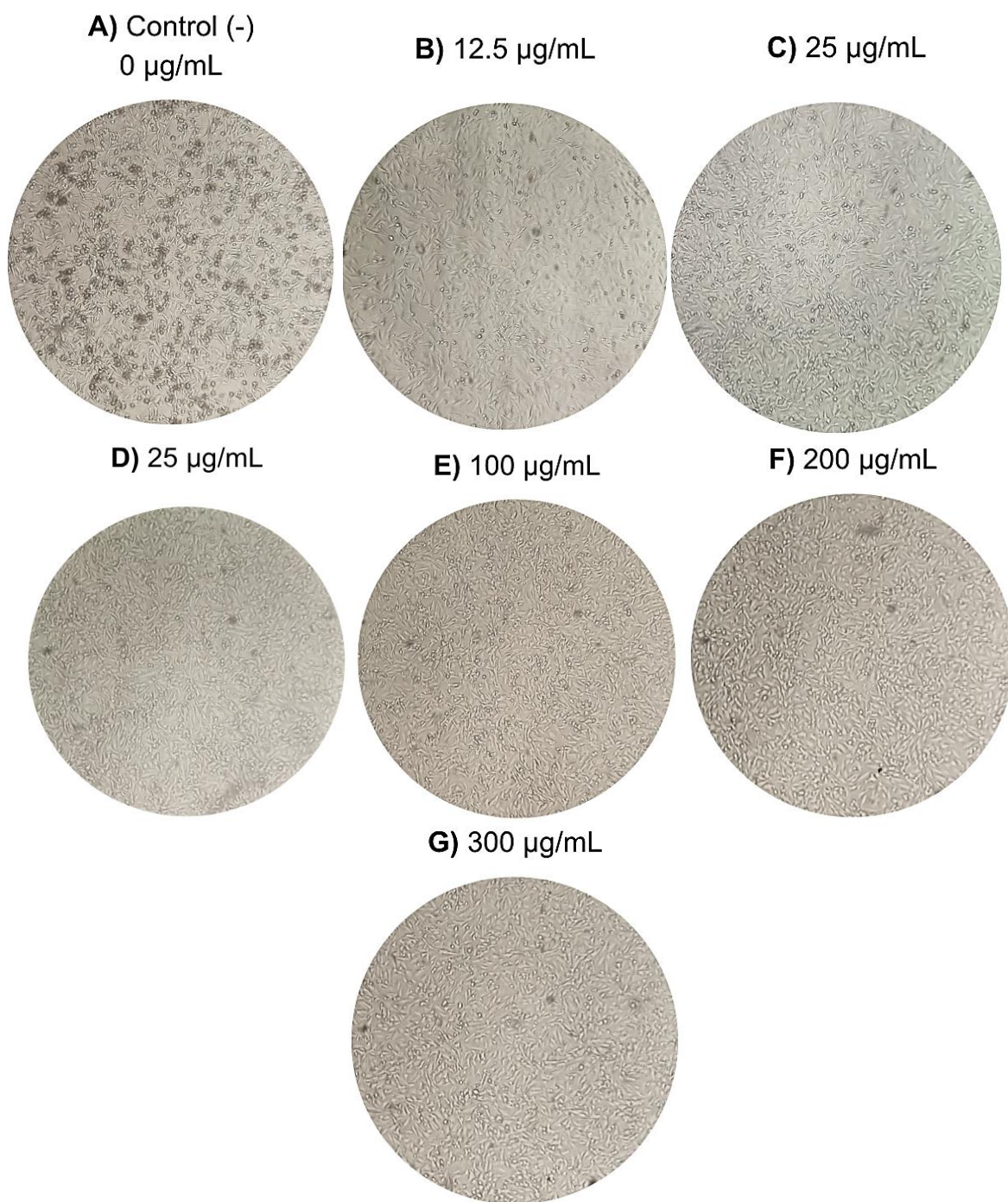


Figura 8. Micrografías de neumocitos tipo II A549 infectados por *S. aureus* y tratadas con nisina. Se infectaron 250,000 neumocitos tipo II A549 por *S. aureus* durante 3 h. Posteriormente fueron tratadas con nisina (12.5, 25, 50, 100, 200 y 300 µg/mL) durante 24 h y se observaron al microscopio 20x. A) Células sin tratamiento (Control negativo), B) 12.5 µg/mL, C) 25 µg/mL, D) 50 µg/mL, E) 100 µg/mL, F) 200 µg/mL y G) 300 µg/mL.

9.5 Efecto de la nisina en la producción de especies reactivas de oxígeno en neumocitos tipo II A549

Para evaluar si la nisina modula la expresión de ROS, y si está podría contribuir a la disminución de la carga bacteriana en el modelo de infección celular, se midió la producción de estos radicales mediante la técnica de NBT. Los resultados mostraron que la nisina no indujo cambios significativos en la producción de ROS en contraste con las células no tratadas, independientemente de la concentración evaluada (Figura 9).

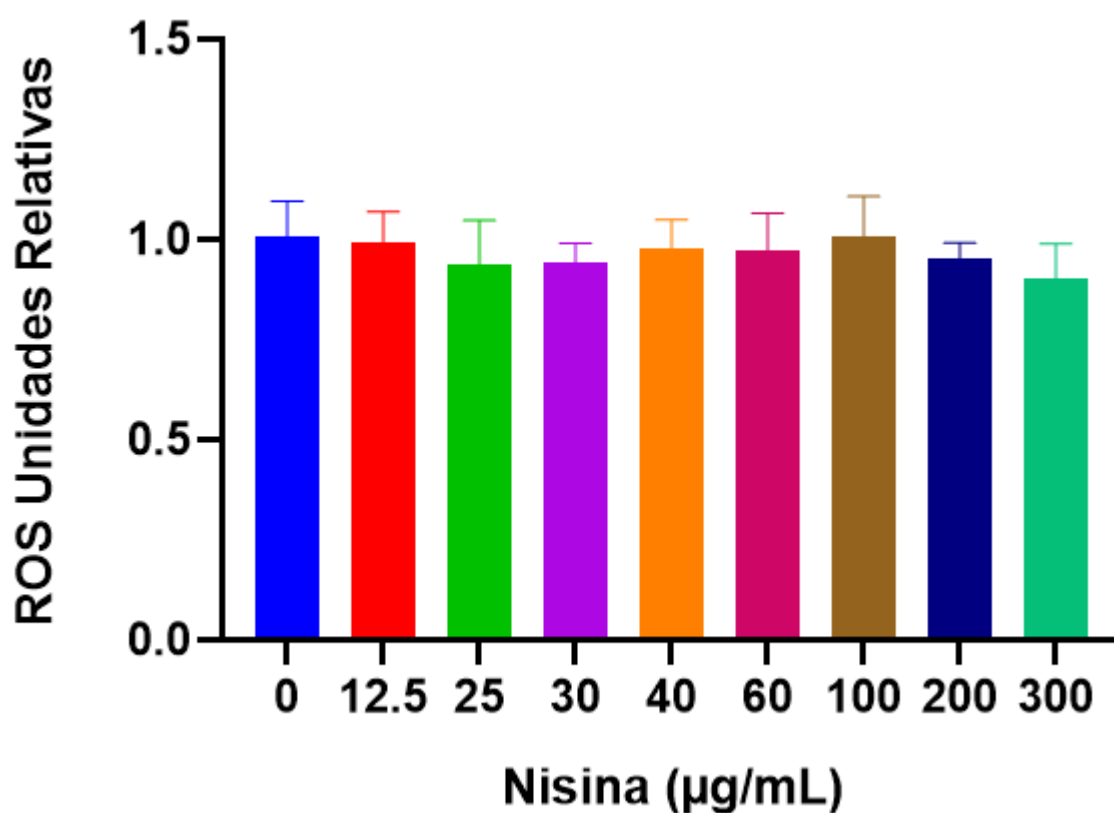


Figura 9. Evaluación de especies reactivas de oxígeno mediante la reducción de NBT en neumocitos tipo II A549 tratadas con nisina. Se trataron 40,000 neumocitos tipo II A549 por pozo con 12.5, 25, 30, 40, 60, 100, 200 y 300 µg/mL de nisina. La producción de ROS se evaluó mediante la reducción de NBT. Los datos expresan la producción relativa de ROS y representan la media $\pm$ el error estándar de la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

X. DISCUSIÓN

S. aureus es una bacteria Gram positiva que puede causar diversas enfermedades en medicina veterinaria y humana. Entre ellas, infecciones de la piel, neumonía, endocarditis, osteomielitis, artritis séptica y bacteriemia (Touaitia, Mairi, et al., 2025). Su efecto patogénico se asocia principalmente a sus factores de virulencia que le permiten al microorganismo evadir el sistema inmunológico del huésped y causar diversas enfermedades (Rasmi et al., 2022). Aunado a lo anterior, la creciente resistencia de algunas cepas de *S. aureus* a diversos antibióticos, incluida la meticilina y otros agentes antimicrobianos, representa un importante problema de salud pública a nivel mundial. Por ello, es necesaria la búsqueda de moléculas naturales con propiedades antimicrobianas como alternativas terapéuticas o como coadyuvantes de los antibióticos convencionales (Barrios Leiva et al., 2025).

Las bacteriocinas son un grupo de péptidos antimicrobianos sintetizados de forma ribosomal y secretados por una gran variedad de bacterias, que inhiben a otras bacterias (Benítez et al., 2021). Entre ellas destaca la nisina, que tiene efecto antimicrobiano principalmente sobre bacterias Gram positivas y es considerada segura por la FAO (Sánchez et al., 2018). En este estudio se evaluó la actividad antimicrobiana de la nisina frente a *S. aureus* ATCC, así como su efecto sobre la viabilidad celular y la producción de especies reactivas de oxígeno en un modelo de infección de neumocitos tipo II A549.

En el presente estudio, la nisina mostró un efecto antimicrobiano dependiente de la concentración contra *S. aureus*, con una disminución progresiva a medida que aumentaba la concentración de nisina. Diversos estudios han evidenciado que la nisina puede inhibir a *S. aureus*; Serrano y colaboradores (2023) evaluaron la eficacia de la nisina Z contra aislados clínicos de *S. aureus* Z25.2 y determinaron que la concentración mínima inhibitoria fue de 5 y 10 µg/mL de nisina Z, y la concentración mínima bactericida se situó entre 10 y 25 µg/mL. En contraste con este estudio, se observó que la CMI fue de 30 µg/mL de nisina; esto puede deberse

a diversos factores, entre ellos la susceptibilidad de los aislamientos de *S. aureus* y el tipo de variante de nisina empleada. Mientras que Serrano et al. utilizaron la nisina Z, en este trabajo se evaluó la nisina A, por lo que las diferencias estructurales entre ambas podrían afectar la interacción con la membrana bacteriana. Aunque ambas moléculas presentan mecanismos de acción similares, la sustitución de histidina por asparagina en la posición 27 de la nisina Z modifica propiedades fisicoquímicas, particularmente la solubilidad y el pH cercano al neutral, factores que pueden afectar su comportamiento antimicrobiano (Shi et al., 2024). Además, otro factor importante es el tamaño del inóculo que también puede contribuir a las variaciones observadas en los valores de CMI y CMB, por lo que Serrano et al. emplearon una suspensión bacteriana aproximada de 107 UFC/mL y en el presente estudio se utilizó un inóculo de 1.5x10⁸ UFC/mL, es decir, una concentración bacteriana quince veces mayor (Serrano et al., 2023).

Estos hallazgos contrastan, por otra parte, con lo reportado por Sánchez-Ceja et al., (2018), quienes reportaron una CMI de 1.75 mg/mL y de 3 mg/mL de la nisina únicamente en 28 de 53 aislados de *S. aureus*, mientras que el resto mostró crecimiento bacteriano aun con la concentración máxima evaluada de 3 mg/mL. No obstante, en la combinación de quitosano (2.75 mg/mL) y nisina (1.7 mg/mL), los autores observaron efectos bactericidas en los 53 aislados.

Por otra parte, para evaluar si la nisina ejerce un efecto citotóxico sobre los neumocitos tipo II A549, se analizaron diferentes concentraciones de nisina. Los resultados evidenciaron que la viabilidad celular no se ve comprometida por el tratamiento con nisina, incluso a una concentración 10 veces mayor (300 µg/mL) que la CMI para *S. aureus*, lo que indica que la nisina es segura al no afectar a los neumocitos tipo II A549 en concentraciones altas (Sánchez-Ceja et al., 2018). Ghapanvari y colaboradores, en el año 2022, evaluaron la citotoxicidad de la nisina mediante el método de MTT en células de fibroblastos de piel (L929), donde observaron que la citotoxicidad de la nisina aumentó de manera dependiente de la concentración; sin embargo, la concentración mínima media (IC₅₀) fue superior a 256 µg/mL, lo que indica una baja citotoxicidad a concentraciones más altas

(Ghapanvari *et al.*, 2022). De manera similar, en el presente estudio, la exposición de neumocitos tipo II A549 en diferentes concentraciones de nisina no produjo una disminución significativa de la viabilidad celular, lo que sugiere que este péptido posee un perfil adecuado de biocompatibilidad.

Interesantemente, la nisina no provocó un aumento significativo de la producción de ROS en los neumocitos tipo II A549 a las concentraciones evaluadas, en comparación con las células no tratadas, lo que indica que este péptido no induce estrés oxidativo en estas condiciones experimentales. Estos resultados difieren de lo reportado por Patil y Kunda (2022), quienes evaluaron el efecto de la nisina ZP (50, 100, 150, 200 μ M) en células A549 y observaron un aumento significativo en la generación de ROS desde las concentraciones más bajas hasta las más altas. Los autores demostraron que el incremento de los niveles de ROS dependió de su concentración, lo cual contribuyó a la despolarización de la membrana y a la inducción de la apoptosis en las células (Patil & Kunda 2022). Las diferencias entre ambos estudios pueden atribuirse a diversos factores experimentales; es posible que la principal sea debida a las concentraciones utilizadas. Considerando el peso molecular aproximado de la nisina (3354 Da), las concentraciones utilizadas por dichos autores corresponderían aproximadamente a un rango de 167.7 a 670.8 μ g/mL. Por lo tanto, las concentraciones más elevadas evaluadas en su estudio fueron superiores a la concentración máxima empleada en el presente trabajo (300 μ g/mL), lo que podría explicar, al menos parcialmente, la ausencia de un incremento significativo en la producción de ROS. La ausencia de un incremento significativo en la producción de ROS concuerda con los resultados de viabilidad celular obtenidos, lo que sugiere que la nisina no ejerce efectos citotóxicos significativos sobre los neumocitos tipo II A549 en el rango de concentraciones evaluado.

Por último, los resultados obtenidos en este estudio muestran que la nisina redujo significativamente la carga bacteriana en neumocitos tipo II A549 infectadas por *S. aureus*, de forma dependiente de la concentración. Se observó una disminución

progresiva de las UFC/mL desde 12.5 µg/mL hasta la ausencia de colonias viables a partir de 200 µg/mL.

En conjunto, los resultados de este trabajo demuestran que la nisina tiene una importante actividad antimicrobiana contra *S. aureus*. Además, el péptido antimicrobiano promueve la disminución de la carga bacteriana en neumocitos tipo II A549 infectados. Asimismo, la nisina no afecta significativamente la viabilidad de los neumocitos tipo II A549 ni induce un incremento de la producción de ROS a las concentraciones evaluadas. Estos hallazgos sugieren que la nisina podría ser una alternativa prometedora para el control de infecciones causadas por *S. aureus*. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales que permitan dilucidar los mecanismos celulares y moleculares implicados en su actividad antimicrobiana, así como evaluar su eficacia en modelos *in vivo* para confirmar su potencial terapéutico.

XI. CONCLUSIONES

La nisina es un péptido con actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, posee actividad bactericida tanto en condiciones extracelulares como intracelulares, sin afectar la viabilidad celular ni inducir estrés oxidativo en los neumocitos tipo II A549. Lo que posiciona a la nisina como un agente antimicrobiano prometedor contra infecciones causadas por este patógeno.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alkuraythi, D. (2024). Virulence Factors and Pathogenicity of *Staphylococcus aureus*. En J. Bustos-Martínez, J. José Valdez-Alarcón, & A. Hamdan-Partida (Eds.), *Infectious Diseases* (Vol. 35). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1006633>
2. Bahrami, S., Andishmand, H., Pilevar, Z., Hashempour-baltork, F., Torbati, M., Dadgarnejad, M., Rastegar, H., Mohammadi, S. A., & Azadmard-Damirchi, S. (2024). Innovative perspectives on bacteriocins: Advances in classification, synthesis, mode of action, and food industry applications. *Journal of Applied Microbiology*, 135(11), lxae274. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxae274>
3. Barkauskas, C. E., Cronce, M. J., Rackley, C. R., Bowie, E. J., Keene, D. R., Stripp, B. R., Randell, S. H., Noble, P. W., & Hogan, B. L. M. (2013). Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(7), 3025–3036. <https://doi.org/10.1172/JCI68782>
4. Barrios Leiva, J. C., Samudio Acevedo, M., Guillén Fretes, R. M., Fariña, N., Vega, A., Pereira Fariña, A., & Rodríguez Acosta, F. (2025). Patrones y tendencias de resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* aislados en un laboratorio privado de Paraguay entre 2020 y 2024. *Medicina Clínica y Social*, 9(1), e598. <https://doi.org/10.52379/mcs.v9.598>
5. Batista-González, A., Muñoz-González, R., Yasky, S., & Contreras, R. A. (2022). Evaluación teórica de la exposición dietaria a la bacteriocina nisina

- como conservante natural para aderezos de tipo mayonesa vegetal en Chile. *Revista Chilena de Nutrición*, 49(4), 494-501. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182022000500494>
6. Bédard, F., & Biron, E. (2018). Recent Progress in the Chemical Synthesis of Class II and S-Glycosylated Bacteriocins. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1048. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01048>
 7. Benítez-Chao, D. F., León-Buitimea, A., Lerma-Escalera, J. A., & Morones-Ramírez, J. R. (2021). Bacteriocins: An Overview of Antimicrobial, Toxicity, and Biosafety Assessment by in vivo Models. *Frontiers in Microbiology*, 12, 630695. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630695>
 8. Benrabia, I., Hamdi, T. M., Shehata, A. A., Neubauer, H., & Wareth, G. (2020). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Poultry Species in Algeria: Long-Term Study on Prevalence and Antimicrobial Resistance. *Veterinary Sciences*, 7(2), 54. <https://doi.org/10.3390/vetsci7020054>
 9. Bokarewa, M. I., Jin, T., & Tarkowski, A. (2006). *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(4), 504-509. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.07.005>
 10. Castellanos-Rozo, J., Galvis López, J. A., Pérez Pulido, R., Grande Burgos, M. J., Lucas, R., & Gálvez, A. (2022). Las bacteriocinas y su efecto sinérgico con tecnologías emergentes en alimentos. *Revista Mutis*, 12(2). <https://doi.org/10.21789/22561498.1841>

11. Chan, K. T., Song, X., Shen, L., Liu, N., Zhou, X., Cheng, L., & Chen, J. (2023). Nisin and its application in oral diseases. *Journal of Functional Foods*, 105, 105559. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105559>
12. Charest, A. M., Reed, E., Bozorgzadeh, S., Hernandez, L., Getsey, N. V., Smith, L., Galperina, A., Beauregard, H. E., Charest, H. A., Mitchell, M., & Riley, M. A. (2024). Nisin Inhibition of Gram-Negative Bacteria. *Microorganisms*, 12(6), 1230. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12061230>
13. Cubillo-Komarovova, P., Ledezma-Acevedo, R., Salazar-Cedeño, V., Murillo-Rodríguez, D., & Stern-Flores, D. (2024). Bacteriocinas y sus aplicaciones: Mini-revisión. *Revista Tecnología en Marcha*. <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7613>
14. Cunha, E., Trovão, T., Pinheiro, A., Nunes, T., Santos, R., Moreira Da Silva, J., São Braz, B., Tavares, L., Veiga, A. S., & Oliveira, M. (2018). Potential of two delivery systems for nisin topical application to dental plaque biofilms in dogs. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 375. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1692-9>
15. Darbandi, A., Asadi, A., Mahdizadeh Ari, M., Ohadi, E., Talebi, M., Halaj Zadeh, M., Darb Emamie, A., Ghanavati, R., & Kakanj, M. (2022). Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(1), e24093. <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>

16. Divyakolu, S., Chikkala, R., Ratnakar, K. S., & Sritharan, V. (2019). Hemolysins of *Staphylococcus aureus*—An Update on Their Biology, Role in Pathogenesis and as Targets for Anti-Virulence Therapy. *Advances in Infectious Diseases*, 09(02), 80-104. <https://doi.org/10.4236/aid.2019.92007>
17. Downer, R., Roche, F., Park, P. W., Mecham, R. P., & Foster, T. J. (2002). The Elastin-binding Protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) Is Expressed at the Cell Surface as an Integral Membrane Protein and Not as a Cell Wall-associated Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 243-250. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107621200>
18. Farhab, M., Tahir Aleem, M., Shaukat, S., Qadry, A., Zeeshan UI Haq, M., Ullah, F., Jawad, M., & Islam Aqib, A. (2021). *Staphylococcus aureus* and the Veterinary Medicine. En A. Aqib (Ed.), *Infectious Diseases* (Vol. 10). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.100202>
19. Field, D., Fernandez de Ullivarri, M., Ross, R. P., & Hill, C. (2023). After a century of nisin research—Where are we now? *FEMS Microbiology Reviews*, 47(3), fuad023. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad023>
20. *Forecasting the Fallout from AMR: Economic Impacts of Antimicrobial Resistance in Food-Producing Animals. A report from the EcoAMR series.* (2024). WOA and World Bank. <https://doi.org/10.20506/ecoAMR.3541>

21. Ghapanvari, P., Taheri, M., Jalilian, F. A., Dehbashi, S., Dezfuli, A. A. Z., & Arabestani, M. R. (2022). The effect of nisin on the biofilm production, antimicrobial susceptibility and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Medical Research*, 27(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s40001-022-00804-x>
22. Goldmann, O., Lang, J. C., Rohde, M., May, T., Molinari, G., & Medina, E. (2024). Alpha-hemolysin promotes internalization of *Staphylococcus aureus* into human lung epithelial cells via caveolin-1- and cholesterol-rich lipid rafts. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 81(1), 435. <https://doi.org/10.1007/s00018-024-05472-0>
23. Gonal, B. N., Dalbanjan, N. P., Kadapure, A. J., Praveen Kumar, S. K., & Arakera, S. B. (2025). Epidemiology, antimicrobial resistance, economic burden and management approaches for *Staphylococcus aureus*-associated bovine mastitis: A systematic review. *Animals and Zoonoses*, S2950248925000884. <https://doi.org/10.1016/j.azn.2025.12.001>
24. Haag, A. F., Fitzgerald, J. R., & Penadés, J. R. (2019). *Staphylococcus aureus* in Animals. *Microbiology Spectrum*, 7(3), 7.3.11. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0060-2019>
25. Heinzinger, L. R., Pugh, A. R., Wagner, J. A., & Otto, M. (2023). Evaluating the Translational Potential of Bacteriocins as an Alternative Treatment for

- Staphylococcus aureus* Infections in Animals and Humans. *Antibiotics*, 12(8), 1256. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12081256>
26. Hernández-González, J. C., Martínez-Tapia, A., Lazcano-Hernández, G., García-Pérez, B. E., & Castrejón-Jiménez, N. S. (2021). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. A Powerful Alternative as Antimicrobials, Probiotics, and Immunomodulators in Veterinary Medicine. *Animals*, 11(4), 979. <https://doi.org/10.3390/ani11040979>
27. Herrera, A., Vu, B. G., Stach, C. S., Merriman, J. A., Horswill, A. R., Salgado-Pabón, W., & Schlievert, P. M. (2016). *Staphylococcus aureus* β -Toxin Mutants Are Defective in Biofilm Ligase and Sphingomyelinase Activity, and Causation of Infective Endocarditis and Sepsis. *Biochemistry*, 55(17), 2510-2517. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00083>
28. Howden, B. P., Giulieri, S. G., Wong Fok Lung, T., Baines, S. L., Sharkey, L. K., Lee, J. Y. H., Hachani, A., Monk, I. R., & Stinear, T. P. (2023). *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. *Nature Reviews Microbiology*, 21(6), 380-395. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00852-y>
29. Hussain, K., Bandyopadhyay, A., Roberts, N., Mughal, N., Moore, L. S. P., & Fuller, L. C. (2022). Panton–Valentine leucocidin-producing *Staphylococcus aureus*: A clinical review. *Clinical and Experimental Dermatology*, 47(12), 2150-2158. <https://doi.org/10.1111/ced.15392>

30. Ibberson, C. B., Jones, C. L., Singh, S., Wise, M. C., Hart, M. E., Zurawski, D. V., & Horswill, A. R. (2014). *Staphylococcus aureus* Hyaluronidase Is a CodY-Regulated Virulence Factor. *Infection and Immunity*, 82(10), 4253-4264. <https://doi.org/10.1128/IAI.01710-14>
31. Idrees, M., Sawant, S., Karodia, N., & Rahman, A. (2021). *Staphylococcus aureus* Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(14), 7602. <https://doi.org/10.3390/ijerph18147602>
32. Javid, F., Taku, A., Bhat, M. A., Badroo, G. A., Mudasir, M., & Sofi, T. A. (2018). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on coagulase gene. *Veterinary World*, 11(4), 423-430. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.423-430>
33. Jensen, C., Li, H., Vestergaard, M., Dalsgaard, A., Frees, D., & Leisner, J. J. (2020). Nisin Damages the Septal Membrane and Triggers DNA Condensation in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1007. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01007>
34. Jia, Y., Guan, Z., Liu, C., Huang, M., Li, J., Feng, J., Shen, B., & Yang, G. (2024). *Staphylococcus aureus* β -hemolysin causes skin inflammation by acting as an agonist of epidermal growth factor receptor. *Microbiology Spectrum*, 12(1), e02227-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02227-23>

35. Jozala, A. F., Novaes, L. C. D. L., & Pessoa, A. (2015). Nisin. En V. Bobbarala (Ed.), *Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials*. InTech. <https://doi.org/10.5772/60932>
36. Ladhani, S. (2003). Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 39(2), 181-189. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00225-6](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00225-6)
37. Linz, M. S., Mattappallil, A., Finkel, D., & Parker, D. (2023). Clinical Impact of *Staphylococcus aureus* Skin and Soft Tissue Infections. *Antibiotics*, 12(3), 557. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030557>
38. Małaczewska, J., & Kaczorek-Łukowska, E. (2021). Nisin—A lantibiotic with immunomodulatory properties: A review. *Peptides*, 137, 170479. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2020.170479>
39. Mlynarczyk-Bonikowska, B., & Rudnicka, L. (2025). The Pathogenicity Mechanisms of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(24), 11803. <https://doi.org/10.3390/ijms262411803>
40. Mohammadi, A., Kazemipour, N., Ghorbankhani, G. A., Morovati, S., & HashempourSadeghian, M. (2024). Glycated nisin enhances nisin's cytotoxic effects on breast cancer cells. *Scientific Reports*, 14(1), 17808. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-68765-1>

41. Mokoena, M. P. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*, 22(8), 1255. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>
42. Moldovan, I. D., Bucur, I. M., Moza, A. C., Ivan, A. A., & Tîrziu, E. (2026). *Antimicrobial resistance in Staphylococcus aureus from livestock: a One Health review. Romanian Journal of Veterinary Sciences*, 59(1), 112–124.
43. Morgan, M. (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: Zoonosis or humanosis? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(6), 1181-1187. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn405>
44. Negash, A. W., & Tsehai, B. A. (2020). Current Applications of Bacteriocin. *International Journal of Microbiology*, 2020, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2020/4374891>
45. Nikolic, P., & Mudgil, P. (2023). The Cell Wall, Cell Membrane and Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* and Their Role in Antibiotic Resistance. *Microorganisms*, 11(2), 259. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020259>
46. Olanipekun, T. A., Ojeniyi, F. D., Celestina, O. I., Ayanyinka, A. D., Habeeb, A. O., Ayanbolade, O. R., Ojurongbe, O., Opaleye, O. O., & Olowe, O. A. (2025). Emerging Pathogenic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strains in Veterinary Medicine (Narrative Review). *Advanced Analytical Pathology*. <https://doi.org/10.17582/journal.aap/2025/1.39.51>

47. Olascoaga-Del Angel, K. S., Sánchez-Evangelista, G., Carmona-Navarrete, I., Galicia-Sanchez, M. D. C., Gómez-Luna, A., Islas-Arollo, S. J., & Castañeda-Sánchez, J. I. (2019). Péptidos antimicrobianos, una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Kompass Neumología*, 1(1), 15-21. <https://doi.org/10.1159/000501946>
48. Organización Mundial de la Salud. (2023). *Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
49. Pasachova Garzón, J., Ramírez Martínez, S., & Muñoz Molina, L. (2019). *Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular*. Revista Nova, 17(32), 25–38. <https://doi.org/10.22490/24629448.3631>
50. Patil, S. M., & Kunda, N. K. (2022). Nisin ZP, an Antimicrobial Peptide, Induces Cell Death and Inhibits Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Progression in vitro in 2D and 3D Cell Culture. *Pharmaceutical Research*, 39(11), 2859-2870. <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03220-2>
51. Patil, S. M., & Kunda, N. K. (2022). *Nisin ZP, an antimicrobial peptide, induces cell death and inhibits non-small cell lung cancer (NSCLC) progression in vitro in 2D and 3D cell culture*. *Pharmaceutical Research*, 39(11), 2859–2870. <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03220-2>
52. Pietrocola, G., Nobile, G., Rindi, S., & Speziale, P. (2017). *Staphylococcus aureus* Manipulates Innate Immunity through Own and Host-Expressed

- Proteases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 166.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00166>
53. Putri, D. A., Lei, J., Rossiana, N., & Syaputri, Y. (2024). Biopreservation of Food Using Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria: Classification, Mechanisms, and Commercial Applications. *International Journal of Microbiology*, 2024(1), 8723968. <https://doi.org/10.1155/ijm/8723968>
54. Rao, Y., Guo, Z., Peng, H., Rao, X., & Wang, G. (2025). *Staphylococcus aureus* capsule: Production, function, and regulation. *Microbes & Immunity*, 2(4), 1. <https://doi.org/10.36922/mi.8392>
55. Rasmi, A. H., Ahmed, E. F., Darwish, A. M. A., & Gad, G. F. M. (2022). Virulence genes distributed among *Staphylococcus aureus* causing wound infections and their correlation to antibiotic resistance. *BMC Infectious Diseases*, 22(1), 652. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07624-8>
56. Ross, C. L., Liang, X., Liu, Q., Murray, B. E., Höök, M., & Ganesh, V. K. (2012). Targeted Protein Engineering Provides Insights into Binding Mechanism and Affinities of Bacterial Collagen Adhesins. *Journal of Biological Chemistry*, 287(41), 34856-34865. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.371054>
57. Sánchez-Ceja, M., Arceo-Martínez, Ma. T., Sandoval-Flores, Ma. G., Alva-Murillo, P. N., Jiménez-Mejía, R., & Loeza-Lara, P. D. (2018). Uso de nisina y quitosano para la inhibición de *Staphylococcus aureus* resistente a

- antibióticos y asociado a mastitis bovina. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9(4), 792-810. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i4.4468>
58. Seillie, E. S., & Bubeck Wardenburg, J. (2017). *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 72, 101-116. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.04.003>
59. Seo, M.-D., Won, H.-S., Kim, J.-H., Mishig-Ochir, T., & Lee, B.-J. (2012). Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review. *Molecules*, 17(10), 12276-12286. <https://doi.org/10.3390/molecules171012276>
60. Serrano, I., Alhinho, B., Cunha, E., Tavares, L., Trindade, A., & Oliveira, M. (2023). Bacteriostatic and Antibiofilm Efficacy of a Nisin Z Solution against Co-Cultures of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from Diabetic Foot Infections. *Life*, 13(2), 504. <https://doi.org/10.3390/life13020504>
61. Setiarto, R. H. B., Widhyastuti, N., Yuliani, S., et al. (2023). *Application of nisin as a natural food preservative: A review. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1169(1), 012105. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1169/1/012105>
62. Shi, Y., Wen, T., Zhao, F., & Hu, J. (2024). Bacteriostasis of nisin against planktonic and biofilm bacteria: Its mechanism and application. *Journal of Food Science*, 89(4), 1894-1916. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.17001>

63. Shin, J. M., Gwak, J. W., Kamarajan, P., Fenno, J. C., Rickard, A. H., & Kapila, Y. L. (2016). Biomedical applications of nisin. *Journal of Applied Microbiology*, 120(6), 1449-1465. <https://doi.org/10.1111/jam.13033>
64. Speziale, P., & Pietrocola, G. (2020). The Multivalent Role of Fibronectin-Binding Proteins A and B (FnBPA and FnBPB) of *Staphylococcus aureus* in Host Infections. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2054. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02054>
65. Tanaka, M., Kamitani, S., & Kitadokoro, K. (2018). *Staphylococcus aureus* lipase: Purification, kinetic characterization, crystallization and crystallographic study. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 74(9), 567-570. <https://doi.org/10.1107/S2053230X18010506>
66. Tavares, T. D., Ribeiro, A. R. M., Silva, C., Antunes, J. C., & Felgueiras, H. P. (2024). Combinatory effect of nisin antimicrobial peptide with bioactive molecules: A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 91, 105246. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105246>
67. Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603-661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>

68. Touaitia, R., Ibrahim, N. A., Abdullah Almuqri, E., Basher, N. S., Idres, T., & Touati, A. (2025). Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1) in *Staphylococcus aureus*: Prevalence, Molecular Mechanisms, and Public Health Implications. *Toxins*, 17(7), 323. <https://doi.org/10.3390/toxins17070323>
69. Touaitia, R., Ibrahim, N. A., Touati, A., & Idres, T. (2025). *Staphylococcus aureus* in Bovine Mastitis: A Narrative Review of Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Advances in Detection Strategies. *Antibiotics*, 14(8), 810. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14080810>
70. Touaitia, R., Mairi, A., Ibrahim, N. A., Basher, N. S., Idres, T., & Touati, A. (2025). *Staphylococcus aureus*: A Review of the Pathogenesis and Virulence Mechanisms. *Antibiotics*, 14(5), 470. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14050470>
71. Wang, D., Wang, L., Liu, Q., & Zhao, Y. (2025). Virulence factors in biofilm formation and therapeutic strategies for *Staphylococcus aureus*: A review. *Animals and Zoonoses*, 1(2), 188-202. <https://doi.org/10.1016/j.azn.2024.11.003>
72. Wang, J., Sun, S., Chen, Y., Chen, D., Sang, L., & Xie, X. (2021). Characterization of *Staphylococcus aureus* ST3320 clone causing fatal respiratory infection in rabbits. *World Rabbit Science*, 29(2), 99. <https://doi.org/10.4995/wrs.2021.14280>

73. Wang, J., Sang, L., Chen, Y., Sun, S., Chen, D., & Xie, X. (2019). *Characterisation of Staphylococcus aureus strain causing severe respiratory disease in rabbits*. *World Rabbit Science*, 27(1), 41–48. <https://doi.org/10.4995/wrs.2019.10454>
74. Wang, R., Yu, S., Huang, Y., & Liu, Y. (2023). Synthesis, high yield strategy and application of nisin: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 58(6), 2829-2841. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16418>
75. Wu, J., Hu, S., & Cao, L. (2007). Therapeutic Effect of Nisin Z on Subclinical Mastitis in Lactating Cows. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(9), 3131-3135. <https://doi.org/10.1128/AAC.00629-07>
76. Zhang, Q.-Y., Yan, Z.-B., Meng, Y.-M., Hong, X.-Y., Shao, G., Ma, J.-J., Cheng, X.-R., Liu, J., Kang, J., & Fu, C.-Y. (2021). Antimicrobial peptides: Mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research*, 8(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2>
77. Zhu, H., Han, L., Ni, Y., Yu, Z., Wang, D., Zhou, J., Li, B., Zhang, W., & He, K. (2021). In vitro and In vivo Antibacterial Effects of Nisin Against *Streptococcus suis*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(2), 598-610. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09732-w>