

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**EVALUACION DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE CEPAS DE
BACTERIAS ACIDO LACTICAS AISLADAS DE DIFERENTES
MUESTRAS DE LECHE.**

POR:

MARIA DE LOS ANGELES CARRERA VEGA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Mayo 2015.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Evaluación del potencial antimicrobiano de cepas de bacterias
ácido lácticas aisladas de diferentes muestras de leche.**

Presentada por:

MARIA DE LOS ANGELES CARRERA VEGA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Dirigido por el siguiente comité asesor:

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández.

ASESOR PRINCIPAL

Dra. Susana González Morales.

CO-ASESOR

Dr. Armando Robledo Olivo.

ASESOR

Dra. Ruth Elizabeth Belmares Cerda.

ASESOR

Dr. José Duñez Alanís.

COORDINADOR DE LA DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México; Mayo 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Evaluación del potencial antimicrobiano de cepas de bacterias
ácido lácticas aisladas de diferentes muestras de leche.**

Presentada por:

MARIA DE LOS ANGELES CARRERA VEGA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Que se somete a consideración del H. Jurado examinador:

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández.



PRESIDENTE

Dra. Susana González Morales.



VOCAL

Dr. Armando Robledo Olivo.



VOCAL

Dra. Ruth Elizabeth Belmáres Cerda.



VOCAL SUPLENTE

Dr. José Duñez Manís.



COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México; Mayo 2015.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS. Te agradezco infinitamente por haberme dado la vida y a unos padres maravillosos. Por las lecciones que has puesto en mí, para tomarlas como experiencias a lo largo de mi caminar. Gracias por fortalecerme cada día y por permitirme cumplir una meta más.

A MIS PADRES: Raymundo Carrera García y Silvia Vega Ortiz. Gracias por todo el apoyo incondicional que me brindan día con día, por sus esfuerzos, sacrificios y consejos que me han permitido crecer como persona. Por la confianza que han depositado en mí y por darme las herramientas necesarias para seguir por la vida superando obstáculos y construyendo nuevos sueños.

A MIS HERMANAS: Laura Edith y Verónica. Gracias por sus consejos y palabras de aliento que me ayudaron a seguir sobresaliendo y llegar hasta donde me encuentro ahora. Gracias por creer en mí y en mi capacidad de lograr mis metas.

A MIS ABUELOS: Marcelino e Inés, Gracias a sus sabios consejos que me han servido de mucho y aun en la distancia siempre estuvieron al tanto de mí.
Raymundo (+) y Virginia (+), que aunque ya no están conmigo físicamente, sé que desde el cielo me cuidan y siempre me guían por el buen camino.

A MI ALMA TERRA MATER. No encontraré la manera para agradecerte todas las enseñanzas que has sembrado en mí, por todas las herramientas y los conocimientos necesarios que adquiriré dentro de tus aulas. Gracias por los servicios brindados a lo largo de toda mi estancia.

A MIS ASESORES DE TESIS: Dr. Mario A. Cruz Hernández, Dra. Susana González Morales, Dr. Armando Robledo olivo y Dra. Ruth E. Belmáres Cerda. Agradezco la atención, el tiempo y la paciencia de cada uno durante el

tiempo que duró la investigación. Por sus palabras de aliento y conocimientos brindados a mi persona, los cuales fueron de gran ayuda.

A MIS MAESTROS. Gracias a todos aquellos que sembraron una pequeña semilla de conocimiento en mí y que contribuyeron durante mi formación académica.

A MIS AMIGOS (AS): Rosario, Roxana, Nancy, Idalia, Lucrecia, Dulce, Isabel, Sofía, Hugo, Alfredo, Ricardo, Luis Andrés y Rafael S., Gracias por su amistad incondicional, por sus consejos y los increíbles momentos que compartimos juntos. Nunca los olvidaré!

A MIS COMPAÑEROS. Porque sé que en algún momento necesite de ellos. Por todas las experiencias vividas durante la carrera.

DEDICATORIA

Dios, a ti te dedico este gran logro. Siempre puse mi fe en ti porque sé que tus tiempos son perfectos. Tu que siempre me cuidas, te pido que con tu luz me acompañes a lo largo de mi vida personal y profesional.

Padres, a ustedes también les dedico este trabajo que realice con tanto esfuerzo y dedicación, esfuerzos que también han sido suyos e inspirados en ustedes. Por todo el ayer, les dedico todo mi mañana.

Con mucho amor, respeto y admiración!

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCION	2
2. JUSTIFICACION.....	4
3. HIPOTESIS.....	5
4. OBJETIVOS:.....	5
4.1. Objetivo General.	5
4.2. Objetivos específicos.	6
5. REVISION DE LITERATURA	6
5.1. Bacterias ácido lácticas y sus características.	6
5.1.1. Morfología macroscópica.....	8
5.1.2. pH.....	8
5.1.3. Oxígeno en el medio.....	9
5.1.4. Temperatura	9
5.1.5. Medios de crecimiento.....	9
5.1.5.1. Agar MRS.....	10
5.2. Tipos de fermentación de carbohidratos por BAL	10
5.3. Clasificación en géneros	13
5.4. Uso de BAL en leches fermentadas y otros alimentos.....	14
5.5. Componentes antimicrobianos producidos por BAL.	17
5.6. Bacteriocinas y sus características.	17
5.6.1. Clasificación de bacteriocinas.....	20
5.6.2. Espectro de inhibición.....	21
5.6.3. Mecanismo de acción.....	22
5.6.4. Propiedades bioquímicas de bacteriocinas	24
5.6.5. Producción de bacteriocinas.....	24
5.7. Pruebas de susceptibilidad a las bacteriocinas.....	25

5.7.1.	Método de Difusión en placa (Kirby y Bauer)	25
5.7.2.	Métodos en tubos	26
5.8.	Aplicación de las bacteriocinas en alimentos.	26
5.8.1.	Productos lácteos	26
5.8.2.	Productos cárnicos	26
5.8.3.	Productos de pesca	27
5.8.4.	Productos enlatados y conservas	27
5.8.5.	Cerveza y vino	28
5.9.	Bacterias patógenas.....	28
5.9.1.	<i>Salmonella typhi</i>	28
5.9.2.	<i>Escherichia coli</i>	29
5.9.3.	<i>Staphylococcus aureus</i>	30
5.10.	Biología molecular.....	30
5.10.1.	Métodos de extracción	31
5.10.2.	Cuantificación de ADN mediante espectrofotometría	31
5.10.3.	Electroforesis para la calidad del ADN	32
5.10.4.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	32
5.10.4.1.	Región 16s del ADNr.....	32
5.10.5.	Electroforesis de PCR	33
6.	MATERIALES Y METODOS.....	33
6.1.	Etapas 1: Purificación e identificación macroscópica y microscópica de BAL para su conservación.	34
6.1.1.	Purificación	34
6.1.2.	Morfología macroscópica y microscópica	35
6.1.3.	Conservación de BAL	36
6.2.	Etapas 2: Evaluación del efecto antimicrobiano de las bacteriocinas. ...	37

6.3.	Etapa 3. Cinética de crecimiento de BAL en jugo de aloe vera.....	39
6.3.1.	Preparación e inoculación del jugo de Aloe vera	39
6.3.2.	Monitoreo.....	40
6.3.3.	Determinación de azucares totales (Método de Dubois 1956)	40
6.4.	Etapa 4. Identificación molecular de las cepas de BAL.....	41
6.4.1.	Extracción de ADN de Bacterias Acido lácticas.....	41
6.4.2.	Cuantificación de ADN.....	42
6.4.3.	Electroforesis horizontal de agarosa al 1% para medir la calidad del ADN	43
6.4.4.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	44
6.4.5.	Electroforesis de PCR con gel de agarosa al 3%	46
7.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	47
7.1.	Etapa 1: Purificación e identificación macroscópica y microscópica de BAL para su conservación.	47
7.2.	Etapa 2: Evaluación del efecto antimicrobiano de las bacteriocinas. ..	52
7.3.	Etapa 3. Cinética de crecimiento de BAL en jugo de aloe vera.....	53
7.3.1.	Producción de Biomasa	53
7.3.2.	pH.....	54
7.3.3.	Azucars Totales.....	55
7.4.	Etapa 4. Identificación molecular de las cepas de BAL.....	56
7.4.1.	Extracción y cuantificación del ADN	56
7.4.2.	Electroforesis de Calidad con gel de agarosa al 1%.....	57
7.4.3.	Electroforesis de PCR con gel de agarosa al 3%	58
8.	CONCLUSIONES	59
9.	BIBLIOGRAFIA.....	60
10.	ANEXOS.....	63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Forma y disposición de las células en tres géneros de bacterias del ácido láctico: (a) <i>Lactobacillus</i> ; (b) <i>Streptococcus</i> ; (c) <i>Pediococcus</i> . (Royer Y. Stanier et al., 1992).	7
Figura 2. Colonias de bacterias del ácido láctico: <i>Streptococcus lactis</i>	8
Figura 3. Ruta de Embden Meyerhof Parnas (EMP) por la que las bacterias homofermentadoras del ácido láctico convierten la glucosa en ácido láctico... ..	11
Figura 4. Ruta del catabolismo de la glucosa por las bacterias heterofermentadoras del ácido láctico.	12
Figura 5. Árbol filogenético de los géneros de bacterias ácido lácticas, basado en la secuencia del gen 16S del ADN ribosomal.	14
Figura 6. Diferentes variedades de quesos.	15
Figura 7. Modo de acción de los lantibióticos (Clase I), no-lantibióticos (Clase II) y bacteriolisinas (Clase III). (Adaptado de Cotter <i>et al.</i> , 2005).	24
Figura 8. Una de las propiedades diferenciales de <i>Salmonella typhi</i> es su motilidad. En las células se pueden visualizar sus flagelos.	29
Figura 9. Una característica de <i>E. coli</i> , es su forma bacilar.	29
Figura 10. Forma microscópica de <i>S. Aureus</i>	30
Figura 11. Incubación de BAL en condiciones de anaerobiosis.	35
Figura 12. Colonias aisladas de BAL sembradas por el método de estriado por agotamiento para reducir la población microbiana.	35
Figura 13. Características microscópicas de BAL.	36
Figura 14. Frascos con caldo MRS inoculados con cepas de BAL en condiciones anaeróbicas.	36
Figura 15. Conservación de las cepas en tubos eppendorf.	37
Figura 16. Baño maría para los diferentes tratamientos de tiempo y temperatura.	37
Figura 17. Separación de la biomasa y el extracto mediante una centrifugación.	37
Figura 18. Halo de inhibición contra bacterias patógenas provocado por el efecto de las bacteriocinas.	38

Figura 19. Extracción de la pulpa de aloe vera.....	39
Figura 20. Filtración del jugo a través de una bomba de vacío.	39
Figura 21. Fermentación de BAL en jugo de aloe vera.	40
Figura 22. Coloración provocada por las muestras para la determinación de azucares totales.	41
Figura 23. Precipitado de las células en un tubo eppendorf para la obtención de ADN.....	42
Figura 24. Espectrofotómetro en proceso de calibración para cuantificar ADN.	43
Figura 25. Cámara de electroforesis horizontal corriendo muestras de ADN en gel de agarosa.....	44
Figura 26. Gel de electroforesis sobre sobre el transiluminador de luz UV para observar la calidad de las bandas.....	44
Figura 27. Termociclador con muestras de ADN, preparadas para realizar la PCR.....	46
Figura 28. Efecto inhibitorio de las diferentes cepas de BAL.....	53
Figura 29. Curva de crecimiento de las cepas X y BD en Jugo de Aloe vera..	54
Figura 30. Cambios del pH en el Jugo de aloe vera durante la fermentación de BAL.	55
Figura 31. Consumo de Azucares totales por las BAL en el jugo de aloe vera.	56
Figura 32. Electroforesis con gel de agarosa al 1% para verificar la calidad del ADN a través de las bandas marcadas. En la parte superior se observan los códigos de cada muestra.	58
Figura 33. Electroforesis del producto obtenido de la PCR con gel de agarosa al 3%. Los marcadores moleculares se encuentran al inicio y al final de las muestras.....	58
Figura 34. Efecto de la tinción de Gram en la pared celular de Bacterias.	63
Figura 35. Curva patrón para la determinación de azucares totales en la fermentación de BAL.....	64
Figura 36. Cartel expuesto en el congreso de Asociación Mexicana de la Ciencia de los Alimentos (AMECA).....	66

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bacterias ácido lácticas utilizadas en la elaboración de productos lácteos.....	16
Tabla 2. Utilización de las principales bacterias ácido lácticas.	16
Tabla 3. Características de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. Notaciones: N.D. = No determinado; N.R. = Referencia no encontrada.	18
Tabla 4. Espectro inhibitorio frente a microorganismos no lácticos de bacteriocinas de BAL.	22
Tabla 5. Cepas de BAL aisladas.....	34
Tabla 6. Fórmulas para la sustitución de los datos obtenidos en la cuantificación del ADN.	42
Tabla 7. Cantidades de los reactivos utilizados para PCR.	45
Tabla 8. Tiempos y temperaturas para PCR.....	45
Tabla 9. Morfología macroscópica de las BAL.....	48
Tabla 10. Morfología microscópica de las BAL.....	50
Tabla 11. Comparación del efecto antimicrobiano de las bacteriocinas producidas, probadas con cepas de bacterias patógenas.	52
Tabla 12. Datos obtenidos en la cuantificación de ADN de las BAL.	57
Tabla 13. Mezclas de reacción para la elaboración de la curva patrón para la determinación de azúcares totales. Método de <i>Dubois</i> 1956.....	64
Tabla 14. Absorbancias obtenidas en la mezcla de reacción.	64
Tabla 15. Halos de inhibición con el tratamiento sometido a 80°C durante 30 minutos.....	65

RESUMEN

Las bacteriocinas producidas por las Bacterias Ácido Lácticas (BAL), son péptidos antimicrobianos con capacidad de inhibir microorganismos patógenos perjudiciales para la salud humana, por lo tanto representan una excelente estrategia para evitar el uso de conservadores químicos.

En el presente proyecto se logró realizar la purificación de ocho cepas de Bacterias Acido Lácticas (BAA, BS1, LC1, LC2, BD, BD2, X y XE) observando sus características macroscópicas y microscópicas de cada una. Se evaluó la producción de biomasa haciendo un especial énfasis en las bacteriocinas producidas para evaluar su efecto antimicrobiano e inhibitorio contra tres bacterias patógenas (*Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), utilizando el método de Difusión en disco (Kirby y Bauer). Estas son sustancias antimicrobianas que han demostrado ser eficaces como bioconservadores en alimentos, para el control de diversos microorganismos que dañan la salud del consumidor. Además, se hizo el intento de llevar a cabo la identificación molecular de las diferentes cepas aisladas para identificar el gen 16S del ADN ribosomal y así determinar el género y la especie de las bacterias ácido lácticas.

Palabras Claves: Bacterias Ácido Lácticas (BAL), Actividad antimicrobiana, Bacteriocinas, Efecto inhibitorio, Bioconservador.

Correo Electrónico; María de los Ángeles Carrera Vega.

mary_angelz05@hotmail.com

1. INTRODUCCION

En la actualidad se ha implementado la búsqueda de cómo evitar el uso de conservadores químicos. La utilización de aditivos con propiedades antimicrobianas ha sido la manera más aceptada para prolongar la seguridad y calidad de alimentos de una manera natural. Además, no solo son interesantes en la industria alimentaria por inducir el desarrollo de características organolépticas y estructurales deseables en los alimentos, sino también, por inhibir en ellos el desarrollo de microorganismos perjudiciales, alterantes y patógenos; por ello se pensó en la posibilidad de utilizarlas para extender la vida útil de los alimentos y mejorar su calidad higiénica. (*Wagner Luiz Moreira, 1993*). Son un grupo de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, no pigmentadas y capaces de crecer en un rango de pH entre 4.0 y 4.5; anaerobias facultativas o micro aerófilas, cuyo metabolismo es fermentador. Las BAL requieren de una serie de componentes, como: aminoácidos, péptidos, purinas, pirimidinas y vitaminas tales como la vitamina B, el ácido pantoténico, la biotina y el ácido fólico, las cuales no pueden ser sintetizadas por ellas mismas, debido a lo cual deben encontrarse en el medio de crecimiento. Con respecto a las temperaturas en que se desarrollan estos microorganismos, hay: Mesófilos, que crecen entre 25-30°C y termófilos, cuyo rango de temperatura se encuentra entre 40-44°C.

Cabe mencionar que estas bacterias no sólo producen ácidos orgánicos, sino también tienen la capacidad de producir otras sustancias, como: Peróxido de hidrógeno (H₂O₂), Acetaldehído, Radicales libres y otros metabolitos como moléculas no proteicas y bacteriocinas. El término bacteriocina fue usado inicialmente por Jacob en 1953 para designar proteínas con actividad antibacteriana.

Las bacteriocinas que producen las bacterias ácido lácticas son las sustancias antimicrobianas más interesantes, ya que debido a su naturaleza proteica, son inactivadas por las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal y no son tóxicas, ya que son rápidamente digeridas por las proteasas en el tracto digestivo humano, inactivándose sin llegar a formar compuestos secundarios. Esta

característica las posiciona como los mejores candidatos para conservar productos, ya que tienen como función inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos en el alimento, lo cual las hace muy importantes. Generalmente son termorresistentes, lo que les permite mantener su actividad antimicrobiana a temperaturas similares a las de pasterización y esterilización de la leche.

En el proceso de fermentación, los microorganismos emplean carbohidratos y compuestos relacionados como fuente de energía que son oxidados parcialmente generando ácidos orgánicos. Durante este proceso los ácidos orgánicos resultantes se acumulan y se produce un gradual descenso del pH (<4.5-5.0), además, el periodo de fermentación favorece la producción de biomasa.

Las variaciones de las condiciones en el cultivo de Bacterias Lácticas, como por ejemplo temperatura y tiempo, ejercen un profundo efecto en la producción de bacteriocinas activas. Generalmente, se producen más bacteriocina cuando la cepa productora se cultiva a su temperatura óptima de crecimiento. El desarrollo de la cepa productora a temperaturas elevadas puede suprimir completamente la producción de bacteriocina y, algunas veces eliminar irreversiblemente esta propiedad.

El presente proyecto tiene como finalidad, purificar, identificar y evaluar el efecto antimicrobiano y las características macroscópicas y microscópicas de ocho cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de diferentes fuentes, como: leche materna, leche de cabra, y leche de vaca.

Para llevar a cabo este estudio, las bacterias ácido lácticas se incubaran dando las mejores condiciones de crecimiento para obtener una excelente producción de biomasa y por consiguiente una deseable producción de bacteriocinas y evaluar su efecto antimicrobiano contra bacterias patógenas (*Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*). Las cepas de BAL fueron reactivadas para su identificación del género y la especie mediante la técnica de

secuenciación del gen 16s. Este proceso incluye la producción de células del cultivo, la extracción de ADN de las cepas, así mismo se mide la cantidad y calidad de ADN y finalmente se amplificó el gen 16s por PCR.

2. JUSTIFICACION

En la actualidad, se han identificado serios problemas relacionados directamente con las limitadas formas de conservación de los alimentos frescos, sumando al hecho de la continua exigencia de disminuir y prohibir cada vez más el uso de conservadores y aditivos químicos en los alimentos, debido a los efectos adversos que puedan causar en la salud del consumidor. Esto obliga a la búsqueda de metodologías alternativas para conservar los alimentos. El uso de bacterias ácido lácticas (BAL) en la bioconservación de alimentos ha tomado gran importancia en los últimos años debido a la capacidad para controlar microorganismos patógenos y alterantes. La bioconservación se refiere a la extensión de la vida útil de los alimentos usando una microflora natural o controlada y sus productos antibacteriales.

Debido al origen proteico de las bacteriocinas, éstas son susceptibles al ataque de enzimas proteolíticas, inactivándose durante su paso por el tracto intestinal, no siendo absorbidas como compuestos activos y sin causar riesgos relacionados con su uso.

Con esta información surge una gran preocupación en reducir el uso de aditivos químicos en la conservación de alimentos, y por consiguiente aumentar la conservación de alimentos a través de agentes antimicrobianos naturales, para el bienestar de los consumidores. Por lo tanto, en esta investigación se desea complementar un poco más el conocimiento e información acerca del uso de aditivos biológicos, para esto es necesario analizar el comportamiento de diferentes cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de muestras de leche y mejorar sus condiciones para obtener resultados deseables en su actividad inhibitoria.

La producción de bacteriocinas genera una ventaja importante para el productor, ya que si esta se encuentra en cantidades suficientes, puede inhibir el crecimiento de bacterias que compiten por la misma fuente de nutrientes, resultado de gran utilidad en la industria alimentaria.

Además, es importante poseer una buena información sobre la composición y estructura de las bacteriocinas, ya que conviene determinar y conocer el mayor número posible de sus propiedades para asegurar su uso. La acción inhibitoria de las bacteriocinas no es directamente proporcional a la concentración empleada, habiéndose reportado una disminución en la capacidad inhibitoria sobre algunas bacterias sensibles cuando se emplean altas concentraciones de bacteriocinas.

3. HIPOTESIS

Las características macroscópicas y microscópicas de las diferentes cepas de BAL son muy variables, debido a la fuente de donde se aislaron. Durante la fermentación, a mayor periodo de incubación las cepas producen mayor cantidad de bacteriocinas. El efecto antimicrobiano de las bacteriocinas depende del tiempo y la temperatura aplicada durante el calentamiento del extracto. La extracción de ADN de las Bacterias ácido lácticas da la certeza del género y la especie del microorganismo aislado.

4. OBJETIVOS:

4.1. Objetivo General.

- Evaluación del efecto antimicrobiano e inhibitorio de las bacteriocinas producidas por las mismas bacterias ácido lácticas de muestras de leche de la región.

4.2. Objetivos específicos.

- Aislamiento de cepas de bacterias ácido lácticas, así como su análisis macroscópico y microscópico.
- Producción de bacteriocinas y evolución de su efecto antimicrobiano.
- Análisis de parámetros cinéticos de crecimiento.
- Identificación molecular de las diferentes cepas mediante la secuenciación del gen 16s del ARN ribosomal.

5. REVISION DE LITERATURA

Entre 1857 y 1863 Louis Pasteur estudio la fermentación ácido láctica. Lister en 1877 obtiene el primer cultivo puro de *Streptococcus lactis*.

A principios del siglo XX E. Metchnikov estudio los efectos benéficos del consumo de leche fermentada al apreciar la longevidad y buena salud de los campesinos búlgaros que consumían grandes cantidades de yogurt, y concluyó que las bacterias lácticas aportadas por la misma favorecían la flora intestinal y generaban sustancias que impedían el desarrollo de bacterias patógenas. A causa de su investigación Metchnikov recibió el Premio Nobel en 1908. (Olivera, J. 2011).

5.1. Bacterias ácido lácticas y sus características.

Las bacterias del ácido láctico son organismos inmóviles, de forma bacilar o esférica (Figura 1), no esporulados, anaerobios, microaerófilos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y bencidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y tienen un conjunto de propiedades metabólicas y nutricionales poco corriente. Su nombre deriva del hecho de que sintetizan ATP a través de fermentaciones de carbohidratos que dan ácido láctico como principal (y a veces único) producto final. (Roger Y. Stanier *et al.*, 1992).

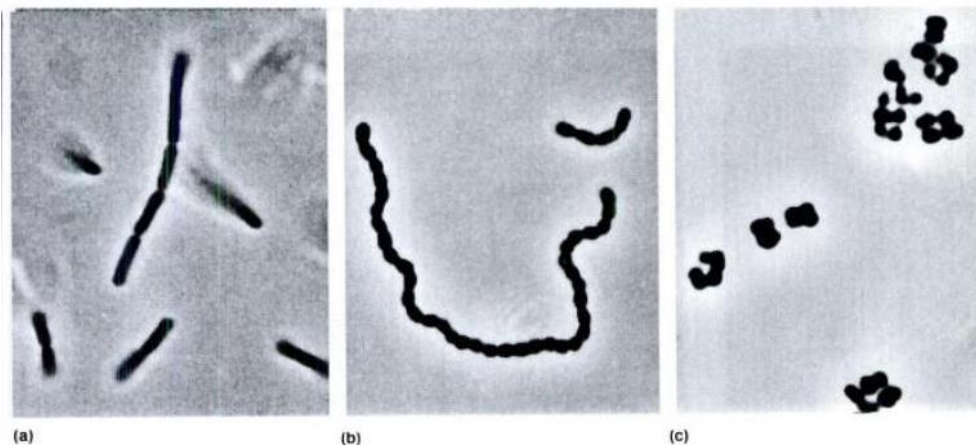


Figura 1. Forma y disposición de las células en tres géneros de bacterias del ácido láctico: (a) *Lactobacillus*; (b) *Streptococcus*; (c) *Pediococcus*. (Royer Y. Stanier *et al.*, 1992).

Las bacterias del ácido láctico son todas anaerobias aerotolerantes que crecen fácilmente sobre la superficie de medios sólidos expuestos al aire. Sin embargo, son incapaces de sintetizar ATP por respiración, lo cual es un reflejo de su incapacidad para sintetizar citocromos y otras enzimas que contengan grupos hemo. Aunque pueden realizar oxidaciones limitadas de unos cuantos compuestos orgánicos, mediadas por enzimas flavoproteicas, bien sean oxidasas o peroxidasas, estas oxidaciones no se acompañan de formación de ATP. Los rendimientos del crecimiento en las bacterias del ácido láctico no son, por consiguiente, afectados por la presencia o ausencia de aire, constituyendo la descomposición fermentativa de los azúcares como fuente de ATP en ambas condiciones.

Una característica común en las bacterias del ácido láctico es la carencia de superóxido dismutasa y el precisar grandes cantidades de manganeso en el medio de crecimiento; ello indica que el Mn^{2+} puede ser empleado en el grupo como sustituto de la superóxido dismutasa. De hecho, el único miembro en el que se ha demostrado actividad superóxido dismutasa detectable es *Streptococcus*.

5.1.1. Morfología macroscópica

Aun creciendo en medios muy ricos, las colonias de las bacteria del ácido láctico (Figura 2) siempre son relativamente pequeñas (tienen como mucho unos cuantos milímetros de diámetro), son redondas y lisas. Casi nunca están pigmentadas; como resultado de la ausencia de citocromos la colonia tiene un aspecto blanco como el yeso, muy característico. El pequeño tamaño de las colonias de estas bacterias es atribuible, en primer lugar, a los bajos rendimientos del crecimiento, consecuencia de su metabolismo exclusivamente fermentativo. Gran parte del volumen de la colonia corresponde al polisacárido. Como los dextranos y los levanos son solo sintetizados a partir de la sacarosa, las especies en cuestión forman las típicas colonias pequeñas sobre medios que contienen cualquier otro azúcar utilizable. (Roger Y. Stanier *et al.*, 1992).

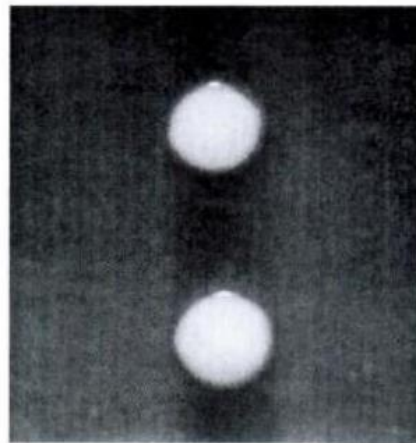


Figura 2. Colonias de bacterias del ácido láctico: *Streptococcus lactis*.

5.1.2. pH

Una característica fisiológica definitiva de las bacterias del ácido láctico es su elevada tolerancia a los ácidos. Las BAL son ácidos tolerantes pudiendo crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3.2, otras a valores tan altos como 9.6, y la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no aguantarían la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos (Ramírez R. J. *et al.*, 2011).

Aunque las bacterias cocoides pueden iniciar su crecimiento en medios neutros o alcalinos, la mayoría de las formas bacilares no pueden crecer en medios con un pH inicial mayor a 6. El crecimiento de las bacterias del ácido láctico continúa hasta que el pH ha bajado, por la fermentación, a un valor de 5 o menos.

5.1.3. Oxígeno en el medio

El carácter microaerófilico de las bacterias lácticas es también variable, si bien ciertas especies necesitan condiciones aerobias para desarrollarse en determinados sustratos.

Los anaerobios sólo se desarrollan en anaerobiosis estricta. Sin embargo, dentro de los facultativos debemos distinguir aquellos que tienen la capacidad de alternar un metabolismo oxidativo aerobio con otro fermentativo, de aquellos otros que nunca pueden utilizar el O₂ como aceptor final de electrones, pero que fermentan indistintamente en presencia y en ausencia de aire. Muchas bacterias lácticas crecen mejor en una atmósfera que contenga del 5 al 10% de CO₂ y algunas no crecen sin este requisito.

5.1.4. Temperatura

Con respecto a las temperaturas en se desarrollan estos microorganismos, los hay: Mesófilos, que crecen entre 25-30°C y termófilos, cuyo rango de temperatura se encuentra entre 40-44°C.

5.1.5. Medios de crecimiento

Las BAL son microorganismos auxótrofos, es decir, requieren una serie de componentes para su multiplicación como: glucosa y lactosa, además de aminoácidos, péptidos, purinas, pirimidinas y vitamina (vitamina B, ácido pantoténico, biotina y ácido fólico) que no pueden ser sintetizados por ellos mismos, debido a lo cual deben encontrarse en el medio de crecimiento.

La leche es el medio típico y satisfactorio para la proliferación de las BAL. Sin embargo, otros alimentos son también excelentes medios de crecimiento y producción de metabolitos de bacterias lácticas, entre ellos se encuentran las masas de cereales, los vegetales y la carne (Ramírez R. J. *et al.*, 2011).

5.1.5.1. Agar MRS

Las bacterias ácido lácticas crecen bien en el medio MRS tanto líquido (caldo) como sólido (agar). El agar MRS fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe, y por su formulación permite el adecuado desarrollo de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas.

La proteasa peptona, el extracto de carne, el extracto de levadura y la glucosa constituyen la fuente nutritiva, ya que aportan nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas. El agar es el agente gelificante (Britanialab).

5.2. Tipos de fermentación de carbohidratos por BAL

Hacia 1920, S. Orla Jensen señaló que las bacterias del ácido láctico podían dividirse en dos subgrupos bioquímicos, que se distinguen por los productos formados a partir de la glucosa: Los *homofermentadores* convierten la glucosa, de modo casi cuantitativo, en ácido láctico; Los *heterofermentadores* la convierten en una mezcla equimolecular de ácido láctico, etanol y CO₂. El modo de fermentar la glucosa puede determinarse de manera muy simple mediante la detección de la producción de CO₂. Sin embargo, como la cantidad producida por los heterofermentadores es muy pequeña (un mol por mol de glucosa fermentada) su detección requiere un procedimiento especial.

La explicación metabólica de la dicotomía de los tipos fermentativos existentes en las bacterias del ácido láctico fue descubierta muchos años más tarde. Los homofermentadores descomponen la glucosa a través de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (Figura 3). Los heterofermentadores, en cambio, no pueden utilizar esta ruta ya que carecen de una enzima clave, la Fructosa-difosfato

aldosalasa, que cataliza la escisión del azúcar-fosfato. (Roger Y. Stanier *et al.*, 1992).

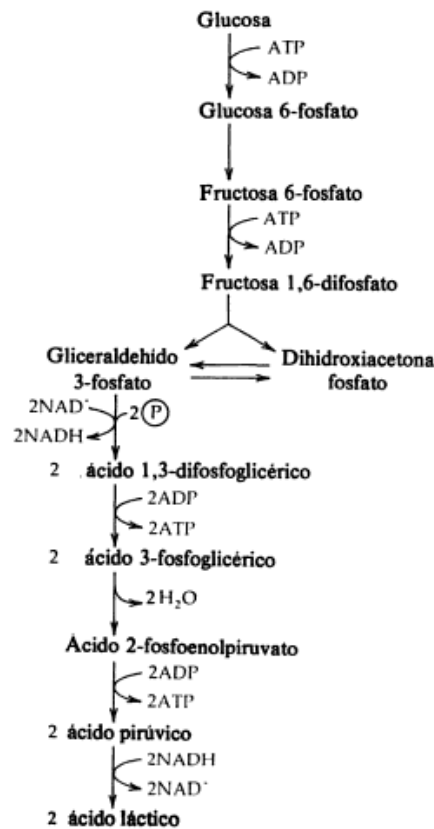


Figura 3. Ruta de Embden Meyerhof Parnas (EMP) por la que las bacterias homofermentadoras del ácido láctico convierten la glucosa en ácido láctico.

Estos organismos catabolizan la glucosa a través de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato (Figura 4); esta fermentación da como resultado proporciones estrictamente equimoleculares de los tres productos: ácido láctico, etanol y CO₂. Una de las principales diferencias entre las dos rutas está en sus rendimientos netos de ATP: dos moles por molécula de glucosa fermentada en la ruta homofermentativa y solo un mol a través de la ruta heterofermentativa.

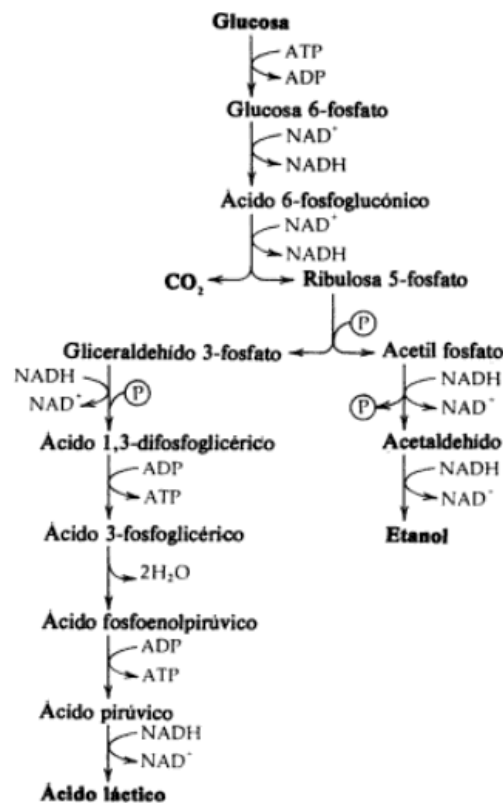
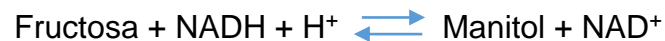


Figura 4. Ruta del catabolismo de la glucosa por las bacterias heterofermentadoras del ácido láctico.

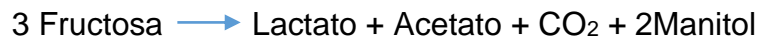
Dos lactobacilos heterofermentadores, *L. brevis* y *L. buchneri*, no pueden crecer anaeróticamente con glucosa porque son incapaces de efectuar la reducción del acetil fosfato a etanol, esencial para mantener el equilibrio redox total. Sin embargo, pueden fermentar glucosa aeróticamente reoxidando NADH a expensas de O₂ mediante una enzima flavoproteica. La reacción total de la fermentación de la glucosa bajo estas condiciones se convierte en:



Ambas especies pueden crecer anaeróticamente a expensas de otra hexosa, la fructosa, porque poseen un manitol deshidrogenasa que determina la reducción de este cetoazúcar al polialcohol manitol:



Esta reducción mantiene el equilibrio redox bajo condiciones anaeróbicas, siendo la ecuación general para la fermentación de la glucosa:



5.3. Clasificación en géneros

La clasificación de las BAL en géneros diferentes es basada en principio en la morfología, modo de fermentación de la glucosa (homofermentativas y heterofermentativas), el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia ácida o alcalina. En la naturaleza existen los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloinococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. Sin embargo, los géneros más representativos son: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*. (Ramírez R. J. et al., 2011).

Dichos géneros se ubican taxonómicamente dentro del Phylum Firmicutes, en la clase Bacilli, orden Lactobacillales (Figura 5).



Figura 5. Árbol filogenético de los géneros de bacterias ácido lácticas, basado en la secuencia del gen 16S del ADN ribosomal.

5.4. Uso de BAL en leches fermentadas y otros alimentos.

La fermentación de la leche para la elaboración de diversos productos es una práctica muy antigua. Las leches fermentadas son productos preparados a partir de la leche entera, parcial o totalmente descremada, concentrada o bien sustituida y fermentada por medio de microorganismos específicos, siendo los principales las BAL.

La transformación de la leche en alimentos fermentados representa varias ventajas. La más evidente de éstas es la conservación, ya que estos productos tienen una vida de anaquel más larga que la de la leche natural; además presentan menor riesgo de contagio de toxiinfecciones que el producto fresco,

debido a los distintos compuestos antimicrobianos producidos por BAL que intervienen en la fermentación, las cuales inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos y productores de toxinas.

Las principales funciones de las bacterias lácticas en productos lácteos son: la producción de ácido, la inhibición de microorganismos indeseables, la reducción de riesgos higiénicos, la coagulación de la leche, la reducción del contenido de azúcares, formación de aromas producidos por el diacetilo y acetaldehído en la mantequilla, la formación de gas requerida para la formación de hoyos en ciertos tipos de quesos y la proteólisis necesaria durante la maduración de los mismos, (Figura 6, Tabla 1). Además, las BAL disminuyen la lipólisis, lo cual evita la rancidez en productos lácteos. (Ramírez R. J. *et al.*, 2011).



Figura 6. Diferentes variedades de quesos.

Tabla 1. Bacterias ácido lácticas utilizadas en la elaboración de productos lácteos.

Productos	Bacterias principales	Usos
Yogurt	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> .	Provee sabor, gusto suave y delicado y promueve la cuajada, mejora la digestión, absorción, contribuye a promover la salud.
Bebidas fermentadas a base de leche	<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus cremoris</i>	Adiciona sabor, contribuye a promover la salud.
Quesos	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus diacetylactis</i> .	Promueve el cuajado, provee aroma y sabor.
Mantequilla madura	<i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Streptococcus diacetylactis</i>	Promueve moderado sabor agrio y aroma.
Crema ácida	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Lactobacillus cremoris</i> <i>Streptococcus lactis spp.</i> <i>Diacetylactis</i>	Promover sabor característico (pequeñas cantidades de acetaldehído y grandes cantidades de diacetilo).
Yakult	<i>Lactobacillus casei</i>	Promueve moderado sabor agrio y aroma, contribuye a promover la salud.

Además del uso de las BAL en la elaboración de leches fermentadas y diversas variedades de quesos; siendo estas las aplicaciones principales, dicho tipo de microorganismos también son utilizados en el procesamiento de carnes, bebidas alcohólicas y vegetales para obtener productos tales como salchichas, jamones, curados, vinos, cerveza, licores fortificados, aceitunas, encurtidos y col agria, entre otros (Tabla 2).

Tabla 2. Utilización de las principales bacterias ácido lácticas.

Género	Principales especies y aplicaciones
Streptococcus	<i>S. lactis</i> , <i>S. cremoris</i> . Mantequilla, queso, yogurt. <i>S. thermophilus</i> . Yogurt, queso.
Pediococcus	<i>P. cerevisiae</i> . Cerveza, carne procesada. <i>P. halophilus</i> . Salsa de soya.
Leuconostoc	<i>L. mesenteroides</i> , <i>L. citrovorum</i> . Alimentos fermentados, producción de dextran.
Lactobacillus	<i>L. bulgaricus</i> . Yogurt, bebidas fermentadas a base de leche. <i>L. helveticus</i> . Queso, yogurt, bebidas a base de leche fermentada. <i>L. acidophilus</i> . Yogurt, bebidas a base de leche fermentada, preparación de lactobacillus.

	<p><i>L. casei</i>. Quesos, leche refinada, bebidas a base de leche fermentada, preparación de lactobacillus. <i>L. plantarum</i>. Diversos alimentos fermentados, ensilajes. <i>L. fermenti</i>, <i>L. brevis</i>. Productos fermentados.</p>
Bifidobacterium	<p><i>B. bifidum</i>, <i>B. infantis</i>, <i>B. longum</i>. Leche fermentada, preparación de bacterias lácticas.</p>

5.5. Componentes antimicrobianos producidos por BAL.

La acción conservadora de las BAL es debido a la inhibición de un gran número de microorganismos patógenos y dañinos por varios productos finales de la fermentación. Estas sustancias son: Ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas y productos secundarios generados por la acción de lactoperoxidasa sobre el peróxido de hidrógeno y tiocia. ((Ramírez R. J. y *et al.*, 2011).

La primera descripción de actividades relacionadas con las bacteriocinas se publicó hace más de ochenta años, cuando se descubrió un antagonismo entre cepas de *Escherichia coli*. Originalmente, estas sustancias fueron llamadas colicinas.

5.6. Bacteriocinas y sus características.

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos heterogéneos, con diferentes niveles y espectros de actividad, mecanismos de acción, peso molecular y propiedades fisicoquímicas. Estas pueden ser sintetizadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas; sin embargo, las producidas por las BAL han sido de gran interés por la industria alimentaria debido a las siguientes razones: se encuentran fácilmente en BAL comerciales (*Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*), son consideradas seguras para su consumo, no son tóxicas para las células eucariotas y presentan un espectro de inhibición más amplio en comparación con los espectros de las bacteriocinas sintetizadas por Gram negativas.

Las bacteriocinas, metabolitos secundarios de las BAL, se definen como productos de la síntesis ribosómica, conformado por péptidos entre 20 y 60 aminoácidos (lactococinas A, B, M, y G, lactacina B y helveticina J, entre otras). Son secretados extracelularmente y presentan una alta actividad bactericida o

bacteriostática sobre cepas de microorganismos patógenos y deteriorativos de alimentos. (Beristain Bauza *et al.*, 2012).

Tagg y *col.*, en 1976, propusieron tres criterios para considerar un compuesto producido por una bacteria gram positiva como una bacteriocina: que sea una proteína activa: que un espectro de inhibición estrecho y que sea bactericida para especies sensibles; si bien incluyeron también a aquellos péptidos que, producidos por algunas gram positivas, poseen un amplio espectro de inhibición. De este modo, los compuestos con acción inhibitoria, que no cumplieran estos requisitos se nombrarían como BLIS (*Bacteriocin Like Inhibitory Substances*). A continuación se presentan las características fundamentales de algunas bacteriocinas reconocidas hasta la actualidad. (Vázquez M., 2011).

Tabla 3. Características de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. Notaciones: N.D. = No determinado; N.R. = Referencia no encontrada.

Bacteriocina	Cepa Productora	Masa molecular (Da)	Estabilidad	Sensibilidad	Espectro de inhibición	Referencia
Lacticina	Lactococcus Lactis DPC3147	N.D.	100°C/10min. pH <5; catalasa	Proteinasa K, tripsina, pronasa E, quimotripsina, pepsina	Ac. Acético, <i>Bacilo</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Listeria</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> ,	Ryan y col., 1996
Diplococina	Lactococcus lactis spp. Cremoris 346	5,300	-75°C	T > 4°C; quimotripsina, tripsina, pronasa, pepsina	<i>Lactococcus</i> , <i>lactis</i> spp. <i>Cremoris</i>	Rogers, 1928; Oxford, 1944
Lactococina I	Lactococcus lactis spp. Cremoris AC1	6,000	100°C/30 min. pH=4.5-7	Enzimas proteolíticas	<i>Lactococcus</i> , <i>Clostridium</i>	Geis y col., 1983.
Lactococinas N y M	Lactococcus lactis spp. Cremoris 9B4	N.D.	N.D.	N.D.	N.R.	Van Belkum y col., 1991

Lactococina B	Lactococcus lactis spp. Cremoris 9B4	5,300	N.D.	N.D.	N.R.	Van Belkum y col., 1991.
Bacteriocina S50	Lactococcus lactis spp. Diacetylactis S50	N.D.	N.D.	N.D.	N.R.	Kojic y col., 1991.
Curvacina A	Lactobacillus curvatus LTH 1174	3,000-5,000	100°C/3 min. Pepsina	Proteinasa K, Tripsina	<i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Carnobacteria</i> , <i>Listeria</i> spp., <i>Micrococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>	Tichaczec y col., 1992
Lacticina A	Lactobacillus delbrueckii spp. Lactis	N.D.	N.D.	60°C/10 min., proteasas	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>Lactis</i>	Toba y col., 1991
Lacticina B	Lactobacillus delbrueckii spp. Lactis	N.D.	N.D.	60°C/10 min., proteasas	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>Lactis</i>	Toba y col., 1991
Sakacina M	Lactobacillus sake 148	4,640	80°C/60 min. 150°C/9 min.	Pepsina, tripsina, papaína, proteasa.	<i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Carnobacteria</i> , <i>Listeria</i> , <i>Staphylococcus</i>	Sobrino y col., 1991
Sakacina P	Lactobacillus sake LTH 673	3,000-5,000	100°C/30 min Pepsina	Proteinasa K, tripsina	<i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Carnobacteria</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Listeria</i>	Tichaczec y col., 1992
Carnocina UI49	Carnobacterium piscícola UI49	3,610	121°C/15 min. pH<8	Enzimas proteolíticas	<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Carnobacteria</i> , <i>Lactococcus</i>	Stoffels y col., 1992.
Enterocina A	Enterococcus faecium CTC492	4,282	N.D.	N.D.	<i>Listeria</i>	Aymerich y col., 1996
Enterocina B	Enterococcus faecium T136	N.D.	N.D.	N.D.	<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i>	Casaus y col., 1997
Enterocina P	Enterococcus faecium P13	N.D.	100°C/60 min. 121°C/15 min. pH= 2-11,	Enzimas proteolíticas	<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. botulinum</i>	Cintas y col., 1997.

5.6.1. Clasificación de bacteriocinas

Hoy en día, en función de su caracterización bioquímica y genética, así como su mecanismo de acción se propone su división en cuatro diferentes clases. (Vázquez M., 2011).

- **Clase I.** Formada por los lantibióticos péptidos de tamaño inferior a 5 KDa que contienen aminoácidos pocos frecuentes tales como la dehidroalanina (DHA), dehidrobutirina (DHB), lantionina y D-metil-lantionina, generados por transformaciones postranscripcionales de los aminoácidos ordinarios: serina, treonina, y cisteína (Liu y Hansen, 1990). Incluye a la nisina, lactinina 481, carnocina UI49 y la lactocina S.
- **Clase II.** Formada por péptidos no lantibióticos (<10 KDa), estables frente al calor. Incluye a la pediocina PA-1, lactococinas A, B y M, leucocina A, sakacinas A y P, entre otras. Adicionalmente de esta clase se han definido cuatro subgrupos:

Ila: Péptidos con actividad antilisterial. Muestran una homología en la secuencia de aminoácidos más pronunciada en la parte N-terminal de los péptidos, siendo las bacteriocinas más representativas, la pediocina PA-1, sakacinas A y P, leucocina A y curvacina A.

Ilb: Formado por bacteriocinas cuya actividad depende de la acción complementaria de dos péptidos. Representan este subgrupo las lactocinas G y M, y la lactacina F.

Ilc: Formado por péptidos con el grupo tiol activado y que requieren para su acción que los residuos de cisteína se encuentren reducidos. La bacteriocina característica de este subgrupo es la lactococina B.

Ild: Está formada por un grupo variable de péptidos lineares entre los cuales se encuentra la lactocoquina A de *L. lactis*.

- **Clase III.** Formada por péptidos de gran tamaño (> 30 KDa) muy termolábiles. Incluyen las helveticinas J y V-1829, la acidofilucina A y las lactaninas A y B.
- **Clase IV.** Formada por complejos lipo o glucoproteicos. Comprenden la plantaricina S, leuconocina S, lactosina 27 y pediocina SJ-1.

5.6.2. Espectro de inhibición

Las bacteriocinas poseen un espectro de inhibición y una potencia de actividad que oscila entre casos como la nisina o pediocina Ach, fuertemente activas como muchas cepas de bacterias Gram+ incluidos patógenos habituales en los alimentos. Los mecanismos por los cuales las bacteriocinas inhiben o matan los organismos sensibles no son aun bien conocidos. Montville y Bruno (1994) presentaron una teoría unificada sobre el modo de acción de las bacteriocinas de BAL que postula una permeabilización de la membrana citoplasmática que causaría una cascada de efectos adversos. (Vázquez M., 2011).

El espectro de inhibición de las bacteriocinas o sus extractos, puede verse afectado según el tratamiento a que son sometidos, como liofilización, concentración de sobrenadante, purificación y neutralización entre otros. En el caso particular de los extractos de bacteriocinas, la actividad es mayor cuando son concentrados, pero es necesario tener en cuenta la termoresistencia para evitar la alteración de la funcionalidad de la bacteriocina. (Milena Vázquez, M., *et al.*, 2009).

Tabla 4. Espectro inhibitorio frente a microorganismos no lácticos de bacteriocinas de BAL.

Micorganismo sensible	Bacteriocinas
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Sakacina A
<i>Bacillus cereus</i>	Lactocina-S, Lactostrepcin-5, Nisina, Pediocina-A, Pediocina-AcH, Sakacina-A.
<i>Bacillus coagulans</i>	Nisina
<i>Bacillus licheniformis</i>	Nisina
<i>Bacillus pumillis</i>	Termofilina
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Nisina
<i>Bacillus subtilis</i>	Lacticina-481, Nisina, Temofilina.
<i>Clostridium bifermentans</i>	Nisina
<i>Clostridium botulinum</i>	Nisina, Pediocina-AcH, Sakacina-A, Sakacina-P.
<i>Clostridium butyricum</i>	Nisina, Reuterina
<i>Clostridium perfringens</i>	Nisina, Pediocina-A, Pediocina-AcH, Pediocina-VTT, Reuterina, Termofilina.
<i>Clostridium sporogenes</i>	Nisina, Pediocina-A.
<i>Clostridium Tyobutricum</i>	Lacticina-481, Lactocina-S, Pediocina-AcH.
<i>Escherichia coli</i>	Reuterina, Termofilina.
<i>Listeria innocua</i>	Lactacina-481, Lactocina-S, Pediocina-A, Pediocina-AcH.
<i>Listeria ivanovii</i>	Pediocina-A, Pediocina- AcH, Pediocina-PAC1.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Curvacina-A, Enterocina-1146, Lactacina-S, Lacticina-481, Leucocin-A, Nisina, Pediocina-A, Pediocina-AcH, Pediocina-JD, Reuterina, Sakacina-A y Sakacina-P.
<i>Listeria seeligeri</i>	Pediocina – A
<i>Listeria welchii</i>	Lacticina-481, Pediocina-A.
<i>Proteus mirabilis</i>	Nisina
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Termofilina
<i>Pseudomona fluorescens</i>	Termofilina
<i>Salmonella enteritidis</i>	Reuterina, Termofilina.
<i>Salmonella infantis</i>	Pediocina-VTT, Reuterina.
<i>Salmonella lyphimurium</i>	Reuterina, Termofilina.
<i>Shiguelia sp.</i>	Reuterina, Termofilina.
<i>Stahylococcus Aureus</i>	Nisina, Lacticina-481, Pediocina-A, Pediocina-AcH, Plantaricina-S.
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Curvacina, Lacticina-481, Lactocina-S, Pediocina-AcH.
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Nisina
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Nisina

Fuente: (Castro albornozy y Valbuena colmenares, 2009)

5.6.3. Mecanismo de acción.

Cotter *et al.* (2005) determinaron que las bacteriocinas de bacterias Gram positivas presentan diferentes modos de acción de acuerdo a su clasificación (Figura 7).

El modo de acción de los lantibióticos se atribuye a la desestabilización (debido a la formación de poros) de las funciones de la membrana citoplasmática. La

estructura de estos péptidos, α -hélice o β -lamina, pueden formar dos caras, una hidrofílica y otra hidrofóbica creando oligómeros que pueden atravesar la membrana formando poros. El lado apolar de la molécula se situará próxima a los lípidos de la membrana y el lado polar al centro del poro. Como consecuencia, se observa una pérdida de iones K^+ , ATP y, en algunos casos aminoácidos y moléculas pequeñas. La pérdida de estas sustancias origina a su vez una pérdida del potencial de la membrana, consumo de las reservas energéticas celulares, descenso de la síntesis del ADN, ARN y proteínas, originando la muerte celular (McAuliffe *et al.*, 2001). Algunos miembros de la clase I, como la nisina, han demostrado un modo de acción dual. La nisina, se une a la pared celular mediante atracciones electrostáticas, lo cual se facilita debido a la carga positiva de este péptido y las cargas negativas de los componentes de la pared celular. Posteriormente, la nisina se une al lípido II, el transportador principal de las subunidades de peptidoglicano desde el citoplasma a la pared celular, y por lo tanto proviene la síntesis correcta de la pared celular, provocando la formación de un poro transmembranal permitiendo la salida de aminoácidos y ATP, lo que conduce a la muerte celular (Cotter *et al.*, 2005).

El mecanismo de acción de las bacteriocinas de la clase III "bacteriolisinas" es menos complejo con respecto a los antibióticos y los no-antibióticos, ya que actúan directamente sobre la pared celular de las bacterias Gram positivas lo que conduce a la muerte y lisis de la célula (Cotter *et al.*, 2005).

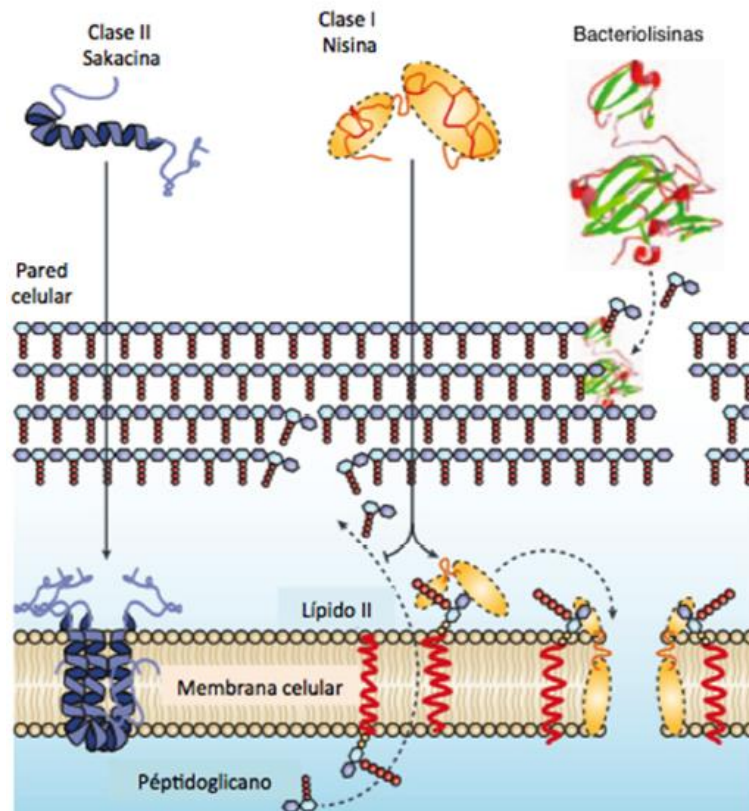


Figura 7. Modo de acción de los lantibióticos (Clase I), no-lantibióticos (Clase II) y bacteriolisinas (Clase III). (Adaptado de Cotter *et al.*, 2005).

5.6.4. Propiedades bioquímicas de bacteriocinas

Debido a su naturaleza proteica, todas las bacteriocinas se inactivan por una o más enzimas proteolíticas, incluyendo aquellas de origen pancreático (tripsina y α -quimotripsina) y algunas de origen gástrico, como la pepsina. Esta característica permite la utilización de bacteriocinas en productos alimenticios, puesto que son inactivas durante su paso por el tracto gastrointestinal, sin ser absorbidos como compuestos activos y sin causar los riesgos relacionados con el uso de antibióticos (Katusic A., 2002), por lo tanto su ingesta resulta inocua para el consumidor y no altera la microbiota intestinal normal.

5.6.5. Producción de bacteriocinas

La producción de bacteriocinas depende del crecimiento y actividad fisiológica de la cepa productora. De hecho, la mayoría de las bacteriocinas que se han

estudiado hasta el momento presentan una cinética de metabolito primario y, en consecuencia, su producción está correlacionada con el aumento de la biomasa. Por otro lado, el control del pH a lo largo de la fermentación puede resultar en valores más altos de actividad (Martínez Fernández, 1996).

Consecuentemente, la naturaleza de la cepa productora, la composición del medio de cultivo (relación entre carbono, nitrógeno y fósforo), las condiciones de fermentación (temperatura, tiempo de crecimiento, pH inicial y final, generalmente entre 5.5 a 6.0, agitación, aireación, etc) son factores muy importantes que influyen en la producción de las bacteriocinas. Hay BAL que producen más de una bacteriocina, y en este caso el pH y temperatura del medio juegan un papel muy importante en dicha producción (Yin L. *et al.*, 2004).

5.7. Pruebas de susceptibilidad a las bacteriocinas

Se basa en la formación de halos de inhibición que causan los extractos de bacteriocinas sobre el crecimiento en césped de un microorganismo sensible.

5.7.1. Método de Difusión en placa (Kirby y Bauer)

En este método se emplean discos de papel absorbente, impregnados con una concentración conocida del extracto antimicrobiano. Estos discos se colocan sobre la superficie de la placa de agar, en la que se inocula una suspensión de la cepa por probar. Cuando el disco se humedece, el antimicrobiano difunde radialmente hacia afuera y crea un gradiente de concentración por disco; así, el antimicrobiano está en alta concentración dentro del disco. El diámetro del anillo de inhibición en el agar dependerá de la sensibilidad o resistencia del microorganismo a probar. Por esta razón es muy necesario controlar las condiciones de cultivo, su espesor, el tiempo de incubación y la concentración de bacterias inoculadas, entre otros factores. Si se presentan zonas de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos, los diámetros resultantes permiten establecer si la cepa es resistente o susceptible al antimicrobiano expuesto (Evelyn Rodríguez C. *et al.*, 2005).

5.7.2. Métodos en tubos

Se basa en cuantificar turbidimétricamente la disminución de la densidad celular de un cultivo del microorganismo indicador causada por la dosificación de diferentes concentraciones de extracto bacteriocínico. Es decir, una unidad de actividad se define como la concentración de bacteriocina necesaria para inhibir la mitad de la población inicial, o lo que es lo mismo, la dosis letal 50% (Vázquez M., 2011).

5.8. Aplicación de las bacteriocinas en alimentos.

La aplicación puede realizarse, bien mediante la fermentación del producto por bacterias iniciadoras que sean, a su vez productoras (producción *in situ*) -opción solo viable cuando la flora láctica es la mayoritaria-, o bien añadiendo la bacteriocina directamente en el alimento. En la actualidad, la única bacteriocina permitida como aditivo alimentario es la nisina (Vázquez M., 2011).

5.8.1. Productos lácteos

Los primeros estudios de aplicación de las bacteriocinas en quesos se remontan en los años 50, utilizándose junto con los iniciadores cepas productoras de nisina para prevenir la presencia de clostridios en la fabricación del queso Gruyère. Aunque en ocasiones la nisina producida alentaba el proceso y ocasionaba un diferencia en las características del producto final.

En la leche fresca y derivados, la aplicación de bacteriocinas permite mantener la vida útil de los productos reduciendo la temperatura de procesado. Lo mismo sucede en la elaboración de la leche en polvo.

5.8.2. Productos cárnicos

Para alimentos cárnicos, las bacteriocinas pueden llegar a sustituir el uso de nitritos, sin embargo es necesario determinar la bacteriocina adecuada que no requiera de una elevada concentración de aplicación (Rojas & Vargas, 2008). Se han realizado estudios con nisina con el objetivo de reducir el nivel de nitritos en carnes, los resultados muestran que se requieren altos niveles de nisina para alcanzar un buen control de *Clostridium botulinum* debido a la unión de la nisina

con partículas cárnicas, distribución no homogénea, pobre solubilidad en sistemas cárnicos o a la posible interferencia en la actividad de fosfolípidos cárnicos (Abee, 2005).

La nisina no es la bacteriocina más adecuada para aplicar en productos cárnicos no fermentados por su baja solubilidad al pH de la carne (lo que implica, a su vez, una difícil distribución uniforme en el alimento) y su tendencia a absorberse a las proteínas. Por ello, se ha propuesto su aplicación inmovilizada en geles de alginato (Vázquez M., 2011).

Con todo, la nisina se empleó con éxito en panceta y carne de ternera almacenadas al vacío y en salchichas.

5.8.3. Productos de pesca

Los estudios de aplicación de bacteriocinas en productos de la pesca son realmente escasos. En el caso del pescado fresco se debe a que son las bacterias Gram positivas las principales responsables de su deterioro.

Los productos marítimos, tanto en empaque al vacío como en atmósfera modificada tienen un alto riesgo de infestación o contaminación por *C. botulinum*, el uso de bacteriocinas ha demostrado ser efectivo en productos como langosta y el salmón ahumado en el control de *Listeria monocytogenes* (Rojas & Vargas, 2008). En el caso del pescado fresco se debe su utilización a que son las bacterias las principales responsables de su deterioro.

5.8.4. Productos enlatados y conservas

En alimentos enlatados como hongos, maíz, zanahoria, las bacteriocinas se utilizan para el control de termófilos esporulados, por ser productos de baja acidez que reciben un tratamiento térmico mínimo (Rojas & Vargas, 2008). La nisina se utiliza para disminuir la intensidad del tratamiento térmico de los alimentos enlatados mejorando la apariencia y sabor del producto final sin comprometer la seguridad del alimento (Agudelo Londoño, N. 2013).

5.8.5. Cerveza y vino

La resistencia de las levaduras a la nisina permite que ésta pueda ser usada para controlar el deterioro por bacterias ácido lácticas en cervezas y vinos.

La nisina y la pediocina PA-1 por su resistencia a las levaduras se comportan como un eficaz agente antimicrobiano frente a las bacterias lácticas en cervezas y vinos, se utilizan para reducir la cantidad de dióxido de azufre usado en la elaboración del vino y para controlar las bacterias causantes de deterioro (Agudelo Londoño, N. 2013).

5.9. Bacterias patógenas.

Actualmente las bacterias lácticas no solo tienen importancia por su papel en la producción de alimentos fermentados sino también por la capacidad antimicrobiana de las bacteriocinas que estas producen y que ha sido objeto de investigación durante las dos últimas décadas.

Las bacteriocinas que producen las BAL han sido intensamente estudiadas por su actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas tales como: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella T.*, *Escherichia coli*, entre otras.

Los hábitos de alimentación de ciertas bacterias amenazan nuestra salud y nuestro bienestar. Las bacterias patógenas sintetizan sustancias tóxicas que producen daños en el organismo humano, dando lugar a muchas enfermedades.

5.9.1. *Salmonella typhi*

Esta especie es el agente responsable de la fiebre tifoidea, una infección intestinal febril, potencialmente mortal. Los microorganismos de esta especie se diferencian del resto de las especies de *Salmonella* en que solo infectan a los seres humanos; entre los factores de virulencia se incluyen la invasividad de una endotoxina, responsable de la elevada fiebre, típica de esta enfermedad (John L. *et al.*, 1998).

Estas bacterias son mesófilas que crecen en un rango de temperatura de 25°C a 40°C, pero su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, con un pH 7.



Figura 8. Una de las propiedades diferenciales de *Salmonella typhi* es su motilidad. En las células se pueden visualizar sus flagelos.

5.9.2. *Escherichia coli*

Es un huésped constante del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente. Tiene el inconveniente de vivir poco tiempo en el ambiente extraentérico, por lo que su presencia en los alimentos indica contaminación reciente. Se destruye a temperatura de pasteurización y también durante su almacenamiento en frío, sobre todo a temperatura de congelación. Es un germen de forma bacilar, casi siempre móvil, Gram (-). Las cepas de *E. coli* producen diferentes toxinas dando lugar a síntomas de enfermedad en el organismo humano. Es mucho menos resistente que la salmonella (Pascual Anderson, M. R., 2000).



Figura 9. Una característica de *E. coli*, es su forma bacilar.

5.9.3. *Staphylococcus aureus*

Es un importante patógeno de los seres humanos, que causa una gran variedad de síndromes clínicos. *S. aureus* es un coco Gram+, que suele presentar una disposición característica en forma de racimo de uvas. La gastroenteritis causada por la intoxicación estafilocócica suele ir acompañada de vómitos, diarrea y espasmos abdominales dolorosos (John L. *et al.*, 1998).

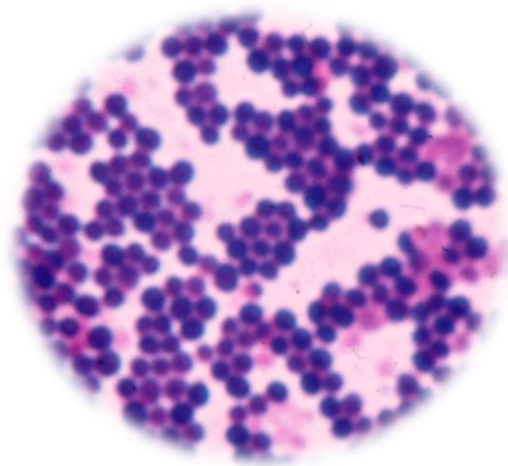


Figura 10. Forma microscópica de *S. Aureus*.

5.10. Biología molecular

El desarrollo del aislamiento, separación y amplificación de ácidos nucleicos desde 1975, ha llevado a la aplicación de métodos basados en dichos ácidos nucleicos para dar solución a muchos problemas epidemiológicos e industriales específicos. La biología molecular se ocupa de estudiar los procesos celulares implicados en la transmisión de la información genética a nivel celular, esta información genética está localizada en unidades discretas (genes) los cuales codifican la información valiéndose de moléculas intermediarias como el ARNm.

Los métodos de identificación molecular están basados en la caracterización física de moléculas (ácidos grasos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos, y otros compuestos químicos), y son de aplicación a nivel universal (Suárez Ramírez *et al.*, 2007).

5.10.1. Métodos de extracción

Para extraer los ácidos nucleicos del material biológico es preciso provocar una lisis celular, inactivar las nucleasas celulares y separar los ácidos nucleicos de los restos de células. El procedimiento de lisis idóneo suele consistir en un equilibrio de técnicas y ha de ser suficientemente fuerte para romper el material inicial complejo (un tejido, por ejemplo), pero suficientemente suave para preservar el ácido nucleico. Entre los procedimientos usuales de lisis figuran los siguientes:

- Rotura mecánica (trituration, lisis hipotónica, etc.).
- Tratamiento químico (detergentes, reducción con tioles, etc.).
- Digestión enzimática (Proteinasa K, etc.).

Es posible romper la membrana celular e inactivar las nucleasas intracelulares al mismo tiempo. Tras la lisis celular y la inactivación de las nucleasas, los restos de células se eliminan fácilmente por filtración o precipitación (Maddalena Querci *et al.*, 2007)

5.10.2. Cuantificación de ADN mediante espectrofotometría

El ADN, el ARN, los oligonucleótidos e incluso los mononucleótidos pueden cuantificarse directamente en soluciones acuosas, en forma diluida o sin diluir, midiendo la absorbancia A (o densidad óptica, DO) de luz ultravioleta (también puede hacerse en el intervalo visible). En este método, los tampones acuosos con escasa concentración iónica (por ejemplo, tampón TE) resultan idóneos. La concentración de ácidos nucleicos suele determinarse midiendo a 260 nm y comparando con un blanco. La interferencia de contaminantes puede determinarse calculando un «cociente». Dado que las proteínas absorben a 280nm, se emplea el cociente A_{260}/A_{280} para calcular la pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes respectivos del ADN y el ARN puros son aproximadamente de 1,8 y 2,0. Una absorción a 230nm significa que la muestra está contaminada con hidratos de carbono, péptidos, fenoles, compuestos aromáticos u otras sustancias (Maddalena Querci *et al.*, 2007).

5.10.3. Electroforesis para la calidad del ADN

Esta técnica se basa en la separación de las macromoléculas en función de su tamaño y carga eléctrica superficial. Donde, las partículas con carga positiva migran hacia el cátodo y las partículas negativas hacia el ánodo. Este proceso permite calcular la cantidad de ácidos nucleicos y al mismo tiempo su estado físico a partir de la intensidad de la fluorescencia emitida por el Gel Red con la luz ultravioleta (UV). También se puede visualizar si en la muestra de ADN existe alguna presencia de contaminantes o degradación que afecte su posterior análisis.

5.10.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de la PCR, fue ideada por Kary Mullis a mediados de los ochenta, y ha revolucionado la genética molecular al hacer posible un mayor acercamiento al estudio de los genes. Es un procedimiento rápido para la amplificación enzimática *in vitro* de un segmento específico de ADN.

La PCR explota ciertos rasgos de la replicación del ADN. La ADN polimerasa usa una cadena sencilla de ADN como plantilla para la síntesis de la cadena complementaria. Estas plantillas de cadena sencilla del ADN se pueden producir simplemente calentando la doble cadena de ADN a temperaturas cercanas a la ebullición. La ADN polimerasa además requiere una pequeña sección de cadena doble de ADN para iniciar la síntesis. De esta manera el punto de inicio para la síntesis de ADN puede especificarse al proveer de un oligonucleótido iniciador (Primer) que se anilla a la plantilla en este punto. Este es el primer rasgo importante de la PCR: que la ADN polimerasa puede ser direccionada para sintetizar una región específica de ADN (Suárez Ramírez *et al.*, 2007).

5.10.4.1. Región 16s del ADNr

Anteriormente la identificación de las BAL se realizaba mediante pruebas bioquímicas y morfológicas de las colonias bacterianas, desafortunadamente estas técnicas no aportaban resultados seguros.

Por esta razón elegir el ADNr para la identificación de especies constituye una buena alternativa, ya que es una región con mayor presencia en las especies bacterianas y es un agente de vital importancia en la síntesis de proteínas. Esto permite ver variaciones dentro de una misma especie, y así identificar cepas del producto en cuestión (Suárez Ramírez *et al.*, 2007).

5.10.5. Electroforesis de PCR

Para visualizar los fragmentos amplificados, se corre una electroforesis en gel de agarosa, este es un método simple, y altamente efectivo para separar, identificar y purificar fragmentos de 0.5 a 25 Kb (kilobases) de ADN. Este proceso puede dividirse en tres etapas:

1. Se prepara un gel con una concentración de agarosa apropiada para el tamaño de los fragmentos de ADN a ser separados.
2. Las muestras de ADN son cargadas en las cámaras y el gel se corre a un voltaje específico y por un periodo de tiempo que logre la separación óptima.
3. El gel es visualizado directamente con iluminación ultravioleta (UV). Posteriormente se realiza el análisis de las bandas evidenciadas. Dicho análisis consiste en que cada banda corresponde al peso molecular del fragmento amplificado, lo cual se verifica con un marcador de peso molecular que se monta en la corrida. Se espera que el fragmento amplificado difiera para cada especie en suficientes pares de bases, de manera que se pueda diferenciar la banda según su peso (Suárez Ramírez *et al.*, 2007).

6. MATERIALES Y METODOS

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de Microbiología y fermentaciones del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la UAAAN. Se asignaron ocho cepas de bacterias ácido lácticas aislada de diferentes muestras de leches de la región, cada una marcada con su respectiva clave (Tabla 5).

Tabla 5. Cepas de BAL aisladas.

Muestras de BAL	Fuente
BAA	Leche materna
BS1	Leche materna
LC1	Leche de cabra
LC2	Leche de cabra
BD	Leche materna
BD2	Leche materna
XE	Leche de vaca
X	Leche de vaca

6.1. Etapa 1: Purificación e identificación macroscópica y microscópica de BAL para su conservación.

6.1.1. Purificación

Se preparó una cantidad específica de medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) con un pH de 6.5, se esterilizó en una autoclave a 121°C durante 15 minutos y se vació en cajas Petri agregando 20 ml del medio a cada caja, en este proceso se utilizó una campana de flujo laminar vertical (Scorpion Scientific, Modelo: A 80000), donde los materiales utilizados estaban previamente esterilizados, esto con el objetivo de eliminar cualquier contaminación por microorganismos no deseados.

La siembra de las BAL se realizó en una campana de flujo laminar bajo condiciones asépticas, se tomó una azada de cada cepa y se sembró sobre el agar utilizando el método de estriado por agotamiento para disminuir la carga microbiana. Las cajas inoculadas se etiquetaron y se sellaron correctamente con parafilm (plástico flexible) para evitar su contaminación, se metieron en un frasco (Figura 11), se le inyectó nitrógeno para dar condiciones anaeróbicas y después se incubaron (Incubadora arsa, Modelo: AR-130D) a 37°C durante 48 Horas.

Cuando las cepas crecieron, se tomó un inóculo de una colonia aislada (Figura 12) y se resembró en una nueva caja petri con agar MRS, este procedimiento se repitió (Tres veces) hasta obtener un cultivo puro.



Figura 11. Incubación de BAL en condiciones de anaerobiosis.

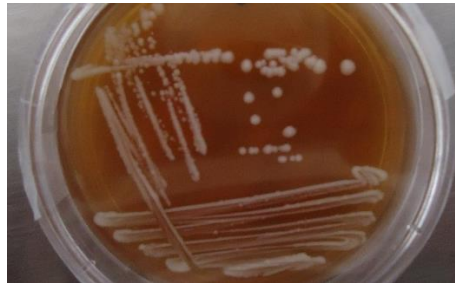


Figura 12. Colonias aisladas de BAL sembradas por el método de estriado por agotamiento para reducir la población microbiana.

6.1.2. Morfología macroscópica y microscópica

Del cultivo puro obtenido se visualizaron todas las características macroscópicas (Forma, color y tamaño de las colonias) y específicas de cada cepa. En cambio, para observar la morfología microscópica (forma y color de la bacteria) se tomó un inóculo del mismo cultivo (Cultivo puro) y se realizó un frotis sobre un portaobjeto previamente lavado y desinfectado, después se hizo una tinción de Gram (Anexo 1) a la muestra, se agregó una gota de aceite de inmersión y se observó con el objetivo 100X en un microscopio (LABOMED, Modelo: CxL) para asegurar su purificación y su morfología (Figura 13) específica de una BAL.

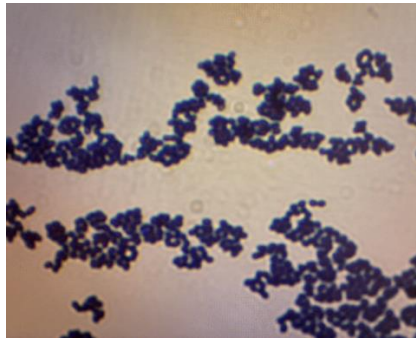


Figura 13. Características microscópicas de BAL.

6.1.3. Conservación de BAL

Las cepas previamente purificadas e identificadas morfológicamente como bacterias lácticas, se cultivaron en frascos estériles de 50 ml (Figura 14) agregando una cantidad de 10 ml de caldo MRS a pH de 6.5, el medio fue inoculado con una colonia pura de cada cepa, luego se inyectaron con nitrógeno para proporcionar condiciones anaeróbicas a las BAL y se incubaron a 37°C durante un periodo de 24 horas.



Figura 14. Frascos con caldo MRS inoculados con cepas de BAL en condiciones anaeróbicas.

Para mantener las cepas en conservación se hizo una mezcla de glicerol al 10% y leche descremada al 10% en 100 ml de agua destilada. Se agregó 10ml de la mezcla a cada frasco que contenía el medio de cultivo y se homogenizó suavemente. Después, con una micropipeta se tomó un mililitro de la mezcla homogenizada y se vació en un tubo eppendorf (Figura 15), estos tubos se mantienen en congelación a una temperatura de -22°C para conservar las cepas.



Figura 15. Conservación de las cepas en tubos eppendorf.

6.2. Etapa 2: Evaluación del efecto antimicrobiano de las bacteriocinas.

Se llevó a cabo una fermentación en 20 ml de caldo MRS inoculadas con las cepas puras de las BAL durante 120 horas en condiciones anaeróbicas para obtener una buena producción de bacteriocinas. Transcurrido el tiempo de incubación, el medio se sacó y se agregaron 5 ml del medio en 4 tubos falcon. Estos tubos se sometieron a baño María (Thermo Scientific, Modelo: 2870) utilizando en cada uno tiempos y temperaturas diferentes (figura 16), después, el medio se centrifugó (Centrifuga Unico; Power Spin, Modelo: C8624) a 3400 rpm durante 15 minutos (Figura 17) y el sobrenadante obtenido se filtró con un Millipore (Membrana de 0.45 μm) para obtener un extracto libre de biomasa. Se realizó el mismo procedimiento para las 8 cepas por separado.



Figura 16. Baño maría para los diferentes tratamientos de tiempo y temperatura.



Figura 17. Separación de la biomasa y el extracto mediante una centrifugación.

Posteriormente se realizó el método de difusión en disco para determinar el efecto de inhibición (Kirby y Bauer), es decir, sobre placas de agar nutritivo se sembraron cepas de bacterias patógenas y se colocaron sobre ellas discos de papel (tres repeticiones), a cada disco se le agregó 20 μ l del extracto que contenía a las bacteriocinas y se incubaron a 37°C durante 48 hrs. Trascurrido el tiempo, se midió el halo de inhibición (Figura 18) en cm y se llevó a cabo un Modelo lineal racional para seleccionar la mejor cepa con capacidad inhibitoria.



Figura 18. Halo de inhibición contra bacterias patógenas provocado por el efecto de las bacteriocinas.

Modelo lineal racional

Los porcentajes en la ecuación se asignaron de acuerdo al patógeno de mayor importancia para su inhibición. Quedando de la siguiente manera:

$$I = (50)S + (15)E + (35)A$$

Dónde: I = Inhibición
S = Salmonella typhi
E = E. coli
A = S. aureus

6.3. Etapa 3. Cinética de crecimiento de BAL en jugo de aloe vera.

En esta etapa se realizó una fermentación en jugo de aloe vera para analizar las cinéticas de crecimiento de las dos mejores cepas productoras de bacteriocinas con mayor efecto antimicrobiano. Para su análisis se utilizó jugo de aloe vera como medio de crecimiento para las BAL y se determinó la producción de biomasa por espectrofotometría, el pH y azúcares totales presentes en el medio.

6.3.1. Preparación e inoculación del jugo de Aloe vera

Se realizó una limpieza a las hojas del aloe vera para poder extraer el gel que se encuentra dentro de las hojas (Figura 19). El cual se homogenizó mediante una licuadora, para obtener un concentrado de Aloe vera. Una vez obtenido el concentrado se tomó 480 ml del concentrado de Aloe vera, a los cuales se les adicionaron 30 μ L de celulasa por cada 50 ml de muestra, después se sometió a 60 °C por 15 min, para eliminar la viscosidad del concentrado. Finalizado el proceso se filtró por medio de una bomba de vacío (Figura 20), para eliminar la pulpa, dando como resultado un líquido transparente.



Figura 19. Extracción de la pulpa de aloe vera.



Figura 20. Filtración del jugo a través de una bomba de vacío.

El líquido que se obtuvo se vació en frascos de vidrio, estos se sellaron correctamente y se sometieron a un proceso de esterilización durante 15 minutos a 121°C (15 Psi), después se dejaron enfriar y se inocularon con las cepas puras de BAL. Al cultivo se le inyectó nitrógeno para mantener el crecimiento en anaerobiosis (Figura 21).



Figura 21. Fermentación de BAL en jugo de aloe vera.

6.3.2. Monitoreo

Durante la incubación se realizó un monitoreo cada 4 horas durante 51 horas de incubación. En cada monitoreo se tomó una muestra del medio con una jeringa para no destapar el frasco. Para la producción de biomasa se leyó la absorbancia de la muestra con un espectrofotómetro (VELAB, Modelo: VE 5600UV), el pH se midió con un potenciómetro (HANNA, Modelo: HI 98127) y se determinó la concentración de azúcares totales presentes, cada prueba por triplicado. Todo el proceso se realizó bajo condiciones estériles para evitar la contaminación del cultivo.

6.3.3. Determinación de azúcares totales (Método de Dubois 1956)

En un tubo de ensaye se mezcló 180 μ l de agua destilada y 30 μ l de la muestra extraída del cultivo, la determinación se realizó por triplicado. Sobre cada mezcla y con el equipo de protección adecuado se adiciono 200 μ l de fenol 80% recién preparado. Posteriormente se adiciona 1 ml de ácido sulfúrico concentrado, dejarlo caer sobre las paredes del tubo. Agitar por un minuto y tener cuidado con el desprendimiento de vapores. Dejar enfriar a temperatura ambiente y en oscuridad, el compuesto que se forma es estable por 36 horas (Figura 22). Se procedió a leer absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro (VELAB, Modelo: VE 5600UV) y los datos se comparan con una curva patrón (Anexo 2) que se realizó previamente. El blanco de la determinación es: 210 μ l de agua destilada, 200 μ l de fenol 80% y 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. El cual se prepara al mismo tiempo que las muestras. Después, se calculó el contenido de azúcares

totales detectables por esta metodología. El contenido se expresa en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, referidos al patrón.



Figura 22. Coloración provocada por las muestras para la determinación de azúcares totales.

6.4. Etapa 4. Identificación molecular de las cepas de BAL.

6.4.1. Extracción de ADN de Bacterias Acido lácticas

Se obtuvo un cultivo puro en agar MRS y las células se resuspendieron en 500 μl de urea 6M y 100 μl de SDS 10%. Se incubó a 37°C durante veinte minutos, y después se mantuvo en ebullición (baño maría) durante cinco minutos. Las muestras se centrifugaron a 8000 rpm durante diez minutos a 25°C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y las células se incubaron con 100 μl de NaOH 0.2N a 37°C durante diez minutos. Para separar cualquier desecho, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante tres minutos a 25°C. Después, se desechó el precipitado y se resuspendió el sobrenadante (ahí se encuentra el ADN) en 2.5 volumen de etanol absoluto y se incubó a -20°C durante dos horas. Transcurrido el tiempo, las muestras se sacaron y se centrifugaron a 13000 rpm durante quince minutos a 4°C. Las pastillas (precipitado) de ADN se lavaron con etanol al 70%, se dejaron secar y se resuspendieron en 50 μl de Buffer TE (10 mM Trizma base, 1mM EDTA). El ADN se conservó en refrigeración a 4°C.

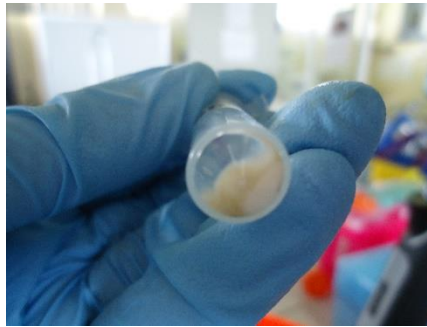


Figura 23. Precipitado de las células en un tubo eppendorf para la obtención de ADN.

6.4.2. Cuantificación de ADN

Para la cuantificación del ADN se utilizó un espectrofotómetro (Thermo Scientific; Modelo G10S UV-Vis). Primeramente se midió el blanco con 200 μ l de agua Milli Q y posteriormente las muestras, en este proceso se agregaron 198 μ l de agua Milli Q y 2 μ l de muestra. Posteriormente se tomaron los datos de Absorbancia a 260.0 nm, Absorbancia 280.0 nm, y el valor R. Los datos obtenidos se acomodaron en una tabla y se sustituyeron en otras fórmulas.

Tabla 6. Fórmulas para la sustitución de los datos obtenidos en la cuantificación del ADN.

Muestra	260.0 nm	280.0 nm	R	μ g/ml	μ g Totales
(Código)	Abs1	Abs 2	$(Abs1)/(Abs2)$	$(Abs1)(100)(50)$	$(\mu g/ml)(0.05)$

Nota: las muestras de ADN se mantienen en refrigeración a 4°C para su posterior análisis.



Figura 24. Espectrofotómetro en proceso de calibración para cuantificar ADN.

6.4.3. Electroforesis horizontal de agarosa al 1% para medir la calidad del ADN

En un matraz Erlenmeyer de 250 ml se disolvió 1.5 gramos de agarosa en 150 ml de Buffer TBE 0.5X (40 mM Trizma base, 45 mM Ácido Bórico y 1 mM EDTA) con pH de 8.0 - 8.3. Posteriormente la mezcla se calentó con agitación en una parrilla eléctrica hasta quedar transparente y en ebullición, cuidando que no se derramara el contenido. Se dejó enfriar la agarosa hasta una temperatura de 45°C y con una micropipeta se le agregó 15 µl de bromuro de etidio (la puntilla se colocó en la caja de material peligroso). Después, la mezcla se vació en el portagel previamente limpio y con el peine dentro para formar los pocitos donde serían depositadas las muestras. Durante el vaciado se evitó la formación de burbujas y el gel se dejó solidificar durante 20-30 minutos, transcurrido el tiempo se retiró el peine del portagel evitando cualquier ruptura. El portagel se acomodó en la cámara de electroforesis (Labnet; Modelo E1015-15) y se llenó de Buffer TBE hasta la marca señalada en la misma. Para adicionar la muestra, sobre una tira de parafilm se colocó 5 µl de azul de bromofenol y 10 µl de muestra de ADN, se mezcló suavemente haciendo 5 pipeteos constantes y después se vertió en un pozo del gel dentro de la cámara de electroforesis. Una vez agregadas las muestras, la cámara se conectó a una fuente de poder (Labnet; Modelo E0303) uniendo los polos (Rojo y negro) adecuadamente y se dejó correr el gel a 90 Voltios durante 30 o 45 minutos (Figura 24). El gel se puso sobre un Transiluminador (UVP; M-20V) se conectó a la corriente y se encendió la luz UV

para observar las bandas de las muestras y capturar una foto con el Software UVP para asegurar la calidad del ADN. Se utilizaron lentes especiales para evitar el contacto directo con los rayos UV.

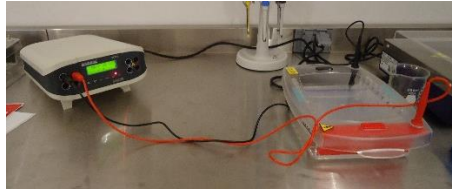


Figura 25. Cámara de electroforesis horizontal corriendo muestras de ADN en gel de agarosa.

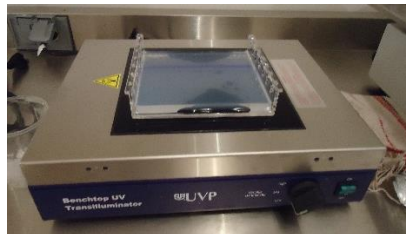


Figura 26. Gel de electroforesis sobre el transiluminador de luz UV para observar la calidad de las bandas.

6.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para identificar el Gen 16S del ADN ribosomal se utilizaron los siguientes primers:

27 F → 5-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (100 pmol/μl)

1492 R → 5-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' (100 pmol/μl)

Primeramente se realizó la preparación de la solución de trabajo de los primers a una concentración de 15 pmol, y por consiguiente el coctel de reactivos, los cuales se mantuvieron en congelación. Estos reactivos se adicionaron en las siguientes cantidades:

Tabla 7. Cantidades de los reactivos utilizados para PCR.

Reactivos	Concentración	Cantidad (1 muestra)
Buffer de reacción 10X	10 X	2.5 µl
Mg Cl ₂	25 mM	1.5 µl
Primer 27 F	15 pmol	0.83 µl
Primer 1492 R	15 pmol	0.83 µl
DNTP'S	25 mM	0.2 µl
Enzima Taq-Plimeraza	5 unidades/µl	0.2 µl
Agua deshionizada	—	18 µl
TOTAL.....		24 µl

El coctel de reactivos se me mezcló suavemente para evitar la formación de burbujas y se introdujo en microtubos de 0.5 µl previamente etiquetados, después, se adicionó 1 µl de muestra de ADN que se mantenía en refrigeración, quedando así un volumen total de 25 µl por cada tubo. Todo el proceso se realizó bajo condiciones de limpieza y materiales previamente esterilizados.

Posteriormente las muestras se introdujeron a un Termociclador (Labnet; Multigene OPTIMAX) donde se llevó a cabo la PCR para amplificar el gen 16s mediante un barrido inicial para determinar la temperatura de anillamiento (TM) de los primers, tomando en cuenta las siguientes condiciones de PCR (Tabla 8) con 35 ciclos.

Tabla 8. Tiempos y temperaturas para PCR.

TIEMPO	TEMPERATURA	CICLO
2 minutos	94° C	—
1 minuto	94° C	✓
1 minuto	TM	✓
1 minuto	72° C	✓
10 minutos	72° C	—
Infinito (∞)	4° C	—

Finalizado el proceso, se realizó una electroforesis del producto obtenido con gel de agarosa al 3% para identificar las muestras amplificadas. El producto de PCR se mantienen en congelación a -20°C .



Figura 27. Termociclador con muestras de ADN, preparadas para realizar la PCR.

6.4.5. Electroforesis de PCR con gel de agarosa al 3%

En un matraz Erlenmeyer de 250 ml se disolvieron 4.5 gramos de agarosa en 150 ml de Buffer TBE 0.5X (40 mM Trizma base, 45 mM Ácido Bórico y 1 mM EDTA) con pH de 8.0 - 8.3. Posteriormente la mezcla se calentó con agitación en una parrilla eléctrica hasta quedar transparente y en ebullición. Se dejó enfriar la agarosa hasta una temperatura de 45°C y con una micropipeta se le agregó 15 μl de bromuro de etidio (la puntilla se colocó en la caja de material peligroso). Después, la mezcla se vació en el portagel previamente limpio y con el peine dentro para formar los pocitos donde se depositaron las muestras. Durante el vaciado se evita la formación de burbujas y el gel se deja solidificar durante 30-40 minutos, transcurrido el tiempo se retiró el peine del portagel evitando cualquier ruptura. El portagel se acomodó en la cámara de electroforesis (Labnet; Modelo E1015-15) y se llenó de Buffer TBE hasta la marca señalada en la misma. Después, sobre una tira de parafilm se colocó 2 μl de azul de bromofenol y 5 μl de muestra de ADN obtenido de la PCR. Para los marcadores moleculares se agregó 2 μl de azul de bromofenol y 3 μl de marcador molecular (600 pb), estos se ponen al principio y al final de las muestras. Una vez agregadas las muestras,

la cámara se conecta a una fuente de poder (Labnet; Modelo E0303) uniendo los polos (Rojo y negro) adecuadamente y se deja correr el gel a 90 Voltios durante 30 o 45 minutos. Trascurrido el tiempo, el gel se pone sobre un Transiluminador (UVP; M-20V) se conecta a la corriente y se enciende la luz UV para observar las bandas y la posible amplificación del gen 16s del ADN ribosomal en las muestras analizadas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. Etapa 1: Purificación e identificación macroscópica y microscópica de BAL para su conservación.

Las cepas de BAL previamente purificadas mostraron diferencias macroscópicas en los tamaños y formas de las colonias, entre otras características muy específicas. La variación de la morfología se debe a las diferentes fuentes de donde se extrajeron las muestras. En cambio, con la identificación microscópica se determinó si las bacterias pertenecen al grupo de las Gram (+), la cual es una característica principal y de gran importancia en las BAL, además, se observó la forma microscópica de la bacteria en particular.

Todas las cepas crecieron a 37°C en un periodo de 24 a 48 horas. La condición de anaerobiosis proporcionó un ambiente esencial para un mayor crecimiento. Sin embargo, la cepa X mostró su capacidad facultativa para crecer en medio aerobio y anaerobio.

Tabla 9. Morfología macroscópica de las BAL.

CEPAS	IMAGEN	DESCRIPCION
BAA		<p>Colonias medianas de forma circular, borde entero, superficie lisa, consistencia cremosa, elevación convexa, y color blanco con apariencia brillante.</p>
BS1		<p>Colonias muy pequeñas de forma circular, borde entero, superficie lisa, consistencia cremosa, elevación convexa, y color blanco con apariencia brillante.</p>
LC1		<p>Colonias pequeñas y agrupadas, forma circular, borde entero, superficie lisa, consistencia cremosa, elevación convexa, y color blanco con apariencia brillante.</p>
LC2		<p>Colonias pequeñas separadas y definidas, forma circular, borde entero, superficie lisa, consistencia cremosa, elevación convexa, y color blanco con apariencia brillante.</p>



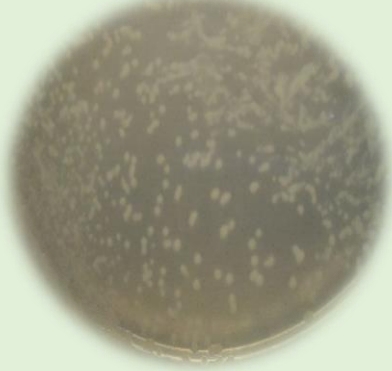

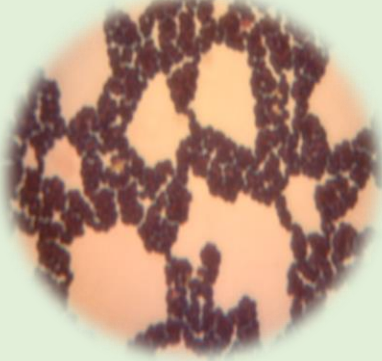

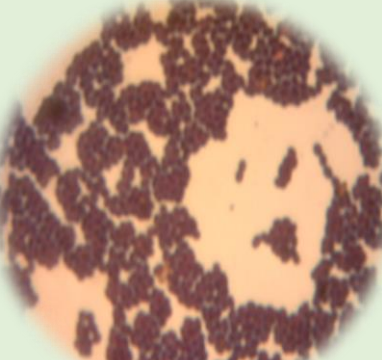
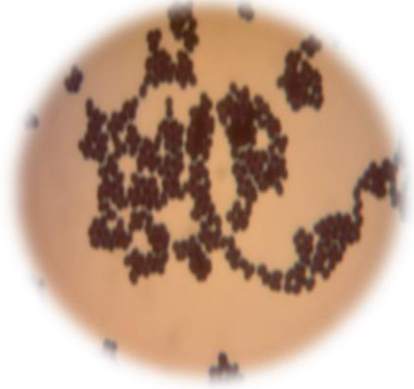
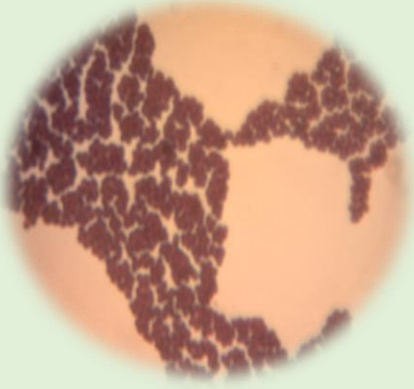


BD		Colonias grandes con forma circular, borde entero, superficie lisa, consistencia cremosa, elevación convexa, y color blanco con apariencia brillante.
BD2		Colonias grandes con forma circular, borde entero, superficie lisa, consistencia cremosa, elevación convexa, y color blanco con apariencia brillante.
XE		Colonias medianas y agrupadas, forma circular, borde entero, superficie lisa, consistencia cremosa, elevación convexa, y color blanco con apariencia brillante.
X		Colonias grandes y aisladas con forma circular, borde entero, superficie lisa, consistencia cremosa, elevación convexa, y color blanco con apariencia brillante.

Tabla 10. Morfología microscópica de las BAL.

CEPAS	IMAGEN	DESCRIPCION
BAA		Bacteria Gram positiva (color morado) con forma de cocos unidos en racimo.
BS1		Bacteria Gram positiva (color morado) con forma de cocos unidos en racimo y algunos unidos en cadena.
LC1		Bacteria Gram positiva (color morado) con forma de cocos unidos en racimo y en gran cantidad. Mayor número de células.

LC2		Bacteria Gram positiva (color morado) con forma de cocos unidos en racimo y en cadena.
DB		Bacteria Gram positiva (color morado) con forma de cocos unidos en racimo.
BD2		Bacteria Gram positiva (color morado) con forma de cocos unidos en racimo.
XE		Bacteria Gram positiva (color morado) con forma de cocos unidos en racimo y en cadena. Células en menor cantidad.



7.2. Etapa 2: Evaluación del efecto antimicrobiano de las bacteriocinas.

Las bacteriocinas producidas por las BAL presentan diferentes modos de acción. Por lo tanto, de los diferentes tratamientos a los que fueron sometidos los extractos, el más óptimo fue a 80°C durante 30 minutos, donde el efecto antimicrobiano se mostró más efectivo en cada una de las cepas. Los halos de inhibición fueron muy variados para cada bacteria patógena, algunos con mayor diámetro que otro (Anexo 3). El modelo lineal nos arrojó datos significativos (Tabla 10), dando lugar a la mejor cepa productora de bacteriocinas con mayor efecto antimicrobiano, enfocado mayormente sobre la bacteria *Salmonella typhi* siendo la de mayor interés en su inhibición.

Tabla 11. Comparación del efecto antimicrobiano de las bacteriocinas producidas, probadas con cepas de bacterias patógenas.

CEPAS	VALOR DE INHIBICION (cm)		
	<i>S. typhi</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Aureus</i>
BAA	0	19,8	0
BS1	0	15,45	22,05
LC1	51	19,8	43,75
LC2	56	17,55	43,75
BD	66,5	19,2	39,55
BD2	50	18,3	41,3
XE	0	17,55	35
X	66	16,8	37,45

En la figura 28 se puede observar que las bacteriocinas producidas por la cepas BD y X causaron mayor efecto de inhibición contra las bacterias patógenas probadas. Durante la fermentación estas dos cepas mostraron una eficiente producción de biomasa y por lo tanto se obtuvo una mayor producción de bacteriocinas.

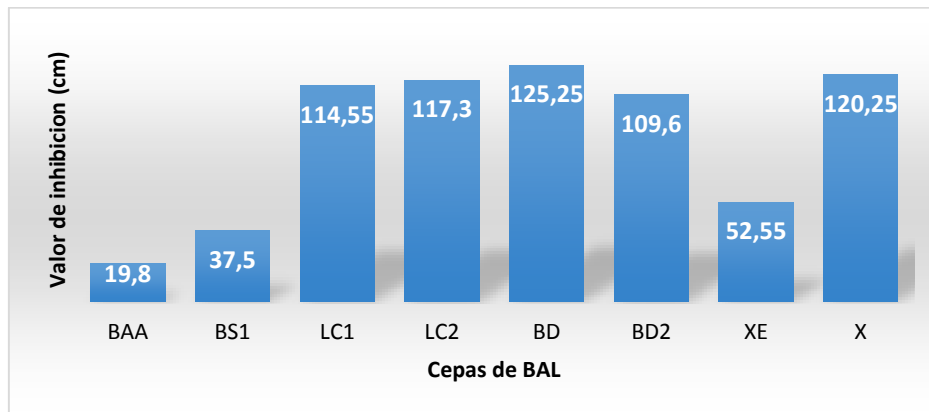


Figura 28. Efecto inhibitorio de las diferentes cepas de BAL.

7.3. Etapa 3. Cinética de crecimiento de BAL en jugo de aloe vera.

7.3.1. Producción de Biomasa

De la etapa anterior se tomaron las cepas X y BD por ser las mejores bacterias productoras de bacteriocinas con efecto antimicrobiano, y se realizó una fermentación en Jugo de aloe vera para evaluar la capacidad de adaptación de las mismas en un medio diferente al caldo MRS. Se determinó la producción de biomasa, el pH y los azúcares totales mediante un muestreo cada 4 horas en un periodo de 51 horas. La producción de biomasa se realizó por espectrofotometría.

En la figura 29 se puede observar que en la cepa X no se aprecia una fase de adaptación ya que la producción de biomasa es más rápida, los nutrientes se agotan y la curva decrece en menos tiempo. En cambio, la cepa BD se reproduce más lentamente por lo que se observa una excelente fase de adaptación en el medio, los nutrientes se mantienen un poco más y se requiere más tiempo para que la curva empiece a decrecer.

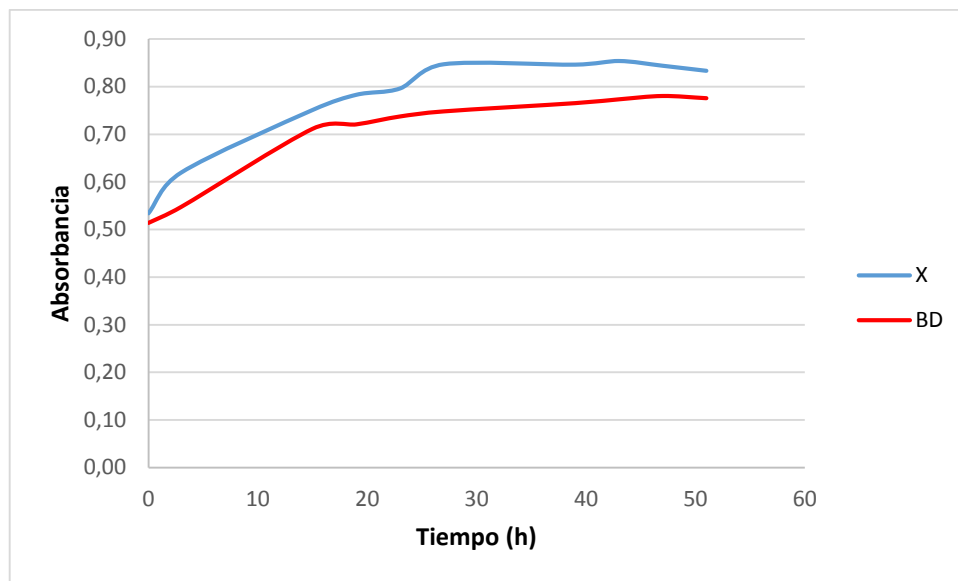


Figura 29. Curva de crecimiento de las cepas X y BD en Jugo de Aloe vera.

Cabe mencionar que la producción de biomasa de la cepa X empieza a decrecer a las 43 horas, mientras que en la cepa BD se presenta a las 51 horas. Por lo tanto, se demostró que la cepa BD encontró las mejores condiciones de adaptación en el jugo de aloe vera ya que su crecimiento fue muy eficiente.

7.3.2. pH

Una característica fisiológica de las BAL es su elevada tolerancia a los ácidos. Estas bacterias son ácidos tolerantes pudiendo crecer en medios muy ácidos o muy alcalinos, y la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5.

El cambio de pH durante la fermentación fue aumentando, y este ocurrió a partir de la inoculación de las cepas (X y BD). En la figura 30 se puede observar el comportamiento de pH en los dos medios de cultivo. Al inicio de la fermentación ambos medios tenían un pH de 4.3, este fue variando mientras transcurrían las horas, y al finalizar el monitoreo se obtuvo un pH de 5.1 en ambas cepas, es decir, las cepas de BAL analizadas se desarrollaron mejor en medios ligeramente ácidos.

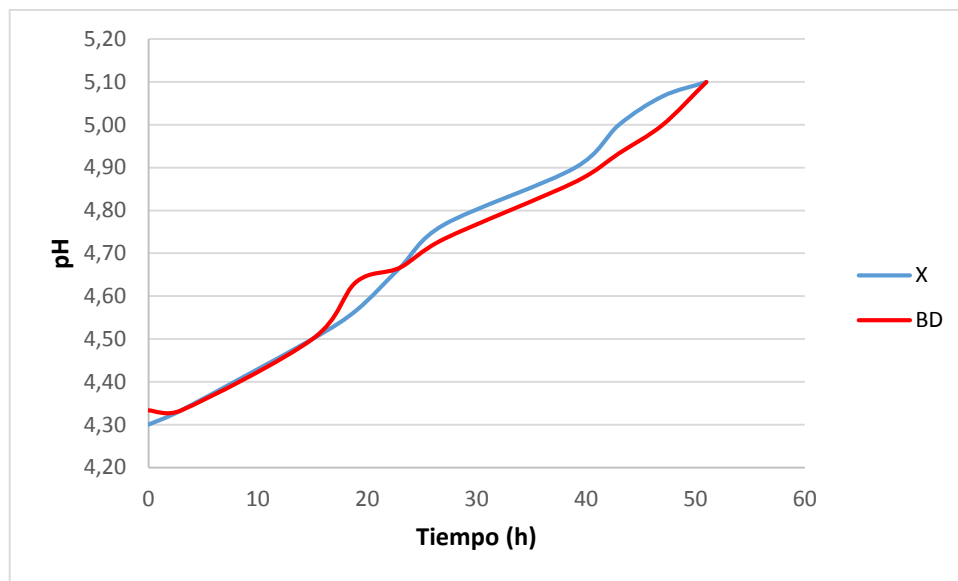


Figura 30. Cambios del pH en el Jugo de aloe vera durante la fermentación de BAL.

7.3.3. Azúcares Totales

Los carbohidratos o azúcares son la principal fuente de crecimiento para cualquier microorganismo, por lo tanto estos deben estar presentes en cualquier medio de cultivo.

En este proceso se utilizó jugo de aloe vera como medio de cultivo y se determinó el consumo de azúcares totales por las BAL. Para la determinación se llevó a cabo una fermentación donde se obtuvieron datos deseables.

En la figura 31 se observa como las BAL van consumiendo los azúcares presentes en el medio, y decrecen con mayor rapidez en la cepa X, a pesar de que esta cepa tiene una mayor cantidad de azúcares al inicio de la fermentación. Aquí se demuestra la importancia de estos nutrientes para el crecimiento de estas bacterias.

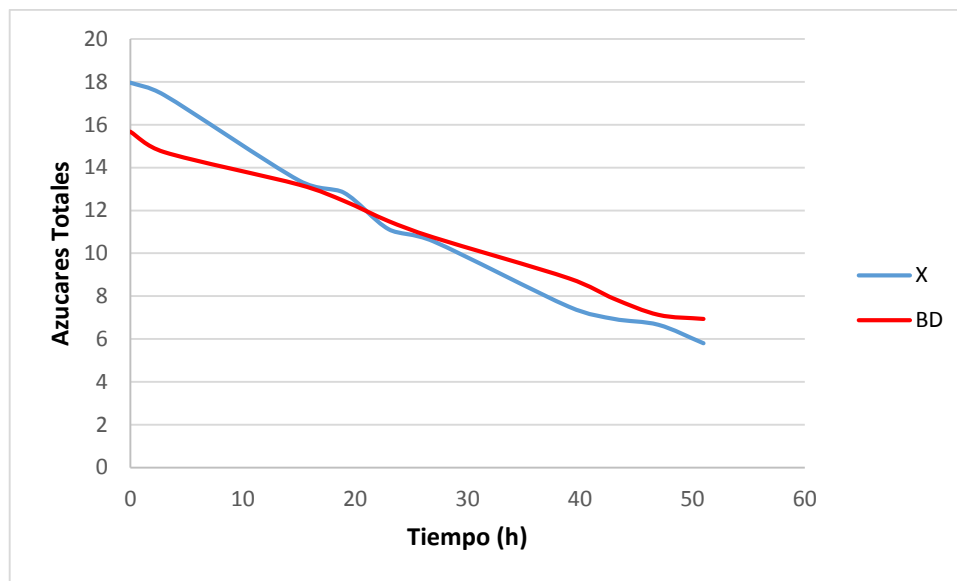


Figura 31. Consumo de Azucares totales por las BAL en el jugo de aloe vera.

Haciendo una comparación entre las figuras 29 y 31 se puede apreciar mejor el comportamiento de las BAL entre el crecimiento y su adaptación en el medio. A menor velocidad de crecimiento hay menor consumo de azucares y mayor capacidad de adaptación.

7.4. Etapa 4. Identificación molecular de las cepas de BAL.

7.4.1. Extracción y cuantificación del ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de cultivos recientes en placas Petri de agar MRS inoculadas con cepas previamente purificadas. El cultivo se incubó durante 72 horas para obtener una mayor producción de células. Las BAL son Gram positivas lo que las hace tener una pared celular muy gruesa, por esta razón se utilizaron reactivos salinos y temperaturas específicas para romper la capa de peptidoglicano y extraer una deseable cantidad de ADN. Otra forma muy efectiva para extraer ADN de bacterias Gram positivas es utilizando enzimas (lisozima y proteinasa-K), pero resulta muy costoso. El tiempo en el proceso de extracción depende de la cantidad de muestras a analizar.

La pastilla de ADN que se obtuvo se mezcló con 50 µl de buffer TE y se realizó la cuantificación por el método de espectrofotometría donde se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 12. Datos obtenidos en la cuantificación de ADN de las BAL.

Muestra	260.0 nm	280.0 nm	R	µg/ml	µg Totales
BAA	0.050	0.030	1.617	250.0	12.5
BS1	1.253	0.589	2.127	6,265.0	313.25
LC1	0.993	0.472	2.104	4,965.0	248.25
LC2	0.126	0.083	1.542	630.0	31.5
BD	0.136	0.096	1.417	680.0	34.0
X	0.075	0.055	1.576	375.0	18.75
XE	0.115	0.058	1.983	575.0	28.75
BD2	0.040	0.030	1.333	200.0	10.0

El valor de la absorbancia 260.0 nm representa los ácidos nucleicos presentes en la muestra, mientras que la absorbancia de 280.0 nm representa a las proteínas, aunque las proteínas no son deseables. Por lo tanto, el valor de la absorbancia 260.0 nm debe ser menor. Entre mayor sea el valor de R, mayor es la pureza de la muestra (ADN 100% puro tiene un valor R de 3).

7.4.2. Electroforesis de Calidad con gel de agarosa al 1%

Una banda muy barrida representa una degradación de ADN en las muestras, este aspecto no es muy deseable y lo conveniente es volver a repetir el proceso para obtener una mejor banda en el gel.

En la figura 32 se observa que los carriles de las muestras BS1, LC1 y XE presentan un suave barrido, este aspecto aun es aceptable para seguir con su posterior estudio, ya que no se ven completamente marcadas. Las bandas de las cepas LC2, BD, BD2 Y X, se llegan a observar con menor cantidad de ADN que las anteriores. En contraste, la muestra BAA no muestra ninguna banda.

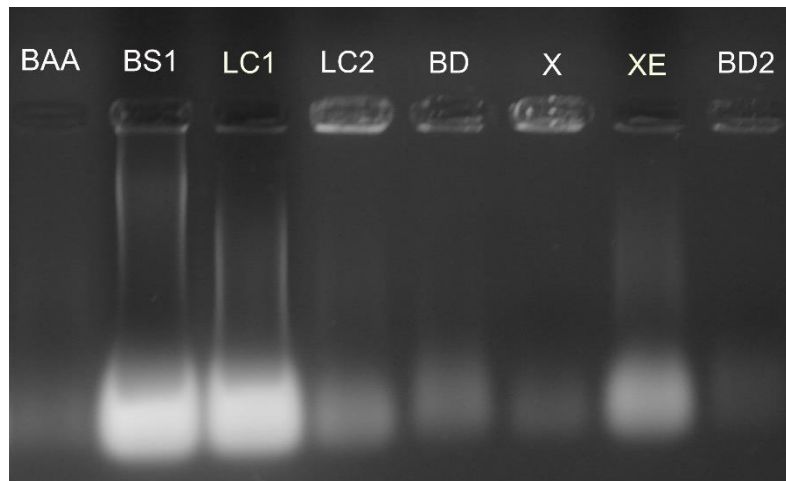


Figura 32. Electroforesis con gel de agarosa al 1% para verificar la calidad del ADN a través de las bandas marcadas. En la parte superior se observan los códigos de cada muestra.

7.4.3. Electroforesis de PCR con gel de agarosa al 3%

La electroforesis de calidad dio paso a la realización de la técnica de PCR para la amplificación del gen 16s del ADN ribosomal de las BAL. En este proceso se utilizaron primer específicos para la identificación del gen.

En la figura 33 se observa que no hubo amplificación para ninguna de las muestras en las diferentes temperaturas probadas, ya que no se alcanza a ver una banda bien definida.

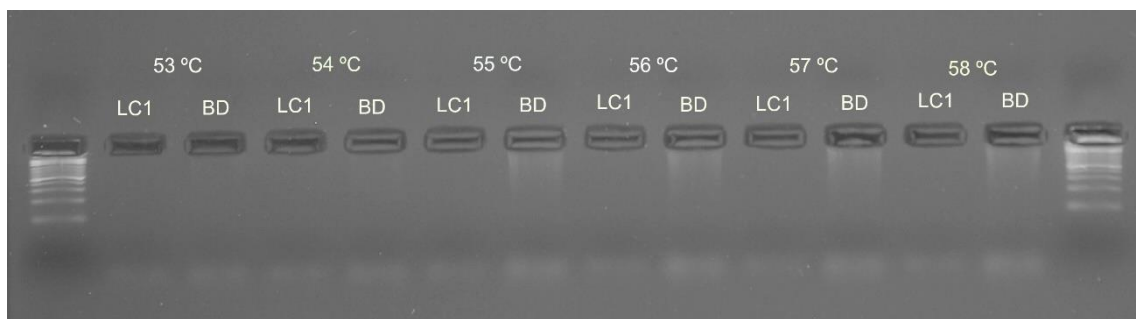


Figura 33. Electroforesis del producto obtenido de la PCR con gel de agarosa al 3%. Los marcadores moleculares se encuentran al inicio y al final de las muestras.

Estos resultados nos llevan a realizar un cambio en la secuencia de los primers para lograr la amplificación del gen 16s.

8. CONCLUSIONES

La morfología macroscópica de las de BAL varió principalmente en el tamaño de las colonias. Las características de color, forma, borde, consistencia, elevación y apariencia fueron similar en todas las colonias obtenidas. Mediante la tinción de Gram se aseguró la pureza de los cultivos y se observó la morfología microscópica de las BAL. Todas las cepas resultaron tener forma cocoide y pertenecían a las Gram positivas, siendo esta una característica que las identifica.

Las bacteriocinas obtenidas de la fermentación en caldo MRS mostraron una mayor actividad antimicrobiana sometida a un tratamiento de 80°C durante 30 minutos, es decir, su estructura es muy resistente a altas temperaturas y no alcanza a provocar su desnaturalización, por lo que siguen llevando a cabo su función antimicrobiana. El método de difusión en disco, resultó una técnica muy apropiada para determinar este factor.

En la evaluación antimicrobiana la *Salmonella typhi* se tomó como la de mayor importancia en su inhibición, seguido del *S. aureus* y *E. coli*. Por lo tanto, las bacteriocinas producidas por la cepa BD y X tienen mayor efecto antimicrobiano con las tres bacterias patógenas analizadas y muy específicamente contra *Salmonella typhi*. Esto las identifica como las dos mejores cepas productoras de bacteriocinas con efecto antimicrobiano.

De los parámetros analizados en la cinética de crecimiento, la cepa BD mostró mejor adaptación en el sustrato. El consumo de azúcares de esta bacteria es muy lento, esto le permite tener una mejor fase de adaptación y una excelente producción de biomasa en comparación con la cepa X.

Los primers utilizados para la identificación molecular de las BAL no lograron amplificar el gen 16s del ADN ribosomal, por lo que se recomienda cambiar la secuencia de los primers a utilizar.

9. BIBLIOGRAFIA

Abee, T. (2005). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 169-185.

Agudelo Londoño N. (2013). Tesis de licenciatura. Estado del arte de la obtención de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. Universidad Pontificia Bolivariana, Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Pág. 45.

Beristain Bauza, S. C., Palou E. y López Malo, A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. Universidad de las Américas Puebla. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos 6-2(2012)*: 64-78.

Castro Albornoz, G. y Valbuena Colmenares, E. (2009). Biopreservación: alternativa para mejorar la calidad de los quesos. Venezuela.

Cotter P. D., Hill C. y Roos R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 3(10): 777-778.

Evelyn Rodríguez C., María del Mar Gamboa C., Francisco Hernández C., Jorge Danilo G. H. (2005). *Bacteriología General: Principios y prácticas de laboratorio*. Editorial Universidad de Costa Rica, Pág. 339.

John L. I., Catherine A. I. (1998). *Introducción a la Microbiología*. Editorial Reverte, S.A., Vol. II. Barcelona, Pág. 559 y 566.

Katusic A. M. (2002). Capacidad antagonista frente a *Listeria Monocytogenes* de dos sustancias tipo bacteriocina utilizadas en combinación con NaCl y CO₂. Universidad Austral de Chile.

Maddalena Querci, Marco Jermini y Guy Van E. (2007). Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Luxemburgo: Oficina de publicaciones oficiales de las comunidades Europeas. Pág. 2-12.

Martínez Fernández, B. (1996). Bacteriocinas de Lactococcus Lactis Aislados de quesos Asturianos: Nisina Z y Lactococina 972. Oviedo, España. Universidad de Oviedo.

McAuliffe O., Ross R. P. y Hill C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS Microbiology Reviews. 25(3): 285-308.

Milena Vázquez, M. S., Suarez M. H. y Zapata B. S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Revista Chilena de Nutrición. Vol. 36, Nº 1. Pág. 64-71.

Olivera Jorge (2011). Tesis de Licenciatura. Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche. Universidad de la Republica, Facultad de Agronomía. Pág. 1-3, 11.

Pascual Anderson, M. R., Calderón V. y Pascual. (2000). MICROBIOLOGIA ALIMENTARIA: METODOLOGIA ANALITICA PARA ALIMENTOS Y BEBIDAS. Editorial Díaz de Santos, España. Segunda Ed. Pág. 21.

Ramírez Ramírez, J. C., Rosas Ulloa, P., Velázquez González, M. Y., Ulloa J, A. y Arce Romero, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en los alimentos y sus efectos en la salud. Universidad Autónoma de Nayarit, Centro de Tecnología de Alimentos. Pág. 1-6.

Roger Y. Stanier, Jonh L. Ingraham, Mark L. Wheelis, Page R. Painter. (1992). MICROBIOLOGIA. Segunda edición. Editorial Reverte, S.A. Pág. 531-536.

Rojas C. y Vargas P. (2008). Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. Tecnología en marcha, Vol. 21-2. Pág. 9-16.

Santambrosio E., Ortega M. y Garibaldi P. (2009). “Tinción y observación de Microorganismos”. Universidad Tecnológica Nacional. Pág. 2 y 3.

Suarez Ramírez V., Cueto Vigil, M. y Gomez Yenny. (2007). Tesis licenciatura. Caracterización molecular de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. Universidad de la Sabana, Facultad de Ingeniería, Bogotá. Pág. 13-16.

Vázquez Manuel (2001). Avances en seguridad alimentaria. Editorial Altaga. Pág. 239-250.

Wagner Luiz Moreira Dos Santos. (1993). AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION PARCIAL DE UNA BACTERIOCINA PRODUCIDA POR *Pediococcus* sp. 347, DE ORIGEN CARNICO. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria. España. Pág. 2-9.

Yin L., Wu C. y Jiang S. (2004). Purificación and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentasaceus* ACCEL. Journal of agricultura and food chemistry, 52(5), 1146-1151.

10. ANEXOS

ANEXO 1: TINCION DE GRAM

Esta tinción se denominada así por el bacteriólogo danés Christian Gram, quien la desarrolló en 1844. Sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos, grampositivas y gramnegativas (en este caso, los términos positivo y negativo no tiene nada que ver con carga eléctrica, sino simplemente designan dos grupos morfológicos distintos de bacterias). Descripta en forma breve, la secuencia de la tinción es la siguiente: el Frotis fijado con calor se tiñe 1 min con Violeta Cristal, se lava con agua, se cubre con solución Yodada durante 1 - 2 min y se lava de nuevo con agua, decolorar con mezcla alcohol etílico/acetona. Escurrir y cubrir con Safranina (color de contraste) durante 1 – 2 min. Lavar y secar. Las bacterias gram-positivas y gram-negativas tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares. (Santambrosio E., *et al.* 2009).

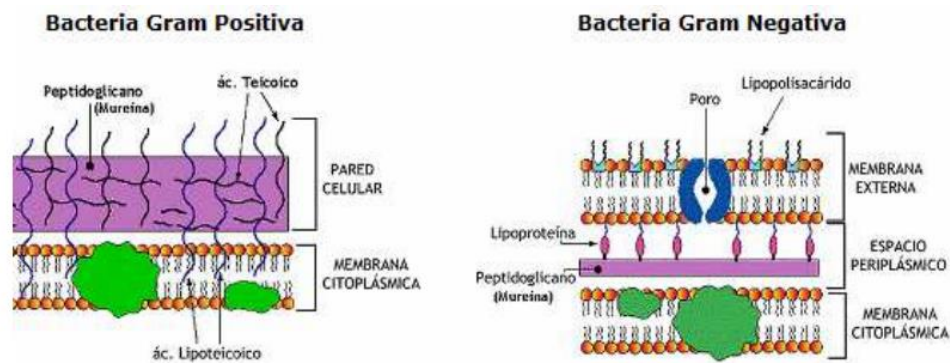


Figura 34. Efecto de la tinción de Gram en la pared celular de Bacterias.

ANEXO 2: CURVA PATRON

Tabla 13. Mezclas de reacción para la elaboración de la curva patrón para la determinación de azúcares totales. Método de *Dubois* 1956.

Tubos	Agua destilada (µL)	Volumen patrón Dextrosa (µL)	Fenol 80% (µL)	H ₂ SO ₄ (µL)
1	210	0	200	1000
2	205	5	200	1000
3	200	10	200	1000
4	195	15	200	1000
5	190	20	200	1000
6	185	25	200	1000
7	180	30	200	1000
8	175	35	200	1000
9	170	40	200	1000

Tabla 14. Absorbancias obtenidas en la mezcla de reacción.

TUBOS	Abs 1	Abs 2	Abs 3	PROMEDIO
1	0,432	0,428	0,424	0,43
2	0,505	0,485	0,484	0,49
3	0,53	0,518	0,513	0,52
4	0,593	0,585	0,587	0,59
5	0,643	0,64	0,639	0,64
6	0,684	0,687	0,674	0,68
7	0,765	0,742	0,737	0,75
8	0,794	0,788	0,787	0,79
9	0,857	0,855	0,858	0,86

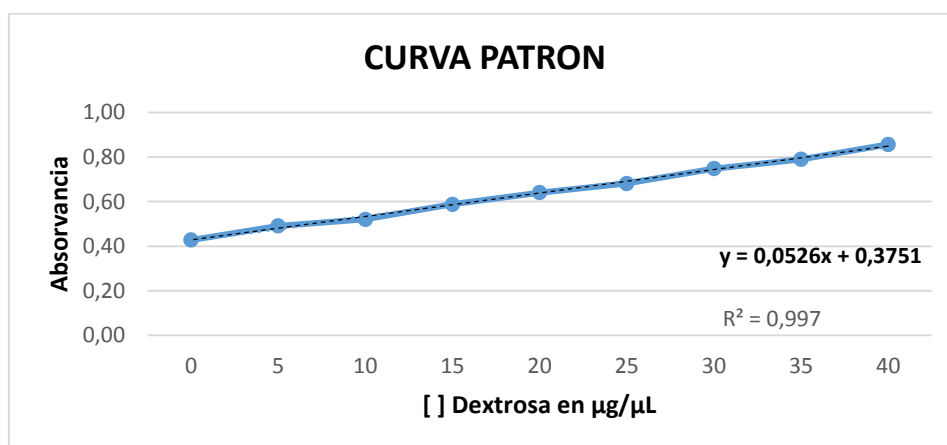


Figura 35. Curva patrón para la determinación de azúcares totales en la fermentación de BAL.

ANEXO 3. DIAMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICION

Tabla 15. Halos de inhibición con el tratamiento sometido a 80°C durante 30 minutos.

CEPAS	REP.	SALMONELLA			ESCHERICHIA COLI			STAPHYLOCOCCUS AUREUS		
		Diám. 1 (cm)	Diám. 2 (cm)	PROM. (cm)	Diám. 1 (cm)	Diám. 2 (cm)	PROM. (cm)	Diám. 1 (cm)	Diám. 2 (cm)	PROM. (cm)
BAA	R1	0	0	0	1,4	1,3	1,35	0	0	0
	R2	0	0	0	1,5	1,3	1,4	0	0	0
	R3	0	0	0	1,2	1,2	1,2	0	0	0
LC1	R1	1	1,1	1,05	1,3	1,4	1,35	1,3	1,2	1,25
	R2	1,1	1,1	1,1	1,3	1,3	1,3	1,4	1,3	1,35
	R3	0,9	0,9	0,9	1,3	1,3	1,3	1,2	1,1	1,15
LC2	R1	1	1	1	1,4	1,3	1,35	1,4	1,2	1,3
	R2	0,9	0,9	0,9	1,1	1	1,05	1,3	1,2	1,25
	R3	1,4	1,5	1,45	1,1	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2
BS1	R1	0	0	0	1	1	1	0,9	0,9	0,9
	R2	0	0	0	1,1	1,1	1,1	1	1	1
	R3	0	0	0	1	1	1	0	0	0
BD2	R1	1	1	1	1,3	1,2	1,25	1,2	1	1,1
	R2	1	1	1	1,4	1,4	1,4	1,2	1,1	1,15
	R3	1	1	1	1	1	1	1,3	1,3	1,3
BD	R1	1,3	1,2	1,25	1,4	1,3	1,35	1	1	1
	R2	1,4	1,2	1,3	1,3	1,3	1,3	1,1	1,1	1,1
	R3	1,4	1,5	1,45	1,2	1,2	1,2	1,3	1,3	1,3
XE	R1	0	0	0	1,2	1,2	1,2	1	1	1
	R2	0	0	0	1,1	1,1	1,1	1	1	1
	R3	0	0	0	1,3	1,1	1,2	1	1	1
X	R1	1,1	1,2	1,15	1,2	1,2	1,2	1,1	1,1	1,1
	R2	1,4	1,3	1,35	1,1	1,2	1,15	1,2	1,2	1,2
	R3	1,4	1,5	1,45	1	1	1	0,9	0,9	0,9

ANEXO 4: TRABAJO REALIZADO



PRODUCTION OF BACTERIOCINS FROM DIFFERENT LACTIC ACID BACTERIA FOR ANTIMICROBIAL EVALUATION EFFECT ON PATHOGENIC BACTERIA.

¹Carrera-Vega M.A., ²Cruz-Hernández M.A., ³Belmares-Cerda R.E., ⁴Robledo-Olivo A., ⁵González-Morales S.

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Calzada Antonio Narro #1923 Colonia Buenavista, C.P. 25315 Saltillo, Coahuila, México.

²Departamento de Investigación en Alimentos, Universidad Autónoma de Coahuila, Blvd. Venustiano Carranza e Ing. José Cárdenas A.P. 955, C.P. 25280, Saltillo, Coahuila, México.

³Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Horticultura, Calzada Antonio Narro #1923 Colonia Buenavista, C.P. 25315 Saltillo, Coahuila, México.

⁴mary_angel205@hotmail.com, ⁵nyke13_80@hotmail.com

INTRODUCTION

At present it has implemented the search for how to avoid the use of chemical preservatives. The use of additives with antimicrobial properties has been the most widely accepted way to prolong the safety and quality of food in a natural way. In addition, are not only interesting in the food industry by induce the development of structural and organoleptic characteristics desirable in the food, but also by inhibiting in them the development of harmful micro-organisms, perception and pathogens; therefore it was thought in the possibility of using them to extend the life of the food and improve their hygienic quality. (Wagner Luiz Moreira, 1993).

The bacteriocins are heterogeneous antimicrobial peptides, with different levels and spectra of activity, mechanisms of action, molecular weight and physico-chemical properties. These can be synthesized by Gram-positive and Gram-negative bacteria; however, those produced by the BAL have been of great interest in the food industry. (S.C. Beristain-Bauza y col., 2012).

This project aims at evaluating the production of bacteriocins and the antimicrobial effect of the same from eight strains of lactic acid bacteria (LAB) previously purified, which were isolated from different regional samples, such as: breast milk, goat milk and cow's milk. Also, determine the macroscopic and microscopic characteristics of each strain.

OBJECTIVE

purify and identify the macroscopic and microscopic morphology of lactic acid bacteria, and evaluate their production of bacteriocins with inhibitory potential strains of pathogenic bacteria

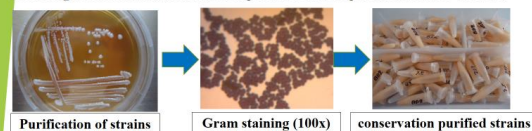
METHODOLOGY

The research was conducted in the facilities of the laboratory of Microbiology and fermentation of the Department of Food Science and Technology of the UAAAN. Were allocated eight strains of lactic acid bacteria isolated from different samples of milks in the region, each marked with their respective key (Table 1).

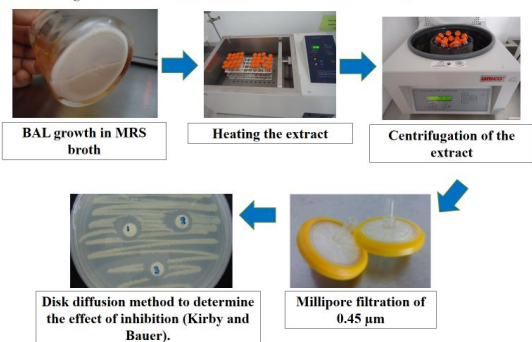
Table 1: BAL isolated strains.

Samples of BAL	Source
BAA	Breast Milk
BS1	Breast Milk
LC1	Goat milk
LC2	Goat milk
BD	Breast Milk
BD2	Breast Milk
XE	Cow's milk
X	Cow's milk

First stage: Purification, and macroscopic and microscopic identification of BAL.



Second stage: Evaluation of the antimicrobial effect of the bacteriocins.



RESULTS AND DISCUSSION

• Macroscopic and microscopic identification.

Microscopic identification shows the differences between the sizes and other physical characteristics of the colonies of each strain. In contrast, in the microscopic identification is determined if the bacteria belong to the group of the Gram (+) or (-), in addition to observing the form of the bacterium in particular (Table 2).

Table 2. Characteristics of BAL.

Strains	Macroscopic Morphology (colonies)				Microscopic Morphology (Bacteria)	
	Form	Size	Texture	Color	Classification	Form
BAA	Round	Medium	Smooth, creamy	White, bright	Gram (+)	Coconuts
BS1	Round	Small	Smooth, creamy	White, bright	Gram (+)	Coconuts
LC1	Round	Small	Smooth, creamy	White, bright	Gram (+)	Coconuts
LC2	Round	Small	Smooth, creamy	White, bright	Gram (+)	Coconuts
BD	Round	Large	Smooth, creamy	White, bright	Gram (+)	Coconuts
BD2	Round	Large	Smooth, creamy	White, bright	Gram (+)	Coconuts
XE	Round	Medium	Smooth, creamy	White, bright	Gram (+)	Coconuts
X	Round	Large	Smooth, creamy	White, bright	Gram (+)	Coconuts

• Antimicrobial effect of the bacteriocins.

The different treatments analyzed the most optimal was 80 °C for 30 minutes, where the antimicrobial effect was found to be more effective.

Table 3. Comparison of the antimicrobial effect of the bacteriocins produced, tested with strains of pathogenic bacteria.

Strains	VALUE OF INHIBITION (cm)		
	S. Typhi	E. Coli	S. Aureus
BAA	0	19.8	0
BS1	0	15.45	22.05
LC1	51	19.8	43.75
LC2	56	17.55	43.75
BD	66.5	19.2	39.55
BD2	50	18.3	41.3
XE	0	17.55	35
X	66	16.8	37.45

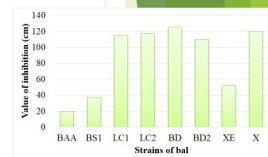


Figure 1. Inhibitory effect of the different strains of BAL.

Figure 2. Inhibition halos caused by bacteriocins.



CONCLUSIONS

- ✓ With the Gram stain was instrumental in ensuring that the isolates belonged to the Gram (+), because by nature all BAL should have this feature.
- ✓ Most of the bacteriocins obtained showed a better activity to a temperature of 80 °C, i.e. its structure is very resistant to high temperatures and does not reach to cause its denaturing.
- ✓ Salmonella Typhi was taken as the most important of its inhibition, followed by the S. Aureus and E. Coli. Therefore, it can be seen in the attached table, that the bacteriocin produced by strains BD have greater antimicrobial effect in comparison with the other strains, since better inhibited the growth of the three pathogens, and very specifically to Salmonella typhi.

REFERENCES

- Evelyn Rodríguez C., María del Mar Gamboa C., Francisco Hernández C., Jorge Danilo G. H.; General Bacteriology: principles and practices of laboratory. Editorial University of Costa Rica, 2005. Pages 63-65.
- José Carmen Ramírez R., Petra Roses Ulloa, Martha Yanira Velazquez G., Jose Armando Ulloa, Francisco Arce Romero. Lactic Acid Bacteria: Importance in the food and its effects on health. Revista Source Year 2, No. April 7 - June 2011
- S. C. Beristain-Bauza, E. Palou and A. Lopez-Malo. Bacteriocins: natural antimicrobials and its application in the food. /Selected issues of food engineering at 6-2 (2012): 64-78.
- Wagner Luiz Moreira Dos Santos. ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A BACTERIUM PRODUCED BY *Pedococcus* sp.347, MEAT SOURCE. Madrid, November 1993.

Figura 36. Cartel expuesto en el congreso de la Asociación Mexicana de la Ciencia de los Alimentos (AMECA).