

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



EVALUACION DE LA ACCION ANTIMICROBIANA DE BACTERIOCINAS AISLADAS A PATIR DE BACTERIAS LACTICAS.

POR:

CECILIA GARCIA PEÑA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Presentada por:

CECILIA GARCIA PEÑA

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Aprobada por:

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández.

PRESIDENTE

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez.

SINODAL

M.C. Mildred Inna Flores Verastegui.

SINODAL

Dra. Ruth Elizabeth Belmares Cerda.

SINODAL

Dr. Ramiro López Trujillo

COORDINADOR DE LA DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

Buenavista, Saltillo Coahuila, México.

Diciembre 2012



AGRADECIMIENTO

A Dios: gracias por darme vida, salud y fortaleza en cada momento de mi vida, siempre me llevaste de tu mano, me levantaste y me regalaste la oportunidad de seguir adelante y por ponerme en mi camino a todas aquellas personas que de manera incondicional me apoyaron y me orientaron durante mi formación.

A mi Narrito: gracias escuela mía porque me diste todas las herramientas y conocimientos necesarios para formarme y servir a la sociedad, por la educación y los valores que de ti aprendí y más por lo que es tu esencia: “**Alma Terra Mater**”

A mis padres: Rosa Peña Hernández y Cliserio García Azpeitia. Gracias por su apoyo incondicional, y cariño, sobre todo por su gran esfuerzo y esmero que ahora se ve reflejado en este logro, porque sus consejos siempre me orientaron por el camino correcto y me enseñaron valores que me hicieron una persona útil que sirve a ustedes y a la sociedad, mil gracias con todo respeto y amor que ustedes merecen.

A mis hermanos: Gracias por su cariño, ejemplo y apoyo incondicional que siempre me dieron, porque sin ustedes hubiera sido un poco más difícil, y este logro no solo es mío sino gracias a ustedes que siempre estuvieron cuando más lo necesite.

A mis Asesores de Tesis: De manera especial al **Dr. Mario A. Cruz Hernández, a la M.C. Mildred Inna Verastegui, Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez, y a la Dra. Ruth Elizabeth Belmares Cerda,** gracias por impartirme sus valiosos conocimientos, ayuda económica, su esfuerzo, atención y orientación a lo largo de este proyecto.

A mis maestros: Dr. Mario Alberto Cruz Hernández, Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez, QFB. Carmen Pérez Martínez, Dra. Ma. Lourdes Morales Caballero, M.C María Hernández González, Dr. Heliodoro de la Garza Toledo, Lic. Laura Olivia Fuentes Lara, Dra. Dolores Gabriela. Químico Oscar Noé Reboloso, QFB. Xóchitl Ruelas Chacón y a todos los docentes que me impartieron clases que con gran orgullo y respeto los recordare. Gracias por dedicar su valioso tiempo a la formación de profesionistas que con gran esfuerzo nos sacaron adelante ya que gracias a ustedes ahora somos gente con capacidad y habilidad de enfrentar nuevos retos.

A T.A. Carlos Arévalo San Miguel gracias por su valioso apoyo que de manera amable e incondicional siempre me facilito los reactivos necesarios para la realización de este trabajo.

A mis amigos, Leticia García Vilchis, Joaquín Hernández Escamilla, Brenda Lizeth, Anayeli Jiménez gracias por todos los conocimientos compartidos, por los ratos de estudio y esfuerzo de equipo colaborador, por los ratos gratos que pasamos y que nunca olvidare, siempre los recordare, a **Gerardo Gonzales C., Luis Alberto Hernández T., Ma. Del Rosario Martínez** gracias por su valiosa amistad.

A mis amigas del Internado: Oliva y Catalina Gracias por su compañía y amistad que me supieron brindar, gracias por su paciencia y amabilidad en todo momento.

A todas las personas que laboran en la Universidad: administrativos, académicos, pilotos de transporte, comedor e internado, encargados de la biblioteca y centro de cómputo, que de alguna manera contribuyeron y me apoyaron a lo largo de mi carrera.



DEDICATORIA

A mis guías de luz:

Cliserio García Azpeitia y Rosa Peña Hernández

A ustedes queridos padres porque me dieron la vida y siempre serán mi principal motivación y entusiasmo.

A mis hermanos (a) s:

Su esfuerzo, amor, cariño y trabajo siempre han mantenido unida a la familia, en las buenas y en las malas.

A mis abuelos:

Sus sabios consejos le dieron dirección y sentido a mi vida.

A mis sobrinos:

El regalo de Dios que trajo felicidad a mi vida.

A Víctor Manuel García Peña †

Que desde el cielo me guiaste, tu recuerdo querido hermano perdurará por siempre en mi memoria

A Eusebio Veliz de los Santos

Tu valioso apoyo me impulsó a seguir adelante a lo largo de la realización de este proyecto porque fuiste siempre la compañía y el complemento ideal de mi alegría.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimiento.....	iii
Dedicatoria.....	v
Índice general.....	vi
Índice de cuadros.....	x
Índice de figuras.....	xi
Resumen.....	xiii
Capítulo 1	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Objetivos.....	3
1.2.1 Objetivo general.....	3
1.2.2 Objetivos específicos.....	3
1.3 Hipótesis.....	3
1.4 Justificación.....	4
Capítulo 2.....	5
2.1 .Revisión de literatura.....	5
2.2. Bacterias ácido lácticas (BAL).....	5
2.2.1. Características generales.....	6
2.3. Rutas metabólicas de degradación de azúcares por BAL.....	7
2.3.1. Vía homofermentativa.....	8
2.3.2. Vía del fosfogluconato.....	9

2.4. Factores de crecimiento de BAL.....	11
2.4.1. Temperatura.....	11
2.4.2 Oxígeno y pH.....	11
2.4.3 Medios de cultivo.....	11
2.4.3.1 Agar MRS.....	12
2.5. Importancia industrial de bacterias lácticas como conservadores de alimentos.....	12
2.6. Bacteriocinas producidas por bacterias lácticas.....	14
2.6.1. Definición y características.....	14
2.6.2. Estabilidad.....	15
2.6.3. Espectro de inhibición.....	16
2.6.4. Mecanismo bactericida de bacteriocinas.....	16
2.7. Clasificación.....	17
2.8. Antecedentes.....	20
2.9. Técnicas de producción y purificación de bacteriocinas.....	21
2.10. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por bacteriocinas.....	22
2.10.1 Antibiogramas.....	22
2.10.2. Métodos enzimáticos.....	22
2.11. Bacteriocinas como conservador de alimentos.....	23
2.12. Bacterias patógenas Familia Enterobacteriaceae.....	23
2.12.1 <i>Salmonella typhi</i>	24

2.12.2 <i>Escherichia coli</i>	24
2.12.3 <i>Enterobacter aerogenes</i>	24
2.12.4. <i>Klebsellia pneumoniae</i>	24
2.12.5. <i>Proteus mirabilis</i>	25
Capítulo 3.....	26
3.1. Materiales y Métodos.....	26
3.2. Etapa 1. Aislamiento, purificación, identificación y conservación de cepas de bacterias lácticas.....	26
3.2.1 Obtención de cepas de bacterias lácticas.....	26
3.2.2 Aislamiento.....	27
3.2.3 Purificación e identificación microscópica y morfológica.....	28
3.2.4 Conservación de bacterias lácticas.....	28
3.2.5 Método de preparación de medio de cultivo MRS (Man, Rogosa y Sharpe, 1960).....	29
3.3. Etapa 2. Cultivo de bacterias patógenas.....	29
3.3.1. Cultivo en medio agar y caldo nutritivo.....	30
3.3.2. Conservación de bacterias patógenas.....	31
3.3.3. Medios de cultivo para bacterias patógenas: <i>Salmonella typhi</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>Klebsellia pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i>	31
3.4. Etapa 3. Obtención de bacteriocinas y evaluación del efecto antimicrobiano de bacteriocinas contra cepas de <i>Salmonella typhi</i> , <i>Escherichia Coli</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>Klebsellia pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i>	32

3.4.1. Cultivo de bacterias lácticas en caldo MRS.....	32
3.4.2. Extracción de bacteriocinas.....	33
3.4.3. Preparación de antibiogramas.....	33
3.4.4. Medida de halo de inhibición.....	34
Capítulo 4.....	35
4.1. Resultados y Discusión.....	35
4.2. Etapa 1. Resultados de aislamiento, purificación, identificación y conservación de cepas de bacterias lácticas.....	35
4.3. Etapa 2. Resultados del cultivo de bacterias patógenas.....	36
4.4. Etapa 3. Obtención de bacteriocinas y evaluación del efecto antimicrobiano de bacteriocinas contra cepas de <i>Salmonella typhi</i> , <i>Escherichia Coli</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>Klebsellia pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i>	37
4.4.1. Curvas de comportamiento producción de bacteriocinas e Inhibición de cepas de <i>Salmonella tiphy</i> , <i>Klebsellia pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> y <i>Enterobacter aerogenes</i>	39
Capítulo 5.....	50
5.1. Conclusiones.....	50
Capítulo 6	51
6.1. Recomendaciones.....	51
Capítulo 7	52
7.1. Referencias bibliográficas.....	52
Capítulo 8.....	56
8.1. Anexos.....	56
8.1.1 Anexo 1. Tinción Gram.....	56
8.1.2. Anexo 2. Composición química medio de cultivo MRS.....	58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Balances de fermentación representativos de dos bacterias del ácido láctico homofermentativas y heterofermentativas.....	8
Cuadro 2. Aplicación de las bacterias lácticas para incrementar la vida media de la carne fresca y productos cárnicos.....	13
Cuadro 3. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas (BAL).....	19
Cuadro 4. Identificación y origen de cepas de bacterias lácticas.....	26
Cuadro 5. Composición de agar nutritivo (g/L).....	30
Cuadro 6. Fórmula medio agar Mc conkey.....	31
Cuadro 7 .Características de colonias de bacterias patógenas.....	32
Cuadro 8. Identificación microscópica y morfológica de BAL.....	35
Cuadro 9. Diámetro de halos de inhibición (mm) promedio por bacteria patógena respecto al tiempo de producción de bacteriocinas.....	37
Cuadro 10. Composición de agar MRS (gr/L).....	58
Cuadro 11. Composición de caldo MRS (gr/L).....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Forma y disposición de las células en tres géneros de bacterias del ácido láctico, <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pediococcus</i>	7
Figura 2. Via emden – meyerhof – parnas	9
Figura 3. Ruta de las pentosas fosfato o del fosfogluconato.....	10
Figura 4. Modo de acción de las bacteriocinas.....	17
Figura.5 Aislamiento en campana de flujo laminar e imagen de cepa BDL aislada en agar MRS	27
Figura 6. Inyección de nitrógeno y reactores en incubación a 37°C	27
Figura 7. Tinción Gram e identificación morfológica de BAL	28
Figura 8. Conservador (leche descremada 10% y glicerol 10%)	28
Figura 9. Autoclave caldo MRS y agar MRS	29
Figura 10. <i>P. mirabilis</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. Aerogenes</i> , <i>E. Coli</i>	29
Figura 11. Caldo nutritivo y cultivo de bacterias patógenas en caldo Nutritivo.....	30
Figura 12. Inoculación de bacterias lácticas en caldo MRS e Incubación.....	32
Figura 13. Fermentación en MRS, centrifugación, filtración por membrana.....	33
Figura 14. <i>Salmonella typhi</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>E. Coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. aerogenes</i>	34
Figura 15. Halos de inhibición medidos en mm.....	34
Figura 16. Imágenes que demuestran la viabilidad de las cepas de estudio.....	36
Figura 17. Inhibición de cepas patógenas por bacteriocinas producidas por la cepa LCl.....	40
Figura 18. Inhibición de cepas patógenas por bacteriocinas producidas por la cepa BSl.....	41

Figura 19. Inhibición de cepas patógenas por bacteriocinas producidas por la cepa X.....	42
Figura 20. Inhibición de cepas patógenas por bacteriocinas producidas por la cepa XE.....	43
Figura 21. Inhibición de cepas patógenas por bacteriocinas producidas por la cepa LC2.....	44
Figura 22. Inhibición de cepas patógenas por bacteriocinas producidas por la cepa BD.....	45
Figura 23. Inhibición de cepas patógenas por bacteriocinas producidas por la cepa BDL.....	46
Figura 24. Inhibición de cepas patógenas por bacteriocinas producidas por la cepa LRR.....	47
Figura 25. Inhibición de cepas patógenas por bacteriocinas producidas por la cepa BAA.....	48
Figura 26. Inhibición de cepas patógenas por bacteriocinas producidas por la cepa LRR.....	49
Figura 27. Metodología tinción Gram.....	57

RESUMEN

Se ha implementado la búsqueda de como contrarrestar el uso de conservadores químicos en alimentos, una alternativa es la aplicación de bioconservadores como las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas que tienen capacidad de inhibir bacterias patógenas siendo inofensivas en el organismo humano además contribuyen a la prevención de la descomposición de alimentos y el desarrollo de microorganismos patógenos.

En el presente trabajo se aislaron e identificaron de manera microscópica diez cepas de bacterias lácticas (LCI, XE, X, BSI, LC2, LRR, LRR.3, BAA, BD, BDL) aisladas de muestras de leche de vaca, de cabra y materna, en el estado de Coahuila. Se evaluó la capacidad de producción de bacteriocinas y la actividad antimicrobiana de las mismas producidas por las diez cepas contra aislados de *Salmonella tify*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *E. coli* y *P. mirabilis* que presentaron susceptibilidad.

Se demostró que a mayor periodo de fermentación del medio de cultivo MRS hay producción de bacteriocinas con mayor efecto bactericida las cepas.

Las cepas LCI, BSI, X, LC2, BD, BDL, LRR, BAA, LRR.3, producen bacteriocinas en un tiempo de 48 horas que inhiben a las cinco bacterias patógenas mostrando diferencia no significativa y presentando un rango de halo de inhibición promedio de 10 a 12.5 mm de diámetro. Lo que representa una alternativa para crear un producto que funcione como conservador biológico y que ataque este tipo de microorganismos patógenos.

Palabras clave: Bacteriocinas, Bacterias ácido lácticas (BAL), Inhibición.

Capítulo 1

1.1. INTRODUCCION

Recientemente se ejerce la aplicación de bioconservadores naturales en alimentos coadyuvando a disminuir el uso de preservantes químicos que tienen efectos nocivos en la salud del consumidor, tales como nitratos y nitritos que causan la formación endógena de N-nitrocompuestos, de efectos cancerígenos como las nitrosaminas compuestos altamente peligrosos para la salud humana. (Almudena A. *et al*; 2001).

Una alternativa se ha centrado en el estudio de bacterias ácido lácticas (BAL) microorganismos con potencial industrial denominados “probióticos” que al ser ingeridos en cantidades adecuadas ejercen beneficios en la salud del hospedero, evitando el desarrollo de enfermedades, mejorando la microflora intestinal, utilizadas en la industria como cultivos iniciadores que mejoran la calidad sensorial de productos lácteos.

Además son productoras de metabolitos con actividad antimicrobiana (peróxido de hidrogeno, ácido láctico, ácido acético, bacteriocinas) designadas con categoría GRAS (seguras para la salud) que limitan el crecimiento de algunas bacterias patógenas e indeseables, siendo estas inocuas y sin provocar alteraciones a los alimentos.

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos con capacidad de inhibir microorganismos patógenos perjudiciales para la salud humana, representan una excelente estrategia para el control de *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, entre otros. (De la Fuente, 2009).

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas está asociada con el efecto antagonista por atracción electrostática a la membrana citoplasmática de la célula microbiana a través de receptores iónicos formando poros seguido de provocar lisis celular y pérdida de actividad.

Péptidos pertenecientes al grupo II (no lantibióticos), de la clase IIa poseen propiedades como la resistencia térmica característica de interés que puede aplicarse en la extensión de la vida de anaquel de los alimentos en conjunto con métodos térmicos de conservación evitando su deterioro y descomposición (Minor, 2004).

Un ejemplo de estos metabolitos es la nisina producido por *Lactococcus lactis* BAL actualmente utilizada en más de 50 países con una efectividad comprobada y autorizada por la FDA (Food and Drug Administration) como bioconservador de alimentos sometido a tratamientos en condiciones térmicas y bajo pH.

La garantía de que las bacteriocinas son seguras y que no causan daños en la salud del consumidor es que al ser ingeridas son destruidas por enzimas proteolíticas digestivas presentes en el organismo humano.

En el presente trabajo se demostró el potencial del efecto inhibitorio de bacteriocinas aisladas de cepas de BAL nativas de muestras previamente extraídas de leche de vaca y cabra en Buenavista Saltillo Coahuila. Debido a lo anterior se obtuvo un banco de cepas de BAL productoras de estos péptidos antimicrobianos con capacidad bactericida contra *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *E. aerogenes*, *Proteus mirabilis* y *Klebsellia pneumoniae*, que tienen especial aplicación como bioconservadores de alimentos. Además se realizaron estudios sobre el proceso de producción y evaluación inhibitoria de estos metabolitos respecto al tiempo de fermentación del medio de cultivo antimicrobiano.

Este estudio sienta las bases para el posterior desarrollo de productos naturales que se pueden usar como bioconservadores además de representar una alternativa a la búsqueda de nuevos microorganismos con actividad biológica.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

- Obtener y evaluar la capacidad antimicrobiana e inhibitoria de bacteriocinas aisladas a partir de bacterias lácticas sobre cepas de bacterias patógenas, con potencial de uso industrial alimentario como conservador natural biológico.

1.2.2. Objetivos específicos

- Aislar bacterias lácticas provenientes de cepas de bacterias nativas de muestras de leche de cabra, vaca y materna.
- Identificar de manera microscópica y morfológica las cepas de bacterias lácticas.
- Purificar y conservar de bacterias lácticas para ser utilizadas en estudios posteriores.
- Obtener de bacteriocinas a partir de bacterias lácticas.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana y antagonista de bacteriocinas aisladas a partir de bacterias lácticas contra cepas de bacterias patógenas *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Klebsellia pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Enterobacter aerogenes*.

1.3. Hipótesis

- Es posible que las cepas de bacterias lácticas LCI, LC2, BD, BDL, XE, X, BAA, BSI, LRR, LRR.3 produzcan bacteriocinas con la capacidad de inhibir el crecimiento de *Salmonella typhi*, *E.coli*, *Klebsellia pneumoniae*, *P. mirabilis* y *E. aerogenes*.
- A mayor tiempo de fermentación en medio de cultivo MRS por BAL aumenta la actividad bactericida de las bacteriocinas producidas contra *Salmonella typhi*, *E. Coli*, *E. aerogenes*, *Klebsellia pneumoniae* y *P. mirabilis*.

1.4. Justificación

La razón principal de la presente investigación fue aportar una alternativa de bioconservación de alimentos a la industria alimentaria, debido a que existe gran interés científico e industrial en la sustitución de conservadores químicos por conservadores biológicos, que permita satisfacer las exigencias del consumidor tendientes al consumo de productos naturales mínimamente procesados y que sean inocuos para la salud humana.

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial en este sentido, su aplicación como conservador biológico en productos alimenticios se ve influenciada por la propiedad de inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos indeseables tales como: *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* entre otras y de los que causan deterioro de alimentos.

Además no representan un peligro en la salud del consumidor debido a que al ser ingeridas, dentro de nuestro organismo existen proteasas de origen pancreático y gástrico que las inactivan sin ser absorbidas como compuestos activos sin causar algún riesgo.

Por lo descrito anteriormente, en el presente trabajo surgió el interés del análisis y estudio de la evaluación de la producción de bacteriocinas por cada cepa de bacterias lácticas: LCI, BSI, BD, BAA, LRR, XE, X, LRR.3, LC2 Y BDL, así como analizar su actividad bactericida sobre bacterias patógenas respecto al tiempo de fermentación del medio de cultivo MRS.

Capítulo 2

2.1. REVISION DE LITERATURA

2.2. Bacterias ácido lácticas (BAL).

Constituyen un grupo de microorganismos unicelulares con la característica principal de producir ácido láctico mediante la fermentación de azúcares, no patogénicos, reconocidas como seguras para la salud GRAS (“Generally Recognized As Safe”) utilizadas en la fabricación de productos lácteos como quesos y yogurt. (De la Fuente, 2009).

Las bacterias lácticas producen ácido láctico rápidamente y en cantidades importantes, estas bacterias no dan oportunidad a que crezcan otros microorganismos competitivos, agrupan los géneros más utilizados en alimentos: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus* (Frazier *et al.*, 1993).

Son componentes fundamentales de cultivos iniciadores utilizados en la industria alimentaria responsables de la maduración de quesos y de alimentos fermentados como vegetales, carnes, bebidas alcohólicas y productos de panadería. También producen cambios sensoriales que aumentan el valor añadido de la materia prima. (Martínez, 1996).

El uso de bacterias lácticas llamadas “probióticos” y el efecto de manipular la microflora intestinal fue inicialmente observado por Metchnikoff, quien reportó los efectos benéficos de las bacterias productoras de ácido láctico en la prevención y tratamiento de enfermedades intestinales (Guarner *et al.*; 2002). Mediante la ingesta de bacterias lácticas o “probióticas” se puede mantener la salud estable del consumidor a través de su resistencia contra la invasión de microorganismos patógenos que se logra por la acción bactericida de sustancias antimicrobianas como diacetilo, ácido láctico, peróxido de hidrógeno o bacteriocinas (González *et al.*; 2003).

2.2.1. Características generales

Se caracterizan por ser Gram (+), inmóviles, no esporulados, productoras de CO₂, no reducen nitratos, carentes de porfirinas, sistema de citocromos y fosforilación oxidativa, obteniendo por tanto energía únicamente por fosforilación a nivel sustrato, producen ácido láctico, crecen rangos de pH desde 4.8 que les permite sobrevivir en medios ácidos, característica de importancia industrial, todas las bacterias del ácido láctico crecen anaerobiamente, aunque algunas de ellas pueden desarrollarse en presencia de O₂, son por tanto anaerobias facultativas. (Brock, 1978).

Otra de las características es que son incapaces de sintetizar ATP por respiración, lo cual es un reflejo de su incapacidad para sintetizar citocromos y otros enzimas que contengan grupos hemo. A consecuencia de este aspecto es que son catalasa negativa y por tanto no pueden descomponer el agua. La ausencia de actividad catalasica es fácilmente mostrable por ausencia de formación de O₂. Las colonias de las bacterias del ácido láctico siempre son pequeñas, no pigmentadas, con aspecto blanco. (Stanier *et al.*, 1992)

La identidad morfológica de las BAL comprende especies en forma de coco (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* y *Leuconostoc*) y bacterias en forma de bacilo (*Lactobacillus* y *Carnobacterium*) (Figura 1).

Todas las bacterias lácticas son sacarolíticas, presentan requerimientos nutricionales complejos que los ayuda a restringirse a medios ricos en nutrientes como el tracto intestinal y la leche. Se encuentran en hábitats asociadas a las plantas otras forman parte de la flora natural del cuerpo, encontrándose en la nasofaringe y la vagina. (García, 2006).

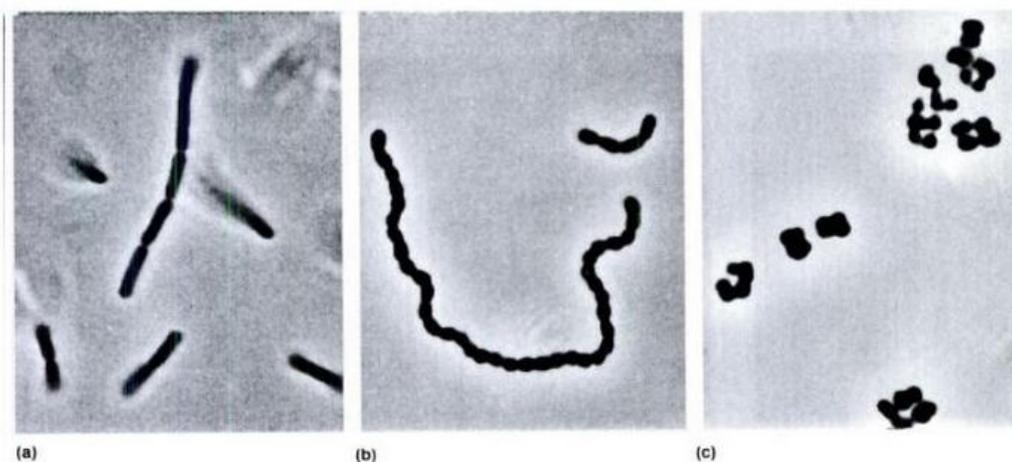


Figura 1. Forma y disposición de las células en tres géneros de bacterias del ácido láctico (a) *Lactobacillus*, (b) *Streptococcus*, (c) *Pediococcus* (Stanier *et al.*, 1992).

2.3. Rutas metabólicas de degradación de azúcares por BAL.

Existen dos rutas principales por las que las BAL degradan hidratos de carbono las cuales podemos clasificarlas en homofermentativas y heterofermentativas. El grupo de las homofermentativas que únicamente producen ácido láctico, y las del grupo heterofermentativas que producen otras sustancias además del ácido láctico. (MacFaddin, 2003).

Las bacterias Homofermentativas producen de un 70-90% de ácido láctico. *L. bulgaricus*.

Las bacterias Heterofermentativas producen alrededor de un 50% de ácido láctico. *L. casei*. (Cobo, 2001)

La diferencia entre los subgrupos de las BAL se encuentra entre los productos que forman durante la fermentación de carbohidratos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Balances de fermentación representativos de dos bacterias del ácido láctico homofermentativas y heterofermentativas.

Productos	<i>Streptococcus liquefaciens</i> (homofermentativo)	<i>Leuconostoc dextranicum</i> (heterofermentativo)
Ácido láctico	173	83.5
Ácido acético	23	11
Ácido fórmico	6.6	---
CO ₂	6.6	86.5
Etanol	2.0	81
Glicerina	14.1	24

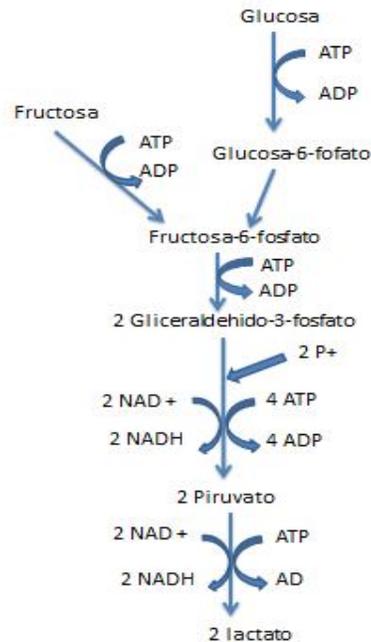
*milimoles formados por cada 100 milimoles de glucosa fermentados. (Brock, 1978)

2.3.1. Vía homofermentativa

Grupo de BAL también llamado como homolacticos transforman un mol de glucosa a través de la vía glucolítica de Embden-Meyerhof-Parnas para formar dos moles de piruvato y 2 de lactato (e.j. *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y el grupo I *Lactobacilli*.) (Figura 2).

Enzimas clave:

- Aldolasas responsables en la transformación de hexosas difosfato a gliceraldehído 3P
- Piruvato kinasa (PK), esencial para la formación del piruvato
- Lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la transformación del piruvato a lactato. (Romero del Castillo, 2004)



Producto final: Ácido Láctico

Ganancia neta: 1 ATP

Figura 2. Vía Embden-Meyerhof-Parnas (Mirrey, 2007)

2.3.2. Vía del fosfogluconato

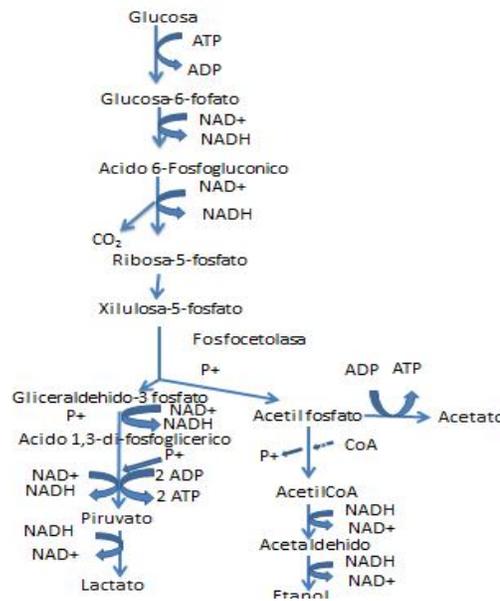
Las Bacterias ácido lácticas heterofermentativas utilizan la ruta de las pentosas fosfato o del fosfogluconato en la que una mol de glucosa-6-fosfato es oxidada a 6-fosfogluconato, luego descarboxilada para producir un mol de CO₂ y el resultante pentosa-5.fosfato es disociada en un mol de fosfato de gliceraldehido y un mol de acetilfosfato por medio de una fosfocetolasa, la producción de CO₂ es una forma de detectar a un heterofermentador.

El fosfato de gliceraldehido se metaboliza luego en ácido láctico con producción de un mol de ATP, tal como en la reacción de los homofermentadores, mientras con el acetilfosfato acepta electrones del NADH generado durante la producción del fosfato pentosa reduciéndose a etanol vía los intermediarios acetil-coA y

acetaldehído sin producción de ATP. Los productos finales ácido láctico, acetato, etanol, incluyendo 1 mol de ATP. (Brock, 1978)

La presencia de glucosa-6-deshidrogenasa y de fosfoketolasa permite el metabolismo por la ruta del 6-P-gluconato. La fosfoketolasa hidroliza el 6-P-gluconato a CO₂ y pentosa 5-P, que a su vez se convierte en gliceraldehido-3-P y acetyl-P (Romero del Castillo, 2004). Las BAL obligatoriamente heterofermentativas son *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, y el grupo III *Lactobacilli*.

Fermentación de la glucosa por bacterias del ácido láctico heterofermentativas (Figura 3).



Productos: 1 mol Ac. Láctico, 1 etanol + CO₂ + Acetato

Ganancia neta: 1 ATP

Figura 3. Ruta de las pentosas fosfato o del fosfogluconato (Brock, 1978).

2.4. Factores de crecimiento de BAL

2.4.1. Temperatura

Ejercen su crecimiento a una temperatura óptima en un rango de 25⁰C y 30⁰C. Para bacterias mesófilas, aunque existen bacterias termófilas capaces de crecer a temperaturas altas de entre 35 y 45⁰C. (Romero del Castillo, 2004),

2.4.2. Oxígeno y pH.

Las bacterias lácticas se desarrollan con un pH óptimo de crecimiento que se sitúa entre 4 y 4.5, son anaerobias facultativas es decir que pueden desarrollarse en presencia o ausencia de oxígeno. (Rodríguez, 1994).

2.4.3. Medios de cultivo.

Estos microorganismos lácticos necesitan carbohidratos como glucosa y lactosa como fuente de carbono y para la obtención de energía ATP. Utilizan las proteínas de la leche y de los extractos de carne, los péptidos aminoácidos específicos y derivados de ácidos nucleicos para el suministro de N₂ necesario para la síntesis de proteínas. Y Vitaminas del Complejo B como catalizadores de reacciones enzimáticas. (Cobo, 2001).

Las BAL son muy selectivas pues se desarrollan en medios ricos en vitaminas, bases nitrogenadas, y fuentes de carbono, muy especialmente vitaminas B, aminoácidos, péptido, bases puricas y pirimidicas. Los medios de cultivo más utilizados para su selección, aislamiento y cultivo de estos microorganismos lácticos entre los principales está el agar MRS (de Man-Rogosa-Sharpe); agar APN (Actidiona-polimixinanitrato); agar lee y el agar de Chalmers. (Ramírez, 2005)

2.4.3.1. Agar MRS

Es un medio de cultivo que permite el desarrollo de muchas especies de bacterias lácticas, fue creado por Man, Rogosa y Sharpe. Constituye peptona y glucosa como fuente de carbono, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y evitan el desarrollo de m.o.s. pues ejercen actividad inhibitoria, como el citrato de amonio que inhibe bacterias Gram (-). (Britanialab).

2.5. Importancia industrial de Bacterias Lácticas como conservadores de alimentos.

Producen ácido láctico que sirve como factor que limita el crecimiento de bacterias no tolerantes a pH's bajos, por lo tanto evitan el desarrollo de microorganismos que causan el deterioro de los alimentos, le confiere a los alimentos aromas y sabores deseados obtenidos de "natas", mantequillas, yogurt, etc. Son bacterias que contribuyen a la acción antiséptica a partir de ácido láctico en el intestino. (Alais, *et al.* 2003)

Además producen ácidos orgánicos (láctico y acético), peróxido de hidrogeno con actividad inhibitoria, diacetilo sustancia responsable del sabor y aroma a mantequilla, etanol (puede provocar lisis celular de otras bacterias), ácido fórmico, ácido benzoico, enzimas bacteriolíticos, muy especialmente las bacteriocinas con capacidad bactericida que tienen un interés considerable en la seguridad alimentaria (Rodríguez, 2006).

Existe un especial interés en su efecto de prolongación de vida de anaquel de alimentos cárnicos debido a la acidez que permite la deshidratación del alimento, no todas las BAL son efectivas, esto depende de cada bacteria empleada. (Cuadro 2) (Minor, 2004).

Para que una bacteria láctica pueda ser empleada como conservador de alimentos debe ser capaz de crecer a temperaturas de refrigeración, (Stiles, 1996) menciona que *Carnobacterium psicicola* y *Leuconostoc gelidum* son de las pocas BAL que presentan esta condición.

Según (Huss *et al.*, 1995) para la aplicación de BAL como conservadoras de carnes es necesario manejar las del tipo fermentación homoláctica, debido a que solo hay producción de ácido láctico, en cambio sí se usan las BAL homofermentativas generadoras de ácido acético y CO₂ obtendrían cambios negativos en el sabor, textura y la jugosidad y sobre todo evitar la formación de aminas biogénicas, como tiramina e histamina.

Cuadro 2. Aplicación de las bacterias lácticas para incrementar la vida media de la carne fresca y productos cárnicos.

Bacteria láctica	Microorganismo de descomposición	Carne o producto cárnico	Referencia
<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Escherichia Coli</i>	Embutidos	Roca y Kalman, 1989
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>			
<i>Pediococcus pentosaeus</i>	<i>Brochotrix thermosphacta</i>		
<i>Lactobacillus sake</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	Embutidos	Montel y Talon, 1993
<i>Pediococcus pentosaceus</i>			
<i>Staphylococcus carnosus</i>			
<i>Staphylococcus warneri</i>			
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>			
<i>Lactobacillus Curvatus</i>	<i>Escherichia Coli</i>	Embutidos	Vogel <i>et al.</i> , 1993
<i>Lactobacillus sake</i>			
<i>Streptococcus sp.</i>			
<i>Lactobacillus Plantarum</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	Cerdo, res	Guerrero <i>et al.</i> , 1995
<i>Staphylococcus carnosus</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Cerdo	Minor, 1998
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Jamón	Lowndes y Henriksson, 1999
<i>Lactobacillus sake</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Embutidos	Hugas <i>et al.</i> , 1999
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	<i>Listeria innocua</i>	Embutidos	Perez-Chabela <i>et al.</i> , 2001

(Minor, 2004).

2.6. Bacteriocinas producidas por bacterias lácticas.

2.6.1. Definición y características.

(Romero del Castillo *et al*; 2004) define que son péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal con actividad antimicrobiana producidas por la gran mayoría de las bacterias incluso las del genero Archea, sin embargo las de importancia industrial son las que producen las BAL Gram (+). La función de las bacteriocinas es capacitar a las bacterias que las producen para sobrevivir frente a competidores.

Las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas son un grupo heterogéneo de péptidos, de pequeño tamaño con actividad antimicrobiana de utilidad en la conservación de alimentos. Por su potencialidad de inhibir microorganismos patógenos, alterantes, presentan interés para la industria alimentaria en general. (Hernández, 2010)

Las bacteriocinas son proteínas antibióticas producidas por una amplia variedad de especies bacterianas. La supervivencia y la proliferación de microorganismos se puede dar si este logra eliminar o desplazar a un organismo competente en su nicho ecológico, en donde la competencia es muy intensa debido a la diversidad de especies. Se ha sugerido que la función de las bacteriocinas es permitir el establecimiento y permanencia de la cepa que produce en el nicho que coloniza. (Acosta *et al.*, 2006).

Las bacteriocinas, proteínas sintetizadas a nivel ribosómico y con actividad antimicrobiana, juegan un papel importante en dicha protección y representan una estrategia importante para el control de poblaciones bacterianas patógenas causantes de enfermedades que generan un perjuicio en la salud humana como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhymurium*, *Bacillus cereus*.

Las bacteriocinas exhiben resistencia al calor, actividad a amplio rango de pH y a baja aw lo cual les confiere gran potencial para ser utilizadas como

bioconservadores que incrementen la vida útil de los alimentos. (Ramon Frias *et al.*, 2006).

La bacteriocina más importante es la nisina producida por *Lactococcus Lactis*, de uso legal como aditivo alimentario en muchos países. En España se permite su uso en los quesos duros y en los quesos fundidos para evitar el crecimiento de *Clostridium butiricum* y *tyrobutiricum*. Otras bacteriocinas son la pediocina PA-1, producida por *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus acidilacti*, que posee actividad antilisteria, y la lactocina S, producida por *Lactobacillus sake* y *Lactobacillus plantarum* (Romero del Castillo *et al.*, 2004).

El autor (TAGG *et al.*, 1976), indica los criterios que debe presentar una bacteriocina de bacterias Gram (+) para su consideración como compuesto antimicrobiano:

Amplio espectro de inhibición

Modo de acción bactericida

La unión a receptores específicos celulares

La producción de bacteriocinas por determinantes genéticos ligados a plasmidos y, la inmunidad de la célula productora frente a su propia bacteriocina.

2.6.2. Estabilidad

Las bacteriocinas presentan estabilidad cuando se someten a temperaturas mayores y pH's ácidos, ambas propiedades están ligadas debido a que un incremento de pH reduce la estabilidad al calor. (Chen y Hoover, 2003), observaron que la pediocina PA-1 es estable durante su almacenamiento por 21 días a 15⁰C a pH's de 4 a 6.

(Hernández, 2002). Demostró que la Pediocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133 mantuvo su estabilidad en condiciones de congelación con un 100% de actividad durante 15 semanas a -20°C .

(Minor, 2004) reporta que la bacteriocina producida por *Lactobacillus buchneri* presento resistencia térmica a un tratamiento a 100°C durante 20 minutos, con pérdida de actividad del 15% igual que para la bacteriocina producida por *Lactobacillus paracasei*.

2.6.3. Espectro de inhibición

Existen bacteriocinas que se pueden identificar por su espectro de inhibición amplio que actúan contra bacterias gram positivas y negativas.

Estudios realizados por (Aguilar *et al.*, 2011) reportan que las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* WS4174, *P. acidilacti* P120 y *Lactobacillus mesenteroides* inhiben el crecimiento de *Listeria spp.* Demuestran que la acción inhibitoria (diámetro de halos) fue más evidente sobre *L. monocytogenes* ATCC 7654 que sobre *L. innocua*.

2.6.4. Mecanismo bactericida de bacteriocinas

El mecanismo de inhibición bacteriana en general se basa destruyendo la integridad de la membrana citoplasmica a través de la formación de poros, lo que ocasiona lisis celular y la salida de orgánulos o compuestos como potasio, fosfato inorgánico, aminoácidos y moléculas pequeñas necesarias para la producción de ATP y síntesis de proteínas ocasionando muerte celular. (González *et al.*, 2003).

Debido a una atracción electrostática por fuerzas catiónicas o receptores específicos o no específicos (lípidos aniónicos) en la superficie de la membrana celular, las bacteriocinas desestabilizan la membrana, estas se adsorben

inespecíficamente a células sensibles, a resistentes y a las mismas células productoras. (Martínez, 1996). (Figura 4)

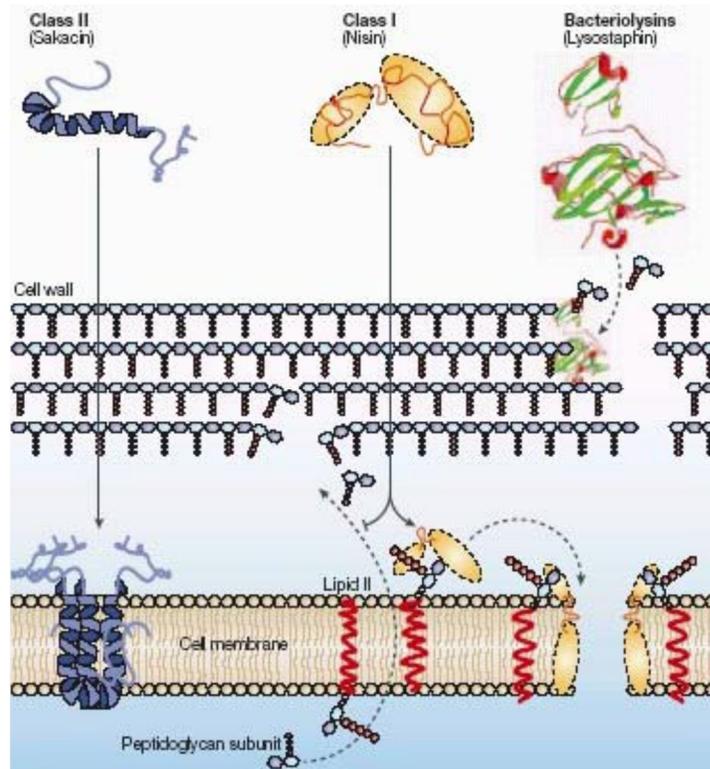


Figura 4. Modo de acción de las bacteriocinas (Alquicira, 2006)

2.7. Clasificación

Según (De la fuente, (2009), Romero del Castillo *et al.*, (2004)) se clasifican en las siguientes clases:

Clase I. Lantibióticos: se denominan así porque tienen péptidos pequeños de <5 kDa (kilodaltons) que contienen deshidroaminoácidos y tioéter aminoácidos (lantionina y metil-lantionina). Estos se forman por una modificación posterior a la traducción.

La transformación es debida a la deshidratación de los aminoácidos treonina y serina, a los que posteriormente se les adicionan átomos de azufre, procedentes a la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. (e.j. nisina). Esta clase se subdivide en:

Lantibióticos Tipo A: son péptidos largos con carga neta positiva que ejercen su actividad formando poros en las membranas bacterianas.

Lantibióticos Tipo B: son péptidos globulares más pequeños sin carga o con carga negativa y su actividad antimicrobiana se relaciona con la inhibición de enzimas específicas.

Clase II. No Lantibióticos: son péptidos activos que actúan sobre la membrana citoplasmática, se caracterizan por poseer algunos aminoácidos que no contienen lantionina, son termoestables y pequeños (<10 kDa), representan el grupo más grande de bacteriocinas que se subdivide en 3 grupos:

Clase IIa: incluye péptidos como la pediocina con actividad anti-Listeria.

Clase IIb: comprende bacteriocinas que requieren un sistema de dos péptidos diferentes para ejercer actividad antimicrobiana.

Clase IIc: corresponde a bacteriocinas secretadas por el sistema sec-dependiente.

Clase III: Incluye péptidos grandes (30 kDa) y termolábiles característica de interés en alimentos. (Se inactivan con tratamientos térmicos de 60-100⁰C durante 10-15 minutos). La mayoría de estas bacteriocinas son producidas por especies del genero *Lactobacillus*.

Clase IV: bacteriocinas complejas no caracterizadas.

Cuadro 3. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas (BAL)

Bacteriocina	Microorganismo productor	Referencia
Clase I Tipo A Lantibioticos		
Nisina	<i>Lactococcus lactis</i>	Hurst, 1981
Lactocina S	<i>Lactobacillus sake</i>	Mortvedt y col.,1991
Epidermina	<i>Staphylococcus epidermis</i>	Allgaier y col.,1986
Gallidermina	<i>Staphylococcus gallinarium</i>	Kellner y col.,1988
Lactacina 481	<i>Lactococcus lactis</i>	
Clase I Tipo B Lantibioticos		
Mersacidina	<i>Bacillus subtilis</i>	Altena y col, 2000
Cinnamycina	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	Sahl y col., 1998
Ancovenina	<i>Streptomyces ssp.</i>	Sahl y Bierbaum 1998
Duramycina	<i>S. cinnamoneus</i>	Sahl y Bierbaum 1998
Actagardina	<i>Actinoplanes ssp</i>	Sahl y Bierbaum 1998
Clase IIa		
Pediocina PA-1/AcH	<i>Pediococcus acidilacti</i>	Henderson y col., 1992; Motlagh y col., 1992
Sakacina A	<i>L. sake</i>	Holck y col.,1992
Sakasina P	<i>L. sake</i>	Tichaczek y col.,1992
Leucocina A-UAL 187	<i>Leuconostoc gelidum</i>	Hastings y col.,1991
Mesentiricina Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Hechard y col.,1992
Enterocina A	<i>Enterococcus faecium</i>	Aymerich y col., 1996
Divercina V41	<i>Carnobacterium divergencis</i>	Metivier y col.,1998
Lactococcina MMFII	<i>L. lactis</i>	Ferchichi y col., 2001
Clase IIb		
Lactococcina G	<i>L. lactis</i>	Nissen-Meyer y col.,1992
Lactococcina M	<i>L. lactis</i>	Van Belkum y col.,1991
Lactacina F	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Allison y col., 1994
Plantaricina A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Nissen-Meyer y col.,1993
Plantaricina S	<i>L. plantarum</i>	Jimenez-Diaz y col.,1995
Plantaricina EF	<i>L. plantarum</i>	Anderssen y col.,1998
Plantaricina JK	<i>L. plantarum</i>	Anderssen y col., 1998
Clase IIc		
Acidocina B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leer y col.,1995
Carnobacteriocina A	<i>Carnobacterium piscícola</i>	Worobo y col., 1994
Divergicina A	<i>C. divergens</i>	Worobo y col., 1995
Enterocina P	<i>E. faecium</i>	Cintas y col., 1997
Enterocina B	<i>E. faecium</i>	Nes y Holo 2000
Clase III		
Helveticina J	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Joerger y Klaenhammer 1986
Helveticina V-1829	<i>L. helveticus</i>	Vaughan y col., 1992

Modificado de Chen y Hoover, 2003

2.8. Antecedentes

El primer reporte de investigación de la acción antimicrobiana de las bacteriocinas se dio a conocer cuando se descubrió un antagonismo entre cepas de *Escherichia coli* que desde entonces fueron denominadas colicinas. Hasta 1928 se descubrió que ciertas cepas de *Lactococcus* empleadas en la fabricación de quesos producían un efecto inhibitor del crecimiento de otras BAL y también podían inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos y los que podían alterar la conservación del queso.

En el año de 1933 se denominó nisina por primera vez a la sustancia de naturaleza peptídica con actividad antimicrobiana producida por cepas de *Lactococcus lactis subs. lactis*. En 1953 se comercializó por primera vez en Inglaterra, en 1969 se aprobó su uso en alimentación por la OMS (organización mundial de la salud) y en 1983 se incluyó en la lista de aditivos de la U.E. con el número E234; poco después, en 1988, fue aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) norteamericana.

La nisina se puede adquirir con nombre de Nisaplin^R (Danisco) y consiste básicamente en un preparado que contiene un 2.5% de nisina, con NaCl (77.5%) y leche descremada en polvo (12% proteína y 6% carbohidratos). El producto Nisaplin ND (non-dairy nisin) no contiene las proteínas lácteas, lo cual favorece su solubilidad en medio acuoso, contiene un 6.25% de nisina, NaCl (90%), carbohidratos (2%) y proteína (aproximadamente un 3%). Se utiliza en la reparación de productos lácteos (especialmente quesos), embutidos, huevo líquido, zumos y alimentos enlatados.

Su actividad cubre un espectro amplio de bacterias Gram positivas, entre las que cabe destacar *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*

2.9. Técnicas de Producción y purificación de bacteriocinas

(Yang *et al.*, 1992) desarrollaron una serie la técnica que se describe de la siguiente manera:

Si se ajusta el pH del caldo de cultivo de una cepa productora, después de un tratamiento térmico para inactivar la función de biológica de las células, a un valor que ocurre la adsorción de la bacteriocina a la superficie celular (usualmente pH 6 a 6.5) se permite la separación de las moléculas (adsorbidas en las células) del caldo de cultivo por simple centrifugación. Posteriormente los péptidos son liberados selectivamente de las células a pH's bajos (1.5 a 2.0), siendo péptidos con alta potencia y en forma más concentrada.

Este mismo método fue utilizado por (Aguado, 2010) quien obtuvo el extracto crudo de bacteriocina en un cultivo de 16 horas de *Enterococcus faecium*, el cual fue sometido a un tratamiento térmico a 70°C durante 30 minutos para la inactivación de proteasas, seguido de una centrifugación a 3100 rpm durante 10 minutos a 4°C., se ajustó el pH a 6 y después se sometió a liofilización a -20°C hasta su uso.

2.10. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por bacteriocinas

2.10.1. Antibiogramas

Se realizan técnicas como la de difusión en discos en los que se adiciona la bacteriocina en un pocillo realizado en un medio de cultivo sólido o sobre discos de papel que se colocan sobre Agar pre-inoculado con una cepa indicadora. (De la fuente, 2009). Se pueden colocar hasta 5 discos en una placa de 100 mm, se incuban según el tiempo y temperatura determinados, posteriormente realizando la medición de las zonas de Inhibición con luz transmitida. (Stephen *et al.*, 2005).

Trabajos realizados por (Zapata *et al.*, 2009) que evaluaron la actividad bactericida de *Lactobacillus plantarum* con el método de difusión en disco en agar Mueller-Hilton inoculado con la cepa indicadora correspondiente. En la superficie de agar se depositaron discos de papel filtro de 7 mm de diámetro y tamaño de poro de 100µm, previamente esterilizados. Los discos se impregnaron con 20µl de la solución y las cajas se incubaron durante 18 horas a 37°C. La actividad se expresó como la diferencia en milímetros entre el radio del halo de inhibición y el radio del disco de papel filtro. Manejando como cepas indicadoras: *Lactobacillus brevis*, *Klebsiella sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* y *Serratia marcescens*, *Salmonella tify* (ATCC 6539), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 1395) y *Escherichia coli* (ATCC 25922).

2.10.2. Métodos enzimáticos

Estudios realizados por (Morgan *et al.*, 1995) mencionan que se realiza la medición de enzimas liberadas del interior celular después de la lisis producida por la acción de las bacteriocinas. Por ejemplo, se han observado elevados niveles de lactato deshidrogenasa después de la lisis de células susceptibles a Lactocina. Son eficaces sin embargo su precisión se ve comprometida por la calidad de preparaciones crudas de las bacteriocinas que pueden estar contaminadas con otros enzimas antes de analizarse y puede generar resultados positivos falsos.

2.11. Bacteriocinas como conservador de alimentos

Muchos autores aseguran que la aplicación de bacteriocinas en la conservación de alimentos resulta más efectiva si se hace en combinación con otras barreras antimicrobianas (pH, temperatura de almacenamiento, empaque al vacío, atmosferas, tratamientos térmicos) que detienen el desarrollo de microorganismos patógenos o los que causan el deterioro del alimento. A mayor barrera, mayor es la dificultad de sobrevivir de estos. (Núñez, *et al.*, 2007)

Las bacteriocinas además de presentar actividad antibacteriana presenta actividad antifúngica, presentan características como resistencia a bajos pH's, altas temperaturas, solubilidad y actividad de agua (aw) que son factores de interés en el procesamiento de alimentos. (De la fuente, 2009).

2.12. Bacterias patógenas Familia Enterobacteriaceae

Especies de este tipo de microorganismos están adaptadas al medio ambiente en el agua y la tierra, en los vegetales, al tubo digestivo de animales. Otras están adaptadas al hombre como *Salmonella typhi*. Algunas de las que no están adaptadas al tubo digestivo del hombre pueden colonizar transmitiéndose mediante la ingesta de agua o alimentos contaminados, presentando resistencia a antibióticos.

Especies de bacterias como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsellia pneumoniae* son patógenas para el hombre debido a factores de virulencia codificados en bacteriófagos, plasmidos o islas de patogenicidad. Entre las cuales se incluyen adhesinas, hemolisinas y otras toxinas con el factor citotóxico de necrosis (CNF) a los antígenos capsulares. (Ausina *et al.*, 2005)

2.12.1. *Salmonella typhi*

Bacteria patógena causante del padecimiento fiebre tifoidea que presenta fiebre alta, cefalea, anorexia, estreñimiento, diarrea. La transmisión de esta bacteria al organismo es a través de la ingesta de alimentos contaminados por contacto con heces fecales, aguas contaminadas. (Instituto de salud pública, Chile). Son bacterias mesofilicas que crecen en un rango de temperatura de 25°C a 40°C, pero su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, pH 7. (UANL).

2.12.2. *Escherichia coli*

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae, su hábitat natural es el intestino del hombre y de animales, también en la leche, agua y suelo. Es un microorganismo Gram (-) inmóvil o móvil con flagelos peritricos, no esporulado. Crecen en un tiempo de 24 horas a 37°C. Aerobio y anaerobio facultativo producen CO₂ y ácidos con olor fétido, producen toxinas por lo tanto es enterotóxica, no resisten la pasteurización.

2.12.3. *Enterobacter aerogenes*

Especies de *E. Aerogenes* son causantes del padecimiento meningitis neonatal y sepsis, generan infecciones en el tracto urinario, heridas y neumonía. (Romero, 2007). Son bacterias de forma bacilar clasificación Gram (-) no formadores de esporas de 0.3-3 µm. Son microorganismos aerotolerantes, fermentan la glucosa y son citocromo oxidasa-negativos, crecen en medios como MacConkey. Tiempo de crecimiento durante las 24 hrs de incubación se observan colonias desarrolladas. (Ausina *et al.*, 2005)

2.12.4. *Klebsellia Pneumoniae*

Muchas bacterias de este género son capsuladas, se localizan en las vías respiratorias y en el tubo intestinal del hombre, causante de neumonía etiología bacteriana en las personas.

2.12.5 *Proteus mirabilis*

Se le atribuye la producción de la alteración de carnes, pescado, en los mariscos, y en los huevos produciendo una intoxicación alimentaria. Son microorganismos patógenos Gram (-), patógeno de las vías urinarias nosocomiales. (Ausina *et al.*, 2005).

Capítulo 3

3.1. MATERIALES Y METODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Ubicada en la colonia Buenavista, Municipio de Saltillo en el Estado de Coahuila, México.

3.2. Etapa 1. Aislamiento, purificación, identificación y conservación de cepas de bacterias lácticas.

3.2.1. Obtención de cepas de bacterias lácticas.

Se seleccionaron diez cepas de bacterias lácticas del cepario del Departamento de Ciencia y Tecnología de la UAAAN identificadas como BSI, LRR.3, LRR, BD, BDL, LCI, LC2, X, XE, Y BAA, aisladas de leche de vaca, cabra y materna (cuadro 4).

Cuadro 4. Origen de cepas de bacterias lácticas.

cepa de bal	Origen
BSI	LECHE MATERNA
LRR.3	LECHE MATERNA
LRR	LECHE MATERNA
BD	LECHE MATERNA
BDL	LECHE MATERNA
LCI	LECHE DE CABRA
LC2	LECHE DE CABRA
X	LECHE DE VACA
XE	LECHE DE VACA
BAA	LECHE MATERNA

3.2.2. Aislamiento

El aislamiento de bacterias lácticas se realizó en placas con 15 mililitros de agar MRS con un pH de 4.5, inoculando colonias seleccionadas por el método de estria abierta cruzada, para la obtención de colonias aisladas (figura 5).



Figura.5 Aislamiento en campana de flujo laminar e Imagen de Cepa BDL aislada en Agar MRS

Las placas inoculadas se sometieron en reactores en condiciones de anaerobiosis con aplicación de nitrógeno para el desplazamiento del oxígeno. La incubación se realizó a una temperatura de 37°C, por un tiempo de 24 horas (figura 6).



Figura 6. Inyección de Nitrógeno y Reactores en Incubación a 37°C.

3.2.3. Purificación e identificación microscópica y morfológica.

De cada cepa aislada se tomaron tres colonias aisladas, cada colonia se inoculó por estria abierta cruzada en una caja Petri conteniendo agar MRS con un pH de 4.5, de tal manera que se obtendrían cepas puras. Seguido de su incubación en anaerobiosis, se realizó la identificación microscópica (por triplicado) por el método de Tinción Gram (anexo 1). Observando en un microscopio óptico su morfología y clasificación (figura 7).

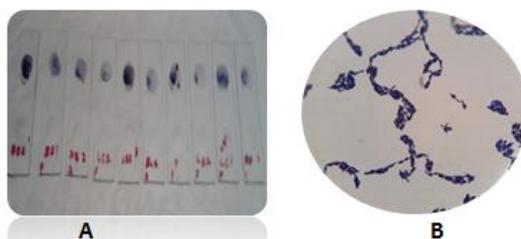


Figura 7. Tinción Gram de BAL e Identificación morfológica de BAL.

3.2.4. Conservación de bacterias lácticas

Las cepas ya purificadas e identificadas como bacterias lácticas, se cultivaron en reactores estériles de 30 ml conteniendo 15 ml de caldo MRS a pH de 4.5, inoculados con una colonia individual de cada cepa, en condiciones de anaerobiosis con nitrógeno inyectado, incubados a 37⁰C por 24 horas.

Se conservaron por congelación a una temperatura de -22⁰C en tubos eppendorf conteniendo 500 µl de conservador (composición: leche descremada 10% y Glicerol 10%, figura 8) y 500 µl de cultivo.



Figura 8. Conservador (leche descremada 10% y glicerol 10%)

3.2.5. Método de preparación de medio de cultivo MRS (Man, Rogosa y Sharpe, 1960)

Es el medio de cultivo más utilizado para el cultivo de bacterias lácticas, el cual se preparó de la siguiente manera:

Todos los reactivos indicados en el cuadro de la composición de MRS (anexo 2), se pesaron en una balanza analítica, posteriormente se mezclaron en un matraz Erlenmeyer, disolviendo con un litro de agua destilada calentándolo a 100°C con la ayuda de una parrilla eléctrica y agitador magnético, añadiendo 1 ml del reactivo Tween 80. Seguido de su esterilización en autoclave a 121°C por 15 minutos aplicando 15 lb de presión, luego se enfrió y se colocó en cajas Petri para cultivo en Agar o en reactores para cultivo en Caldo MRS (figura 9).

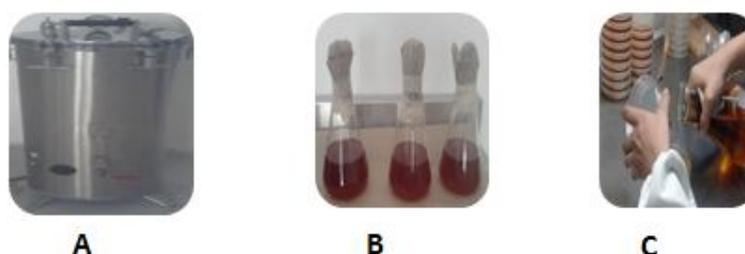


Figura 9. Autoclave, Caldo MRS, Agar MRS

3.3. Etapa 2. Cultivo de bacterias patógenas

Las cinco cepas de bacterias patógenas: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*, *Klebsellia pneumoniae* y *Enterobacter aerogenes*, fueron donadas por el Centro de Microbiología Aplicada (CEMAP) (figura 10).

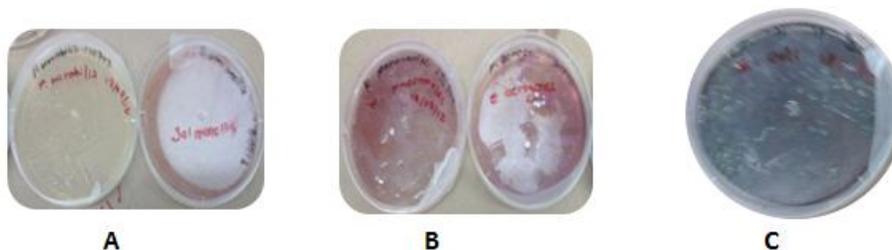


Figura 10. *P. mirabilis*, *Salmonella typhi*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *E. coli*

3.3.1. Cultivo en medio agar y caldo nutritivo

Los cinco microorganismos patógenos se cultivaron en cajas de Agar (por triplicado) inoculados con un asa bacteriológica por el método de estriado y también cultivados en reactores con 15 ml de caldo nutritivo, con incubación a 37⁰ C. a un pH de 6.8 ±0.2 en un tiempo de 24 horas.

La metodología de preparación del medio agar nutritivo se realizó mezclando los siguientes reactivos mostrados en el cuadro 5, disueltos en un litro de agua destilada y posterior esterilización en autoclave.

Cuadro 5. Composición de Agar Nutritivo (g/L).

Reactivo	g/L
1. Peptona de Carne	5
2. Extracto de Carne	3
3. Agar Bacteriológico	15

Fuente: MCD LAB. S.A. DE C.V.

Para la preparación de Caldo Nutritivo solo se concentraron los dos primeros reactivos indicados en el cuadro anterior y su esterilización a 121⁰C por 15 min aplicando 15 lb de presión (Figura 11).



A



B

Figura 11. Caldo nutritivo y cultivo de bacterias patógenas en caldo nutritivo

3.3.2. Conservación de bacterias patógenas

Se conservaron por congelación a una temperatura de -22°C en tubos Eppendorf conteniendo 500 μl de conservador (composición: leche descremada 10% y Glicerol 10%) y 500 μl de cultivo en caldo Nutritivo.

3.3.3. Medios de cultivo para bacterias patógenas: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *E. aerogenes*, *Klebsellia pneumoniae*, *Proteus mirabilis*.

Agar Mc conkey

Medio de cultivo utilizado para especies de la familia Enterobacteriaceae, utilizado para el aislamiento de bacilos Gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, con poder de mostrar aquellos microorganismos Capaces o no de fermentar lactosa. (Custodio, 2009).

La fórmula del medio de cultivo comprende los reactivos que se muestran en el cuadro 6.

Las bacterias de esta familia presentan una cierta morfología que las caracteriza, además de presentar diferente tamaño de colonias, bordes, consistencia, aspecto, elevación, color y forma (cuadro 7).

Cuadro 6. Fórmula Medio Agar Mc Conkey

Reactivo	g/L	Instrucciones de uso
Peptona	17	Disolver en un litro de agua destilada, reposar 5 minutos y mezclar uniformemente. Medir pH 7 ± 0.2 . Calentar a 100°C . Esterilizar a 121°C por 15 min.
Pluripeptona	3	
Lactosa	10	
Mezcla de sales biliares	1.5	
Cloruro de sodio	5	
Agar	13.5	
Rojo Neutro	0.03	
Cristal Violeta	0.01	

Fuente: (Custodio, 2009)

La Incubación se lleva a cabo durante 18 a 48 horas de 35 a 37°C en atmosfera aeróbica.

Cuadro 7 .Características de Colonias de bacterias patógenas.

Microorganismos	Colonias
<i>Escherichia coli</i>	Rojas con halo Rubio
<i>Klebsellia pneumoniae</i>	Rosadas mucosas
<i>Salmonella typhi</i>	Incoloras transparentes
<i>Proteus mirabilis</i>	Incoloras transparentes

Fuente: (Custodio, 2009)

Otros Medios de cultivo: Agar nutritivo, Agar-eosina-azul de metileno, Medio endo, Medio triple azucarado de krumwiede, Medio de Wilson y Blair, Leche tornasolada. (Bryan *et al.*, 1974).

3.4. Etapa 3. Obtención de bacteriocinas y evaluación del efecto antimicrobiano de bacteriocinas contra cepas de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *E. aerogenes*, *Klebsellia pneumoniae*, *Proteus mirabilis*.

3.4.1. Cultivo de bacterias lácticas en caldo MRS

Se tomó una colonia aislada de cada una de las diez cepas purificadas de bacterias lácticas, la cual fue inoculada en 15 ml de caldo MRS contenido en un reactor estéril inyectándolo con Nitrógeno para condiciones de anaerobiosis, incubados a 37°C a diferentes tiempos: 24, 48, 72 y 96 horas (figura 12).



Figura 12. Inoculación de bacterias lácticas en Caldo MRS e Incubación

3.4.2. Extracción de bacteriocinas.

La separación de bacteriocinas de células de bacterias lácticas se realizó por centrifugación y filtración mediante el siguiente procedimiento:

Apartir de cada uno de los reactores que contenían el cultivo láctico y en condiciones estériles, se tomó un volumen de 10 ml del cultivo en caldo MRS con una probeta graduada estéril, seguido se sometió en tubos de vidrio pyrex para centrifugar a 3400 rpm por 15 min. Como último paso se esterilizo el líquido por filtración por membranas con un poro de 0.45 μm , con el fin de desechar el precipitado formado por células, ajustando el pH a 6.0 con una solución de NaOH 0.1 N (figura 13).



Figura 13. Fotografías: Fermentación en MRS, centrifugación, filtración por membrana

Para la obtención de bacteriocinas con capacidad inhibitoria, técnica realizada mediante la fermentación del medio de cultivo MRS por las bacterias lácticas obtenidas de las cepas LCI, BD, BDL, BAA, LRR, LRR.3, BSI, X, XE, LC2, con la cual se realizaron pruebas preliminares de producción a diferente tiempo (24, 48, 72 y 96 hrs). Poniéndolas a prueba contra bacterias patógenas mediante la preparación de antibiogramas por el método de difusión en disco para pruebas de susceptibilidad como lo define la literatura reportada por el autor (Stephen *et al.*, 2005).

3.4.3. Preparación de antibiogramas

Se prepararon antibiogramas por el método de difusión en disco el procedimiento se llevó acabo de la siguiente forma:

Se cortaron discos de papel filtro de poro cerrado con un diámetro de 0.4mm con un grosor de 3mm y se sumergieron por 15 minutos en 10 ml del extracto de las

bacteriocinas en una caja Petri. Posteriormente se inoculo por estriado homogéneo, una colonia de una cepa de bacterias patógenas en toda una caja de agar nutritivo, después se introdujo cuatro discos ya impregnados con el extracto sobre la placa de forma equidistante y se incubo a 37⁰C por 24 horas

Antibiogramas realizados por el Método de difusión en disco elaborados por triplicado.

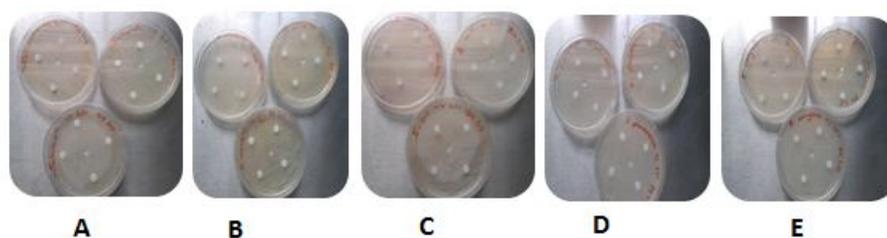


Figura 14. Antibiogramas contra *Salmonella typhi*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*

3.4.4. Medida de halo de inhibición.

Se midió el diámetro en milímetros de cada halo de inhibición y registrando su valor en una hoja de datos de Excel (figura 15).

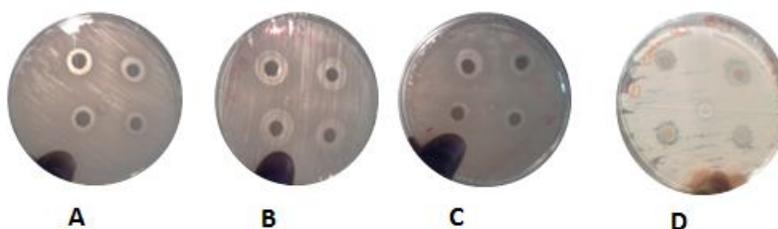


Figura 15. Halos de Inhibición medidos en milímetros.

Capítulo 4

4.1. RESULTADOS Y DISCUSION

Siguiendo el orden de la metodología descrita en el capítulo anterior a continuación se describen los resultados obtenidos.

4.2. Etapa 1. Resultados de Aislamiento, purificación, identificación y conservación de cepas de bacterias lácticas.

Se obtuvo como resultado de esta primera etapa el aislamiento de las diez cepas de bacterias lácticas con código LCI, LC2, BSI, BD, BDL, BAA, LRR.3, LRR, X, XE por el método de estria abierta cruzada, técnica utilizada para aislar cultivos puros y permitir que crezcan en forma de colonias individuales logrando la purificación de las cepas de bacterias lácticas y su conservación realizada manejando glicerol a una concentración del 10% o bien como describe el (Departamento de bioquímica y biología molecular y celular, Universidad de Zaragoza, 2004) se puede utilizar al 20% logrando su conservación por meses. En el cuadro 8 se muestran los resultados de la identificación microscópica y morfológica obtenidos observando al microscopio.

Cuadro 8. Identificación microscópica y morfológica de BAL

CEPA	CLASIFICACIÓN	FORMA
LRR.3	Gram (+)	Bacilo
BDL	Gram (+)	Bacilo
X	Gram (+)	Bacilo
LC2	Gram (+)	Cocos
XE	Gram (+)	Cocos
BSI	Gram (+)	Cocos
BAA	Gram (+)	Cocos
LCI	Gram (+)	Cocos
LRR	Gram (+)	Bacilo
BDL	Gram (+)	Cocos

Se apreciaron bacterias lácticas con morfología Gram (+) en forma de bacilo y coco (Figura 16). Según los criterios que define (Alais, 2005) este tipo de microorganismos lácticos presentan estas características.

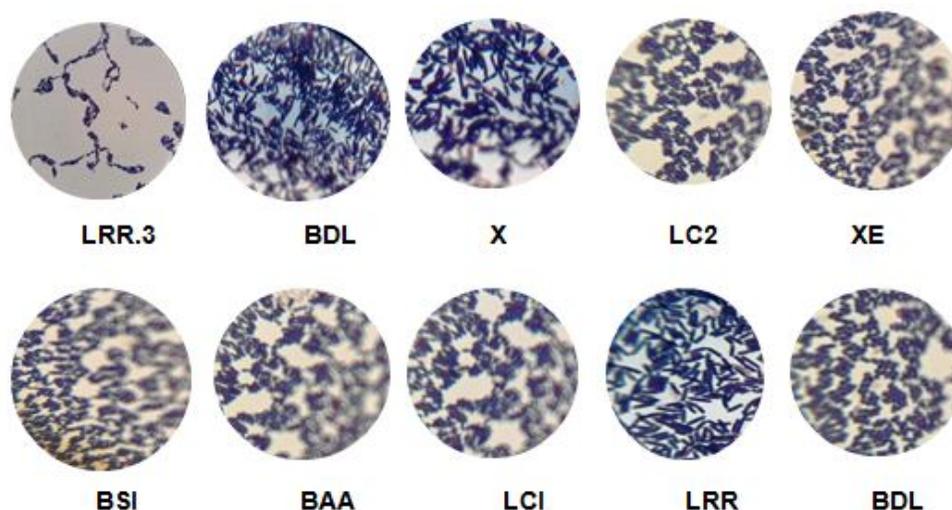


Figura 16. Imágenes que demuestran la viabilidad de las cepas de estudio.

De esta manera se comprueba de manera efectiva y real la identidad morfológica de las BAL, como menciona (Brock, 1978 y García, 2006).

4.3. Etapa 2. Resultados del cultivo de bacterias patógenas

Se logró obtener abundante crecimiento de *Salmonella typhi*, *Klebsellia pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*, en el medio de cultivo Agar Nutritivo en un tiempo de 24 horas, esto depende de que en el medio existan carbohidratos como fuente de carbono, ácidos orgánicos, y aminoácidos como sustratos, en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, simplemente porque este tipo de microorganismos son anaerobios facultativos. La fermentación de azúcares, la presencia de gas y ácido pirúvico son productos clave para el diagnóstico de estos microorganismos (Pachón, 2009).

Se obtuvieron un total de 15 cajas de medio agar con crecimiento de colonias aisladas de bacterias patógenas: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *E. aerogenes* y *Klebsellia pneumoniae*

Las cuales seleccionaron para realizar las evaluaciones posteriores de inhibición por bacteriocinas.

Además de ser conservadas para su posterior estudio.

4.4. Etapa 3. Obtención de bacteriocinas y evaluación del efecto antimicrobiano de bacteriocinas contra cepas de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *E. aerogenes*, *Klebsellia pneumoniae*, *Proteus mirabilis*.

El extracto de bacteriocinas libre de células obtenidas por centrifugación y seguido de filtración por membrana de poro de 0.45µm mostro efecto antibacterial de las bacterias indicadoras *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsellia pneumoniae* y *Proteus mirabilis*. Con respecto al tiempo como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 9. Diámetro de halos de inhibición en milímetros promedio obtenidos respecto al tiempo de producción de bacteriocinas.

BAL	<i>Salmonella Typhi</i> (mm)	t	<i>E. Coli</i> (mm)	t	<i>E. Aerogenes</i> (mm)	t	<i>K. Pneumoniae</i> (mm)	t	<i>P. Mirabilis</i> (mm)	t
X	11.16	48	10.16	72	12.5	96	9.66	48	11.6	96
BD	12.83	48	10.75	96	11.33	48	11.33	96	16.9	96
BDL	11.33	72	10.5	48	10	48	10	48	10.25	48
LCI	10.33	48	10.19	96	10	72	10	48	16.8	96
LC2	11.16	96	10.58	72	12	96	10.75	72	11.75	72
LRR.3	10.41	72	10	48	10	48	9.5	48	14	72
LRR	11.5	96	11	96	11.16	96	11.41	96	11.16	96
BSI	10.5	48	9.33	48	10	96	10.33	96	14	96
BAA	10.5	48	11	96	10.6	96	11.58	96	14	96
XE	12.33	96	10.33	96	10.3	96	10.25	96	12.25	96

Se observa que a mayor tiempo de la fermentación del medio de cultivo por BAL hay producción de bacteriocinas con potencial antimicrobiano contra las bacterias patógenas *Salmonella typhi* presenta mayor sensibilidad a la bacteriocina

producida por cepa BD en un tiempo de 48 horas, presentando un halo de inhibición de 12.83 mm. *E. Coli* presenta mayor inhibición por bacteriocinas producidas por cepas de BAL LRR y BAA en un tiempo de 48 horas con un halo de inhibición de 11 mm. Existe mayor inhibición de *Enterococcus aerogenes* por la bacteriocina producida por la cepa identificada como X a 96 horas presentado un halo de inhibición de 12.5 mm. Para el caso de *K. pneumoniae* la bacteriocina producida por la cepa BAA a 96 horas delimita su crecimiento con un halo de inhibición de 11.58 mm, se aprecia una mayor Inhibición de *P. mirabilis* cuando se producen por las cepas BD y LCI a 96 horas, presentando un diámetro del halo de inhibición de 16.9 y 16.8 mm

Como se puede apreciar existe mayor efecto inhibitorio por bacteriocinas que producen las bacterias lácticas aisladas de leche materna, como lo especifica (Vanegas *et al.*, 2010) que demostró que la especie de *Bifidobacterium sp.* aislada de leche materna ejerció efecto antagonista contra patógenos, siendo *Escherichia coli* ATCC 25922 el más inhibido, *Salmonella enteritis* ATCC 13076, y *E. coli* 0157:H7 ATCC 35150 también mostraron susceptibilidad, con ensayos de difusión en placa.

Concluyen que esta especie de bacteria láctica cumple con una función protectora de recién nacidos y con potencial de uso como bioconservador de alimentos, puede ser que las bacterias de estudio se traten de la especie de *Bifidobacterium*.

(Zapata *et al.*, 2009) Demostraron que el extracto crudo libre de células de *Lactobacillus plantarum* LPBM110 obtenido por centrifugación, mostro un efecto antibacterial frente a *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsellia sp.* Además menciona que la actividad antimicrobiana de los extractos de bacteriocinas frente a bacterias Gram (-) es de especial interés ya que pocos extractos de bacterias acido lácticas han mostrado actividad antimicrobiana contra este grupo de bacterias.

4.4.1. Curvas de comportamiento producción de bacteriocinas e Inhibición de cepas de *Salmonella typhi*, *Klebsellia pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Enterobacter aerogenes*.

En la figura 17 Se muestran las curvas del comportamiento de inhibición por bacteriocinas producidas por la cepa de BAL identificada como LCI respecto al tiempo de producción.

Se observa en las curvas que las bacteriocinas producidas a 24 horas por la cepa LCI donde *E. Coli* presenta diferencia significativa de inhibición respecto a *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*, *Klebsellia pneumoniae* y *E. aerogenes*, que tienen un rango de inhibición similar desde 3 a 6.5 mm medida del diámetro del halo de inhibición con diferencia no significativa. Durante la producción a las 48 horas se aprecia que las bacteriocinas de LCI inhiben a las cinco bacterias patógenas en un rango de diámetro del halo de inhibición desde 9 a 10.66 mm con una diferencia no significativa. Para las 72 horas disminuye la actividad antimicrobiana pero el rango de inhibición no tiene diferencia significativa el rango va desde 9.4 a 9.75 mm de diámetro del halo de inhibición y a las 96 horas de producción sigue la inhibición con la misma tendencia para *Salmonella typhi*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae* a diferencia de *P. mirabilis* que tiene mayor inhibición presentando un halo de 16.625 mm. Por lo tanto si se desea crear un producto que ataque efectivamente *P. Mirabilis* se tendrá que producir bacteriocinas con 96 horas de fermentación lo que implicaría altos costos de producción.

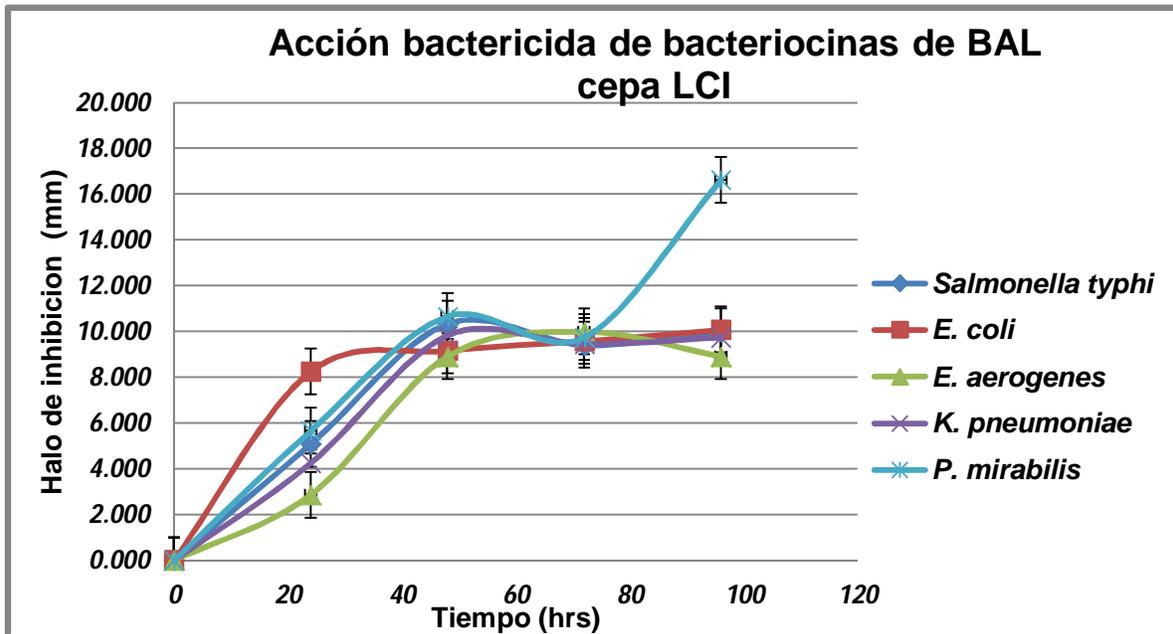


Figura 17. Inhibición de cepas patógenas por bacteriocinas producidas por la cepa de BAL LCI

La cepa de bacterias lácticas identificada como BSI produce a las 24 horas bacteriocinas que inhiben *E. aerogenes*, *E. coli*, *P. mirabilis* y *Salmonella typhi* con una diferencia no tan significativa presentando un halo de inhibición dentro del rango 4 a 8 mm, en el caso de *K. pneumoniae* presenta sensibilidad casi nula a las bacteriocinas producidas en este tiempo.

A las 48 horas de producción existe inhibición de las cinco bacterias patógenas con una diferencia no significativa pues se ubica dentro de los valores cercanos entre 8 y 10 mm del halo de inhibición, a las 72 horas las curvas de inhibición de patógenas desciende siguiendo un rango similar sin existir diferencia significativa hasta las 96 horas a diferencia de la sensibilidad de *P. mirabilis* que presento mayor sensibilidad con un halo promedio de inhibición de 14.41 mm

En este caso es recomendable producir bacteriocinas por la BAL BSI a 48 horas, debido a que a las 72 y 96 horas siguen un comportamiento de inhibición dentro del mismo rango a diferencia de *Proteus mirabilis* que es más inhibida a las 96 horas (Figura 18).

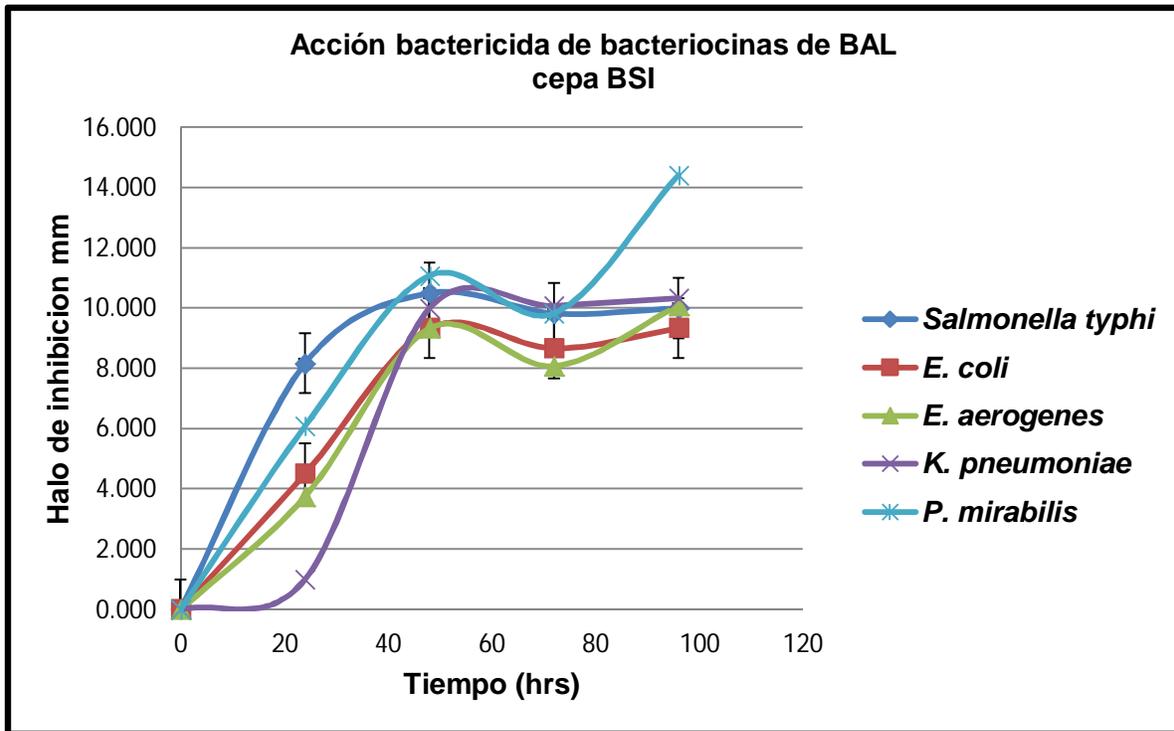


Figura 18. Inhibición de cepas patógenas por bacteriocinas producidas por la cepa BSI

Las BAL de la cepa identificada como X que produjeron bacteriocinas a las 24 horas de producción, lograron su acción antagonista frente a las bacterias patógenas *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. coli* y *Salmonella typhi* con un halos de inhibición de 7 a 8 mm, sin embargo a *E. aerogenes* no presento sensibilidad satisfactoria, se aprecia el incremento de sensibilidad a las 48 horas de producción con una diferencia no significativa la medida del halo de inhibición va desde 9 a 11 mm de diámetro, *E. aerogenes* y *K. pneumoniae* sigue siendo sensible a las 72 horas en comparación de *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis* y *E. coli* oponen resistencia pero no significativa hasta cuando se aplican las bacteriocinas producidas a 96 horas es cuando presentan nuevamente sensibilidad a excepción de *E. coli*. (Figura 19)

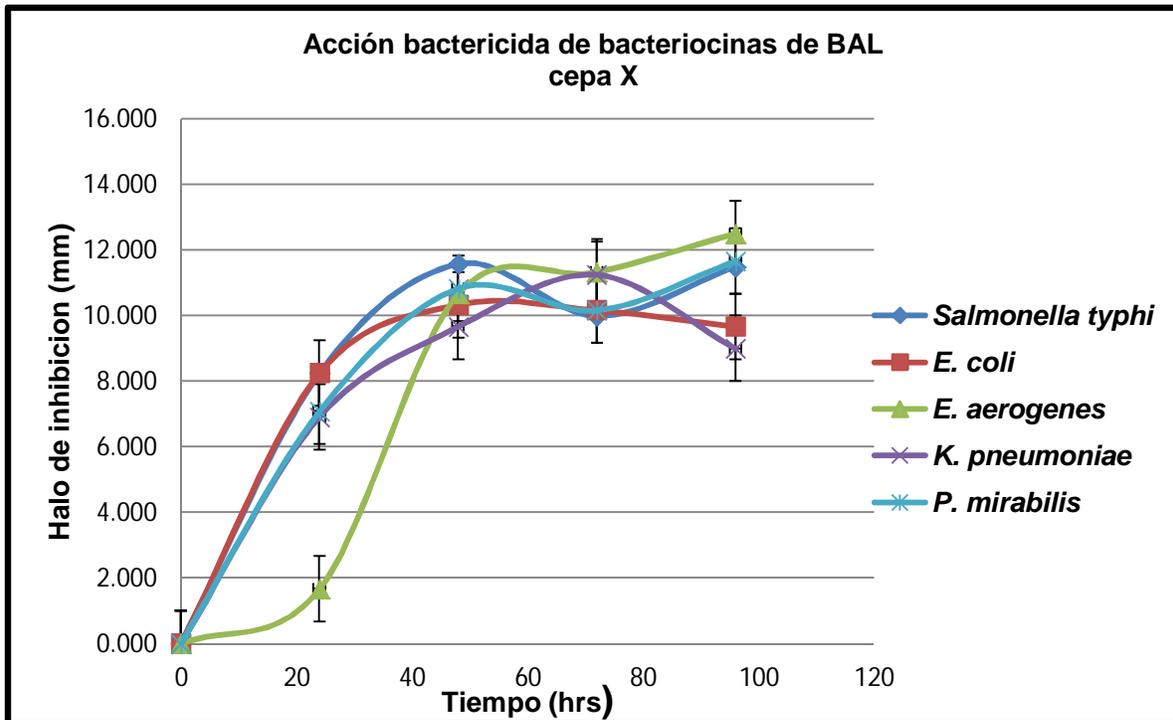


Figura 19. Inhibición de cepas patógenas por bacteriocinas producidas por la cepa X

Las bacteriocinas de la cepa XE son capaces de ejercer mayor efecto de inhibición contra *Salmonella typhi* y *Proteus mirabilis* cuando estas son producidas dentro de las 96 horas de fermentación del medio MRS con un halo de inhibición de 12 mm, aunque también a las 72 horas la inhibición se da dentro de los mismos valores del rango, a diferencia de las producidas a 24 y 48 horas que si presentan diferencia significativa (Figura 20).

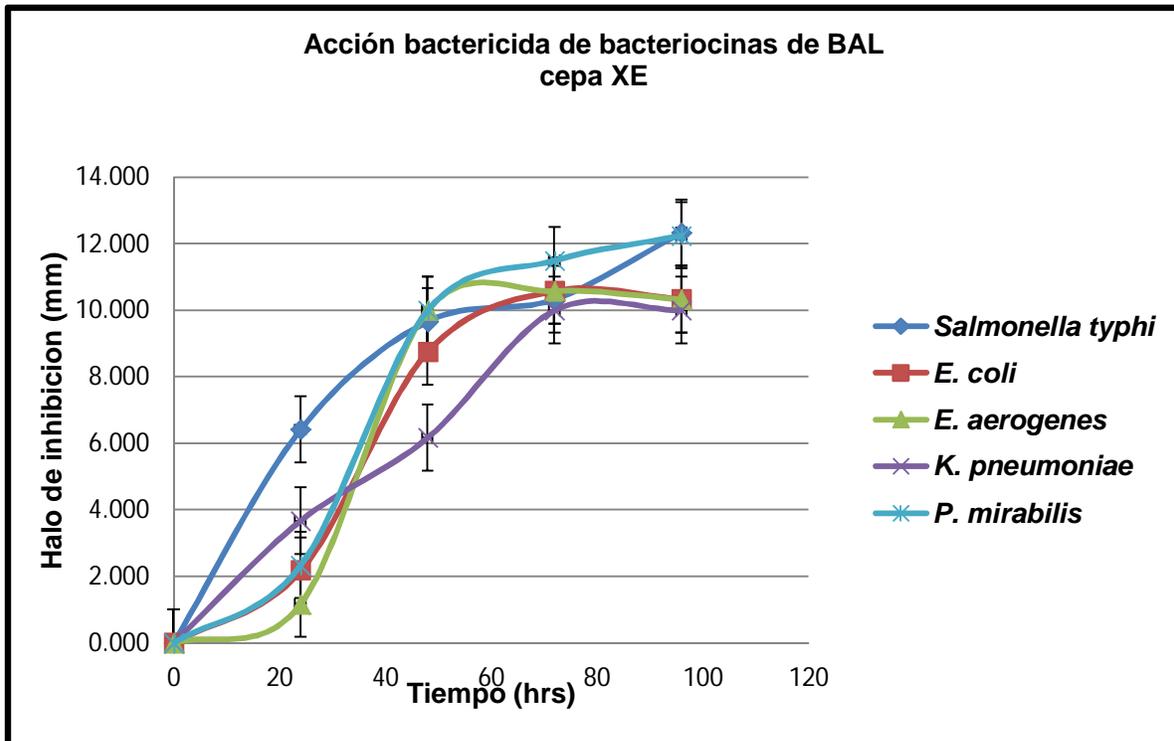


Figura 20. . Inhibición de cepas patógenas por bacteriocinas producidas por la cepa XE

En la figura 21 es notorio que existe efecto bactericida muy similar de las bacteriocinas que se producen a partir de las 48, 72 y 96 horas. Las bacterias patógenas que mostraron sensibilidad con valores del halo de inhibición muy cercanos a los valores entre 10 y 12 mm con diferencia no significativa.

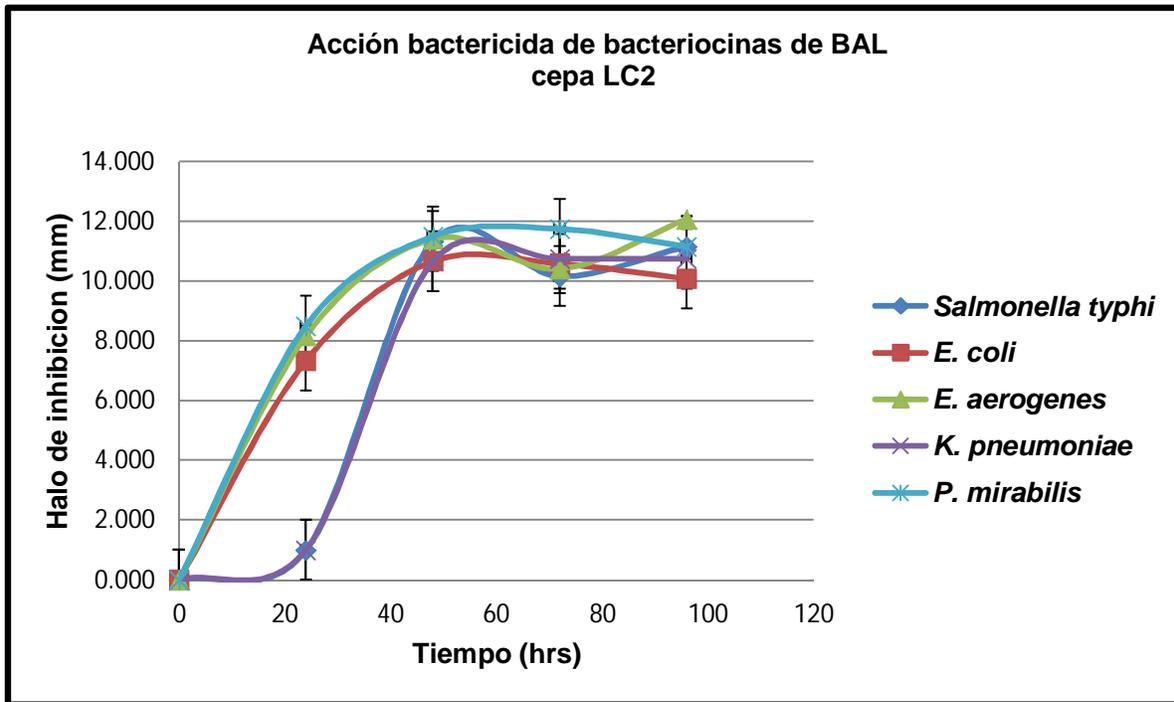


Figura 21. . Inhibición de cepas patógenas por bacteriocinas producidas por la cepa LC2

A partir de las 24 a 72 horas de fermentación del medio de cultivo MRS por BAL de cepa BD donde se produjeron bacteriocinas que tienen acción antimicrobiana contra *Klebsellia pneumoniae*, *E. aerogenes*, *Salmonella typhi*, y *Proteus mirabilis*. Se obtuvo una medida de 8 y 11 mm de diámetro del halo de inhibición, siguiendo el mismo rango hasta cuando se pusieron a prueba de susceptibilidad con las bacteriocinas producidas a 48 horas en un rango de inhibición de 10 a 12mm, su susceptibilidad decrece cuando se enfrentan a bacteriocinas producidas a 72 horas y a las 96 horas siguen la misma tendencia dentro del rango de inhibición a diferencia de *Proteus imrabilis* que aumenta su susceptibilidad hasta 16.83 milímetros de diámetro del halo de inhibición. Con respecto a *E. Coli* fue susceptible a la acción bactericida de bacteriocinas producidas a 48, 72 y 96 horas.

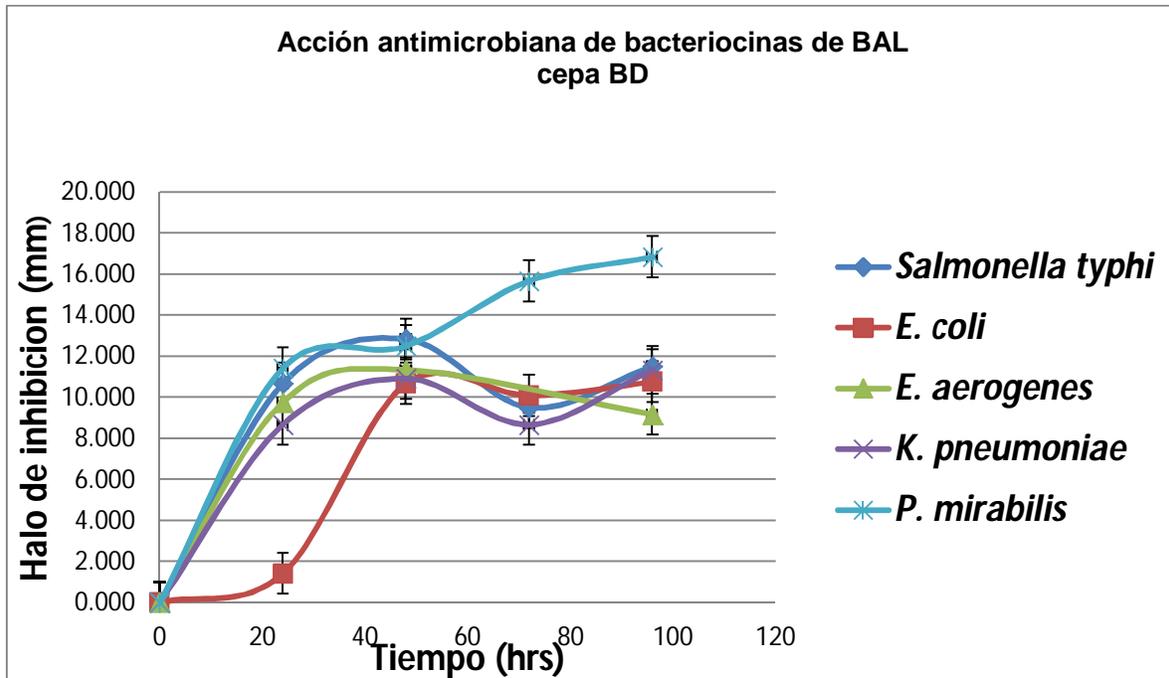


Figura 22. Inhibición de cepas patógenas por bacteriocinas producidas por la cepa BD

En la figura 23 se aprecia el comportamiento de *Proteus mirabilis* cuando presenta mayor susceptibilidad por bacteriocinas producidas por la cepa BDL en un tiempo de 24 horas con un halo de inhibición de 11.33 mm. Se observa que a las 48, 72, 96 horas de producción las bacteriocinas de la cepa BDL son más efectivas contra las cinco cepas con un halo de diámetro en el rango de 9.5 y 10.5 mm. *K. pneumoniae* resulta ser mejor inhibida por bacteriocinas producidas a las 48 horas.

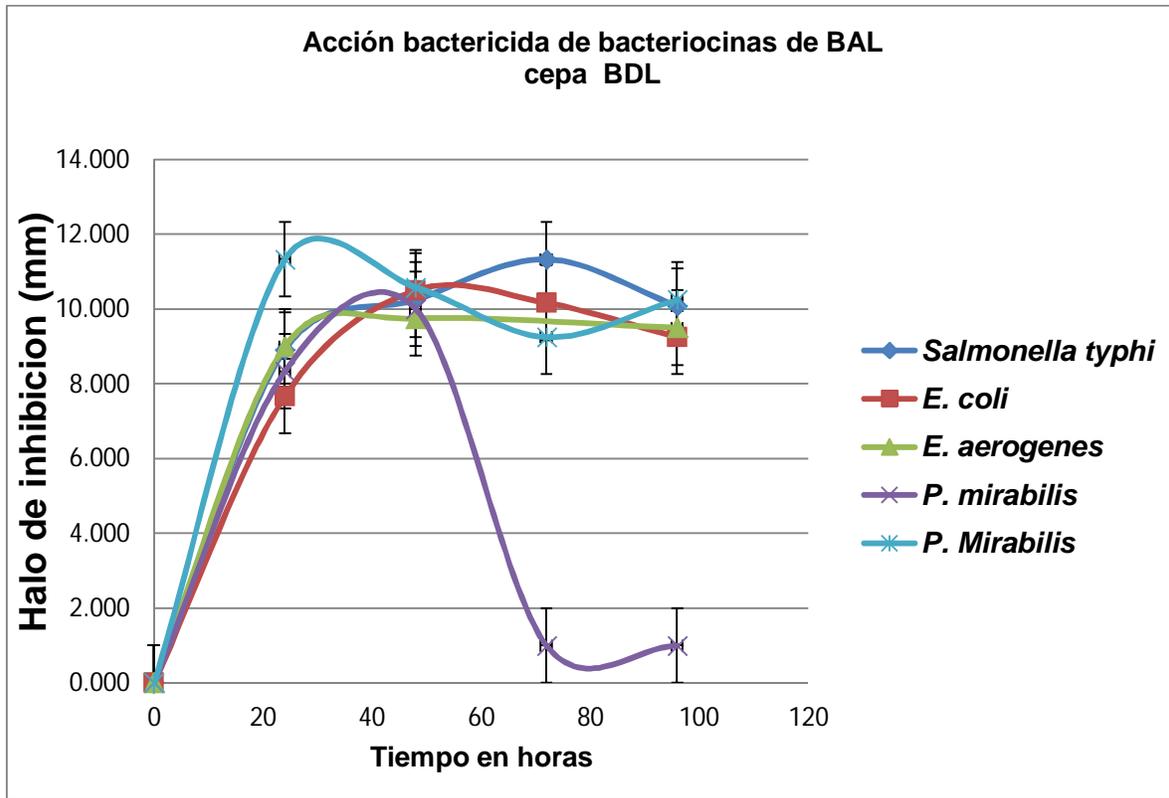


Figura 23. . Inhibición de cepas patógenas por bacteriocinas producidas por la cepa BDL

La cepa de bacterias lácticas LRR muestra mayor efecto bactericida de las bacteriocinas que se producen a 48, 72 y 96 horas contra las bacterias patógenas

Encontrando diferencias no significativas entre los valores de inhibición. Se demostró que pueden tener el mismo efecto bactericida contra *Salmonella typhi* con bacteriocinas que se producen a las 48, 72 y 96 horas (Figura 24).

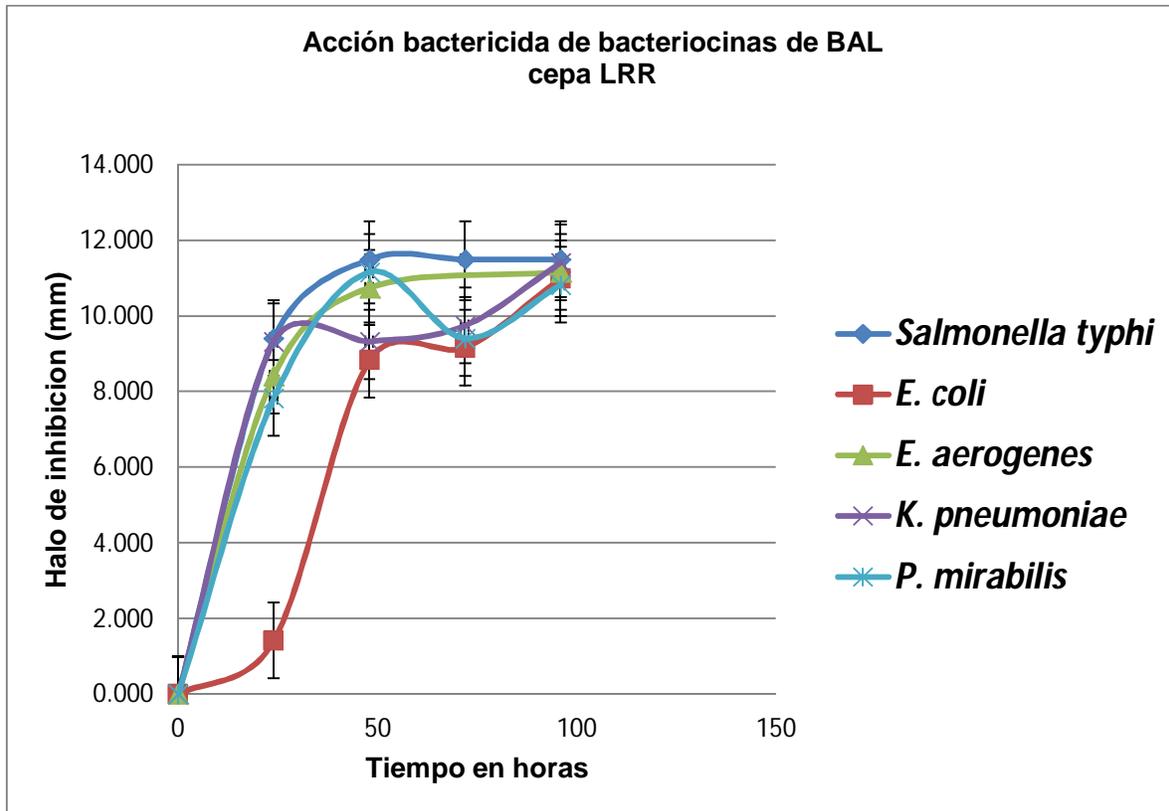


Figura 24. . Inhibición de cepas patógenas por bacteriocinas producidas por la cepa LRR

Klebsellia pneumoniae es más susceptible a las bacteriocinas producidas a las 96 horas de fermentación del medio MRS pertenecientes a la cepa de BAL BAA, estando dentro del rango de inhibición de *P. mirabilis*, *E. coli*, *E. aerogenes* y *Salmonella typhi* que de igual manera presentan susceptibilidad a las 48 y 72 horas con diferencia no significativa. (Figura 25).

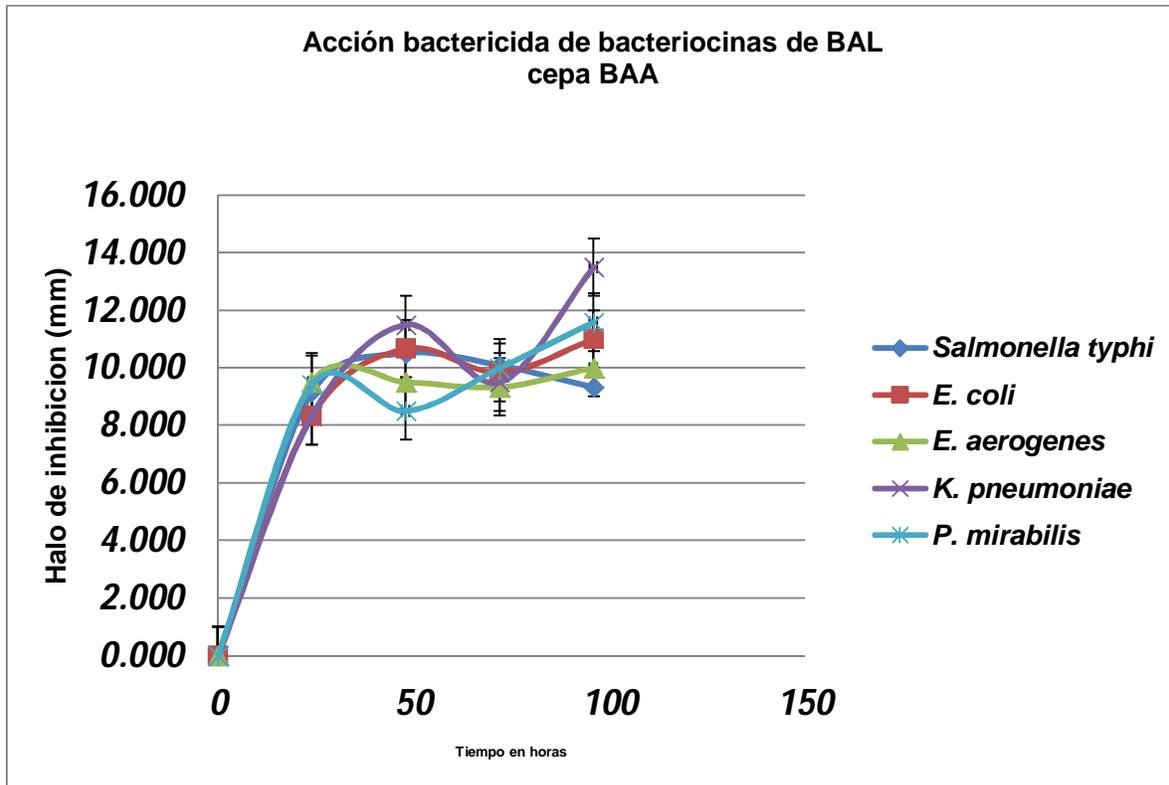


Figura 25. . Inhibición de cepas patógenas por bacteriocinas producidas por la cepa BAA

Respecto a la cepa LRR.3 en la figura 26 se observa que a partir de las 48 horas de fermentación del medio MRS por BAL se aprecia la inhibición de los microorganismos patógenos presentado un halo de inhibición de 9.5 a 9.75 mm de diámetro con diferencia no significativa. Las bacteriocinas producidas a 72 horas siguen su comportamiento inhibitorio dentro del mismo rango hasta las 96 horas de producción. Se observa que tienen mejor efecto bacteriocinas producidas a las 72 horas contra *Proteus mirabilis* alcanzando un halo de inhibición máximo de 13.83 mm.

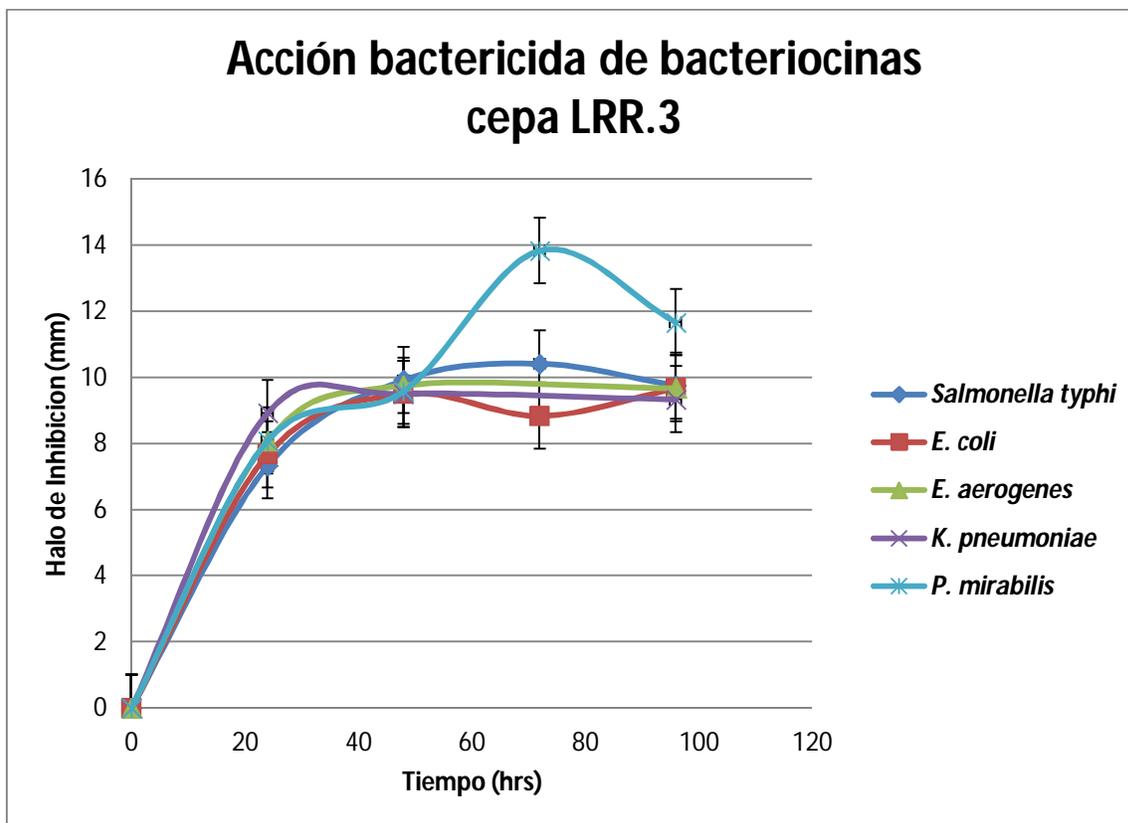


Figura 26. . Inhibición de cepas patógenas por bacteriocinas producidas por la cepa LRR.3

Capítulo 5

5.1. CONCLUSIONES

Del aislamiento de las 10 cepas de bacterias lácticas, todas fueron identificadas como Gram (+) de forma bacilar y cocoide

Las cepas de bacterias lácticas se purificaron y se conservaron para su posterior estudio.

Se obtuvieron bacteriocinas de las diez cepas de bacterias lácticas, todas presentaron actividad antimicrobiana ante las cepas de bacterias patógenas *Salmonella typhi*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *P. mirabilis* y *Klebsellia pneumoniae*

En base a los experimentos se demostró que a mayor tiempo de fermentación del medio de cultivo MRS hay producción de bacteriocinas con mayor efecto bactericida como en el caso de las bacteriocinas producidas por las cepas LCI, BSI a las 96 horas que presento un halo de inhibición de *Proteus mirabilis* de 16.62 mm y 14.41 mm, la cepa de BAL X produce bacteriocinas a las 96 horas con efecto antagónico respecto a *Enterobacter aerogenes* con halo de inhibición de 12.51 mm y *Salmonella typhi* con bacteriocinas producidas a 48 horas con un halo de 11.58 mm. *Salmonella typhi* y *Proteus mirabilis* presentan mayor susceptibilidad a bacteriocinas producidas por la cepa de BAL XE, *E. Coli* es más susceptible a la actividad bactericida de las bacteriocinas producidas por las cepas BD y BAA producidas a 48 horas y LRR producidas a 96 horas. *Klebsellia pneumonía* es sensible a la bacteriocinas producidas por las cepas BAA, LRR, BD, LC2, X, y BSI.

Las bacteriocinas producidas por las cepas BD, BDL, BAA, LRR, LRR.3, BD, BDL, X, XE Y BSI son aptas para utilizarse como conservador natural de alimentos delimitando el desarrollo de este tipo de bacterias agresivas a la salud humana.

Capítulo 6

6.1. RECOMENDACIONES

Realizar la caracterización bioquímica de bacterias lácticas para determinar el género y especie de bacterias lácticas a las cuales pertenecen.

Realizar la caracterización bioquímica de bacteriocinas debido a la importancia de aplicación industrial que poseen.

Probar la estabilidad de las bacteriocinas a altas y bajas temperaturas para determinar si puede ser usada en combinación con otros métodos de conservación de alimentos.

Capítulo 7

7.1. Referencias bibliográficas

Aguilar Rivera C. Vanegas López M.C. (2011). Inhibición de listeria *Monocytogenes* con bacterias Acido lácticas productoras de bacteriocinas. Revista Alimentos Hoy. ACTA - Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Num. 12. Pág. 4

Alais C., Lacasa Godina A (2003). Ciencia de la leche. Editorial Reverte, S.A. Barcelona España. Pág. 359-362

Almudena A., Lizaso (2001). Nitritos, nitratos y nitrosaminas. Revista Fundación Ibérica para la seguridad alimentaria. Pág. 2-3

Alquicira Páez L. (2006). Determinación del mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria de bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133. Universidad Autónoma Metropolitana. Pág. 41

Aranceta Bartrina J., Serra Maiem L., Requejo Marcos A.M., Mateos Guardia J.A., Marcos Sanchez A., Ortega Anta R.M. (2002). Alimentos Funcionales Probióticos. Editorial Panamericana. Cap. 4.

Ausina Ruiz V., Moreno Guillen S. (2005). Tratado de enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana. Madrid España. Pág. 228-237

Brock T.D. (1978). Biología de los microorganismos. Ed. Omega, S.A. Barcelona.

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

Cobo J.M. (2001). Bacterias Saludables. Alimentación, Nutrición, Dietética. Libro de Ponencias. V Congreso Internacional Madrid España. Pág. 1

De la Fuente Salcido N.M. (2009). Biosíntesis y actividad de bacteriocinas producidas por cepas Mexicanas de *Bacillus Thuringiensis* con potencial de aplicación como bioconservadores en alimentos. Universidad Autónoma de Nuevo León. Pág. 21

Frazier W.C., Westhoff D.C. (1993) Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. España. Pág. 67

Departamento de Bioquímica y biología molecular y celular, U. Z. (2004). **Guion de prácticas.** Fundamentos de metodología bioquímica (Área Bioquímica). Universidad de Zaragoza. Pág. 22

García Garibay M, Quintero Ramírez R., López Munguía A. (2004). Biotecnología alimentaria. Editorial Limusa, México. Pag.190

García Ruiz A. (2006). Estudio estadístico para predecir el tiempo de maduración del queso manchego, e identificación de la microbiota. Universidad de Castilla-La Mancha. Pág. 147

González Martínez B.E., Gómez Treviño M. y Jiménez Salas Z. (2003) Bacteriocinas de Prebióticos. Revista Salud Pública y Nutrición. Vol. 4 Núm 2.

Gutiérrez Prieto S.J. Acosta Gómez A. P., Agudelo C.M., Barrientos Sánchez S., Chávez Clavijo M., Cuellar Ávila A., Durán Correa C., Gamboa Jaimes F.O., Gamboa Martínez L.F., Gómez O.L., Gómez Rodríguez M., Gómez Ramírez, S. I. González Duque O.A., Herazo Acuña B., Jaramillo Gómez L. M., Otero Mendoza L.M., Roa Molina N. S., Rodríguez Ciodaro A., Suarez Londoño L.J., Valdivieso Díaz C.M. (2006). Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá

Hernández A.G., Ruiz M.D. (2010). Tratado de Nutrición. Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Madrid: Medica Panamericana, D,L. Pág. 542

Hernández López J.C. (2002). Caracterización parcial de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133. Universidad Autónoma Metropolitana. Mexico. D.F

Instituto de Salud Pública (2011). *Salmonella Enterica serotipo Typhi*, 2000-2011. Semana epidemiológica 38, 2011. Revista Newsletter Científico. Pág. 1

Martínez Fernández B. (1996). Bacteriocinas de *Lactococcus lactis* aislados de quesos asturianos: Nisina Z y Lactococina 972. Universidad de Oviedo. Pag. 1-9

Minor Pérez H. (2004). Caracterización bioquímica y espectro de inhibición microbiana de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*. Universidad Autónoma Metropolitana.

Morgan, S., Ross, R.P., Hill, C., (1995). Bacteriolytic activity caused by the presence of a novel lactococcal plasmid encoding Lactococcins A, B, and M. Appl. Environ. Microbiol. 6: 2995–3001.

Núñez G.A., Cayre M.E., Castro M.P., Garro O. A. (2007). Efectividad y modo de acción de Nisina sobre *Lactobacillus fructivora*. Revista Mundo lácteo y cárnico. Pág. 28.

Pachon Cubillos D. A. (2009). Aislamiento, identificación y serotipificación de enterobacterias del género *Salmonella* en una población de *Crocodylus intermedius* y testudinos mantenidos en cautiverio en la estación de biología tropical Roberto Franco E.B.T.R.B. de la Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional de Colombia en Villacencio. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias básicas. Bogotá. Pág. 19

Ramírez Cuenca M.S. (2005). Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pag.4

Ramón Frías T., Vargas Cortes M., Hernández Martínez M. López Ramírez E. (2006). XVI Verano de la investigación científica. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Rodríguez Gómez J.M. (2006). Microorganismos y salud bacterias lácticas y bifidobacterias probióticas. Editorial complutense, S. A. pág. 4-5

Rodríguez Membibre M.L. (1994). Bacterias productoras de ácido láctico: efectos sobre el crecimiento y la flora intestinal de pollos, Gazapos y Lechones. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Madrid España. Pág. 20

Rodríguez Cavallini E., Gamboa Coronado M. M., Hernández Chavarria F., García Hidalgo J. (2005). Bacteriología general. Principios y prácticas de laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica. Pág. 63-65

Romero del Castillo S. R., Mestres Lagarriga J. (2004). Productos Lácteos. Tecnología. Universidad Politécnica de Catalunya.

Romero Cabello R. (2007). Microbiología y parasitología Humana. Ed. Médica Panamericana S.A. DE C.V. México. Pág. 746

Stanier R. Y., Ingraham J.L., Wheelis M.L., Painter P.R. (1992). Microbiología. Ed. Reverte S. A. pag. 531

Stephen J. Cavalieri, Coyle M.B. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad Antimicrobiana. American Society for Microbiology. Pág. 229

Stiles, M.E. (1996). Biopreservation by Lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek: Pág. 235-249

Tagg, J. R., Dajani, A. S. y Wannamarker, I. W.(1976). Bactericins of Gram Positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40: 722 – 756.

Vanegas M.C., González L.M., Arévalo, S. (2010). Capacidad bactericida de *Bifidobacterium sp.* aislada de leche materna y de heces de neonatos, frente a los principales causantes de enfermedades transmitidas por alimentos. Asociación colombiana de infectología. Revista Infectio 14(4): 241-247. Pág. 245-247.

Yang R, Johnson MC, Ray B (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 58: 3355-3359.

Zamora Rodríguez L.M. (2003). Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Universidad de Girona

Zapata S., Muñoz J., Ruiz O. S., Montoya O.I., Gutiérrez P. A. (2009). Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. Revista Vitae Vol. 16 No.1.

Recuperado de Sitio Web <http://www.laanunciataikerketa.com/trabajos/yogur/cultivos.pdf>

[02/11/12](#)

Recuperado de (<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/mrsagar.htm>) sitio internet 18/11/12.

Capítulo 8

8.1. Anexos

8.1.1. Anexo 1. Tinción Gram

Técnica desarrollada por Christian Gram en 1884, utilizada para la clasificación e identificación de células bacterianas que se tiñen de acuerdo a la estructura y grosor de la pared bacteriana, reportándolas como Gram (+) o Gram (-) según la coloración morada o rosa. Las Gram (+) poseen una capa gruesa de peptidoglicano y carecen de membrana externa, mientras las gram negativas tienen una capa más delgada de peptidoglicano y poseen membrana externa.

El procedimiento implica los siguientes pasos.

1. Tinción inicia. Las células se tiñen con cristal violeta, colorante primario que tiñe las células de morado.
2. Mordente. Se adiciona yoduro lugol que reacciona con cristal violeta y forma un complejo cristal violeta- yoduro.
3. Decoloración. Se adiciona un solvente no polar, el cual actúa lavando el complejo cristal violeta- yoduro de las células Gram negativas. De esta manera las bacterias Gram positivas continúan moradas y a las Gram negativas se decoloran. Este es el paso crítico de esta tinción, pues si se exagera, decolora Gram positivas y si se hace muy débil no decolora a las Gram negativas.
4. Contratinción. Se vuelve a teñir con safranina, de manera que las Gram negativas, que habían sido decoloradas, se tiñen de rosado, no hay efecto contra las Gram positivas estas permanecen moradas.

Material

- Cultivo de Microorganismos
- Solución Cristal Violeta
- Solución Lugol
- Solución Alcohol cetona
- Solución Safranina

Procedimiento:

1. Preparar frotis
2. Adicionar cristal violeta por 1 minuto
3. Enjuagar
4. Adicionar Lugol por 1 minuto
5. Enjuagar
6. Adicionar Alcohol Cetona
7. Enjuagar
8. Agregar Safranina 1 minuto
9. Enjuagar
10. Observar al microscopio agregando una gota de aceite de inmersión
11. Clasificar: Gram +, Gram –

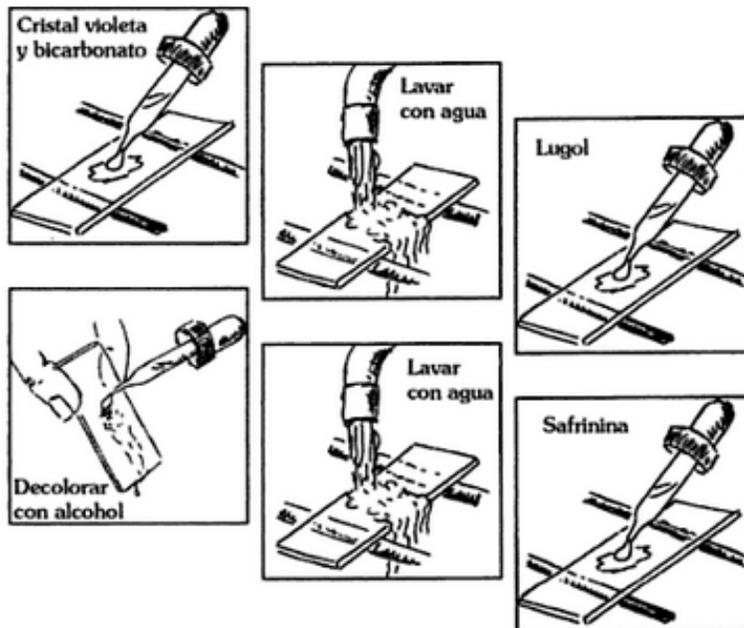


Figura 27. Metodología tinción Gram.

Fuente: (Rodríguez *et al.*, 2005)

Anexo 2.**8.1.2. COMPOSICION QUIMICA DE MEDIO DE CULTIVO MRS.****Cuadro 10. Composición de Agar MRS (gr/L)**

Peptona de gelatina	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Dextrosa	20
Citrato de sodio	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato de potasio	2
Agar bacteriológico	12
Tween 80	1 ml

Cuadro 11. Composición de Caldo MRS (gr/L)

Peptona de gelatina	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Dextrosa	20
Citrato de sodio	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato de potasio	2
Tween 80	1 ml

