



## Artículo

# Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de Lactobacilos y Bifidobacterias

Evaluation of bacteriocins production from *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*

Diana **Jaramillo Giraldo**<sup>1\*</sup>, Adelina del Pilar **Meléndez**<sup>2</sup>, Oscar Fernando **Sánchez Medina**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Los Andes, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química.

Carrera 1 Este, N° 19A-40, Edificio Mario Laserna, Bogotá D. C., Colombia.

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia.

Carrera 45, N° 26-85, Edificio Uriel Gutiérrez, Bogotá D. C., Colombia.

\*Autora para correspondencia: dianajaramillo86@gmail.com

Aceptado 24-Diciembre-2010

## Resumen

El objetivo de este estudio fue utilizar un grupo de bacterias ácido lácticas aisladas de ensilaje para encontrar, entre ellas, aquella (s) que produzca (n) bacteriocinas con actividad antimicrobiana eficiente frente a microorganismos Gram (+) como *Bacillus sphaericus* y *Bacillus cereus* y Gram (-) como *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*. Para esto se identificaron las bacterias potenciales y se cultivaron en medios de cultivo enriquecido con fructooligosacáridos para obtener la sustancia antimicrobiana. Se evaluó su actividad antimicrobiana mediante técnicas de difusión en gel y mediante curvas de crecimiento en medio líquido. Las bacterias estudiadas se caracterizaron como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus helveticus* y una cepa comercial de *Bifidobacterium infantis* utilizando pruebas bioquímicas y los sistemas multiprueba API® 50CH y API® 20A. Se encontró que la adición de fructooligosacáridos a la producción de bacteriocinas aumentó la potencia de la sustancia producida al igual que la velocidad de crecimiento en la fase exponencial del microorganismo. La actividad antimicrobiana fue muy prometedora principalmente contra las pseudomonas y esta sustancia puede ser utilizada como posible conservante de alimentos.

**Palabras claves:** actividad antimicrobiana, bacterias ácido lácticas, fructooligosacáridos, producción de bacteriocinas.

### Abstract

The aim of this study was to use a group of lactic acid bacteria isolated from silage isolation to find those which produce bacteriocins with effective antimicrobial activity against Gram (+) bacteria like *Bacillus sphaericus* and *Bacillus cereus* and Gram (-) bacteria like *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. For this, the bacteria were identified and cultivated in their growing media enriched with fructooligosaccharides to produce the antimicrobial substance. These were subsequently characterized and its antimicrobial activity was evaluated using gel diffusion and by growth curves in liquid medium. The bacteria were characterized as *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium infantis* using biochemical tests and the API® 50CH and API® 20A systems. It was found that the addition of fructooligosaccharides to the production of bacteriocins increases the potency of the substance as well as the growth rate in the exponential phase of the microorganism. The antimicrobial activity was very promising mainly against pseudomonas and could be used as a conservation method for food.

**Key words:** antimicrobial activity, bacteriocins production, fructooligosaccharides, lactic acid bacteria.

## INTRODUCCIÓN

Desde hace varios años en países de Europa y en Estados Unidos está prohibida la producción de alimentos que contengan antibióticos debido a que en el consumidor final puede generarse resistencia a esos antibióticos y estaría más propenso a enfermedades bacterianas. Adicionalmente, la utilización de antibióticos destruye no solo las bacterias perjudiciales sino también las bacterias que forman parte de la microflora normal y que intervienen en el proceso de digestión de los alimentos, además de proteger al organismo contra infecciones futuras (Muñoz-Rojas, 2004). Por estas razones, es necesario encontrar sustancias que cumplan con la función antibiótica pero que no afecten las funciones regulares del organismo.

Estudios realizados con bacterias lácticas han demostrado que producen sustancias con actividad antimicrobiana denominadas bacteriocinas, y son empleadas en

la industria alimenticia para neutralizar agentes contaminantes de alimentos, potencialmente patógenos para el hombre, sin modificar las propiedades del alimento (Cleveland *et al.*, 2001).

Las bacteriocinas, son derivados del metabolismo principalmente de algunas bacterias ácido lácticas (BAL), con función antimicrobiana, de naturaleza peptídica, sintetizadas ribosomalmente y que afectan a bacterias relacionadas con las que las producen (de la Fuente-Salcido *et al.*, 2008). Se ha comprobado que pueden actuar sobre bacterias patógenas, especialmente en Gram positivas y en algunas Gram negativas (Cleveland *et al.*, 2001). Las bacteriocinas han sido encontradas en casi todas las especies bacterianas ácido lácticas examinadas hasta la fecha, y aún dentro de una especie podrían ser producidas diferentes tipos de bacteriocinas (Muñoz-Rojas, 2004). La producción de bacteriocinas genera una ventaja importante para el productor ya que si esta se encuentra en cantidades suficientes,

puede inhibir y hasta causar la muerte a bacterias que compiten por la misma fuente de nutrientes, resultando de gran utilidad en la industria alimentaria.

Dentro de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas se pueden distinguir 2 grandes grupos a este respecto: i) aquellas que son activas frente a cepas o especies relacionadas (lactococinas A, B, M y G, lactacina B y helveticina J, entre otras) y ii) las que inhiben a un grupo mucho más amplio de microorganismos, entre los que se incluyen patógenos y alterantes de alimentos Gram positivos (nisina, pediocinas y lactacina F, entre otras) (Klaenhammer, 1988). Dentro de este último grupo, la nisina A, producida por *Lactococcus lactis*, fue el primer antibiótico conocido (Gross y Morell, 1971), producida comercialmente bajo el nombre Nisaplin™. La pediocina PA-1 es comercialmente producida por *Pediococcus acidilactici* bajo el nombre ALTATM 2431 (Deegan *et al.*, 2006).

Los procesos de separación y purificación dependen del medio utilizado para la producción, y del microorganismo utilizado. La estabilidad de las bacteriocinas disminuye a medida que aumenta su purificación. Así, la adición de sero-albúmina bovina protege de la pérdida excesiva de actividad experimentada por algunas bacteriocinas durante su purificación (Dos Santos-Moreira, 1993).

En general, el modo de acción de una sustancia inhibitoria frente a alguna célula puede ser de tres tipos; bacteriolítico, bacteriostático o bacteriocida. El primero implica la muerte celular seguida de lisis, representado por la disminución de la Absorbancia. El segundo no produce muerte celular pero detiene el crecimiento, por lo cual, sin muerte celular el conteo de colonias y la Absorbancia se mantienen constantes. Y finalmente el bacteriocida produce muerte celular que se manifiesta por la disminución de colonias pero sin lisis y por consiguiente la Absorbancia se mantiene constante (Núñez *et al.*, 2002).

El mecanismo de acción propuesto para

las bacteriocinas es una unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga neta positiva localizada fundamentalmente en uno de los extremos. Luego se produce la inserción de la bacteriocina en la bicapa lipídica, en el caso de la nisina esta inserción se realiza por su extremo N-terminal. Así se forman poros en la membrana, la cual queda permeabilizada, la célula empieza a perder iones y metabolitos fundamentales para su supervivencia y eventualmente se produce la muerte de la bacteria (Ruiz-Larrea *et al.*, 2007).

Las bacteriocinas son producidas por organismos probióticos. Estos microorganismos estimulan la funcionalidad protectora del sistema digestivo. Los estudios más recientes ponen de manifiesto que el uso de probióticos ayuda a prevenir y curar muchas enfermedades gastrointestinales, como las diarreas infecciosas y determinados cánceres de ciego y recto (Deegan *et al.*, 2006; Quiles-Sotillo y Hevia-Méndez, 2006). Los probióticos más empleados son las bacterias capaces de producir ácido láctico, como *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. reuterii*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. animalis*, *Streptococcus salivarius* subespecie *thermophilus* y *Saccharomyces boulardii* (Sierra-Salinas, 2007). Los lactobacilos son bacterias Gram positivas, anaeróbicas o aeróbicas facultativas, que aparecen en grandes cantidades en la mayor parte del tracto gastrointestinal. Se ubican generalmente en lugares donde hay gran variedad de sustancias ricas en carbohidratos disponibles (Ortiz, 2007). Su utilización como probióticos viene dada, por su influencia sobre la microflora intestinal y su antagonismo con las bacterias patógenas (Hartemink *et al.*, 1997). Entre tanto las bifidobacterias son bacterias anaeróbicas Gram positivas, que habitan principalmente en el intestino delgado, habitantes normales del tracto gastrointestinal tanto del hombre, como de los animales. Son bacilos o cocos no móviles,

anaerobios estrictos, con formas que dependen de la especie a la que pertenezcan. Representan uno de los mayores grupos de bacterias intestinales y se utilizan principalmente como flora probiótica en productos lácteos (Hartemink *et al.*, 1997).

Diferentes estudios han demostrado que el empleo de prebióticos favorece el crecimiento de la población probiótica en el tracto digestivo. Los prebióticos son ingredientes principalmente de origen vegetal como el trigo, cebolla, ajo, durazno, entre otros. Estos no son digeribles y producen efectos beneficiosos estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon. Son fundamentalmente fructooligosacáridos (FOS) y galactooligosacáridos (GOS), como la inulina y la oligofruktosa, clasificadas como fibra dietética. La mayoría de los prebióticos son de bajo peso molecular exceptuando la inulina, esto es de suponerse debido a que entre mayor tamaño tenga el oligosacárido, menor será la fermentación y la adsorción del prebiótico en el colon (Manning y Gibson, 2004).

Teniendo en cuenta su potencial de bioconservantes o preservativos naturales, específicos en productos lácteos fermentados o en otros alimentos, se evaluó la producción de bacteriocinas de un grupo seleccionado de bacterias ácido-lácticas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Se caracterizaron los microorganismos seleccionados mediante pruebas bioquímicas y se indujo la producción de bacteriocinas evaluando su actividad. Igualmente se determinó el efecto de la fuente de carbono (glucosa o FOS) en la producción de estas sustancias antimicrobianas y la potencia de estas frente a microorganismos Gram (+) y Gram (-).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Activación, caracterización e identificación de microorganismos

Las cepas de *Lactobacillus*, aislados

nativos de ensilaje y *Bifidobacterium*, cultivo comercial, fueron donadas por el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Los aislados fueron identificados como *Lactobacillus* sp. L1, *L.* sp. L2, *L.* sp. L3, *L.* sp. L4 y *Bifidobacterium* sp. B1.

Las cepas se activaron en leche descremada preparada al 12 % de sólidos a 37 °C. El segundo repique se realizó al 1 % del cultivo del primer repique y se incubó a 45 °C a fin de favorecer el crecimiento del *Lactobacillus* y no de otro tipo de microorganismo. Se realizaron cultivos en agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) para *Lactobacilli* y se incubaron en cámara de anaerobiosis (Oxoid Ltd, United Kingdom) con el fin de aislar y purificar las bacterias. Se variaron las condiciones de incubación como temperatura y anaerobiosis para favorecer el crecimiento únicamente de lactobacilos y bifidobacterias.

Para la identificación de cada cepa se realizaron pruebas morfológicas (tinción de Gram, forma bacteriana, movilidad) fisiológicas (crecimiento a 15, 37 y 45 °C, tolerancia al NaCl (7 y 10 %) y a pH ácido (3,9)) y bioquímicas (catalasa, Voges-Proskauer y oxidación-fermentación de glucosa). Finalmente se corroboraron los resultados utilizando el sistema multiprueba API® 50 CHL (bioMérieux, Francia) para *L.* sp. L1 y API® 20A (bioMérieux, Francia) para *L.* sp. L2, *L.* sp. L3 y *B.* sp. B1.

### Producción de bacteriocinas

Previamente a la producción de las bacteriocinas se realizaron las curvas de crecimiento en función de la Absorbancia para cada uno de los lactobacilos y bifidobacterias con los que se trabajó. Para las bacterias lácticas las curvas se realizaron tanto en anaerobiosis como en aerobiosis ya que estas bacterias son anaerobias facultativas pero se concluyó que su crecimiento se veía favorecido por la anaerobiosis, así que todos los procedimientos siguientes se realizaron de esta manera en un equipo como el que se presenta en la Fig. 1.



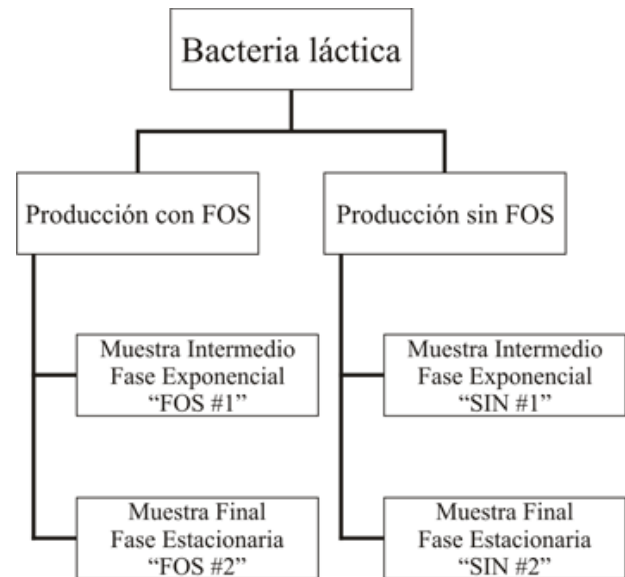
**Figura 1.-** Matraz Erlenmeyer para anaerobiosis.

La producción de las bacteriocinas se realizó en caldo MRS inoculado con 5 mL del respectivo microorganismo de Absorbancia aproximadamente de 1,0 (Ortiz, 2007). Para evaluar el efecto de la presencia de prebióticos en la producción de bacteriocinas, el medio se enriqueció con FOS en un 1,2 % p/v.

De igual forma se evaluó el efecto de la etapa de crecimiento del microorganismo sobre la producción de la bacteriocinas, para lo cual se fijaron como puntos de obtención del extracto crudo enzimático un punto intermedio de la fase exponencial y la etapa final de la fase estacionaria (Fig. 2). En todos los casos el cultivo se llevó a cabo en medio MRS a 37 °C, 150 rpm y pH 6,4 ± 0,2.

#### **Tratamiento del extracto crudo enzimático**

A partir de los cultivos realizados se llevó a cabo la centrifugación y filtración por membrana de 0,22 µm de cada uno de los cultivos probióticos, para extraer las sustancias bactericidas y realizar pruebas de actividad.



**Figura 2.-** Muestras de bacteriocina por cada BAL.

#### **Evaluación de la actividad antimicrobiana**

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó sobre microorganismos Gram (+), *Bacillus cereus* y *Bacillus sphaericus* y Gram (-), *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*. Estos microorganismos se caracterizaron mediante curva de crecimiento. Para evaluar la actividad antimicrobiana se realizaron dos tipos de pruebas diferentes, una prueba de crecimiento en medio líquido y la prueba de difusión en gel que es en medio sólido.

La prueba de actividad en medio líquido se realizó para cada microorganismo con cada una de las muestras de bacteriocinas producidas (16 muestras) además de dos muestras de nisina a 200 ppm y 500 ppm como control positivo. Esta prueba consistió en crecer en 90 mL de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) para *Pseudomonas* y *Bacillus cereus* o de medio Standard Plate Count (SPC) para *Bacillus sphaericus* durante aproximadamente 12 h, tiempo en el cual el microorganismo se encon-

traba en crecimiento en fase exponencial, y se adicionó 10 mL del extracto crudo enzimático obtenido durante el crecimiento de los microorganismos productores de bacteriocinas. Este procedimiento se realizó por duplicado para cada microorganismo. El monitoreo de la evolución del crecimiento de los microorganismos con las bacteriocinas ensayadas se realizó mediante mediciones de Absorbancia a 600 nm, contra blanco de medio de cultivo con bacteriocina (Núñez *et al.*, 2002), con el fin de descartar el efecto de dilución en el medio de cultivo de los microorganismos de ensayo (*Pseudomonas* y *Bacillus*) causado por la adición del extracto enzimático, un ensayo como blanco se realizó adicionando 10 mL de agua, realizando el monitoreo de la Absorbancia durante el tiempo de los ensayos.

En la prueba de difusión en gel, la preparación del agar se realizó usando 100 µL de cultivo por cada 30 mL de caldo correspondiente a cada microorganismo. Las cajas se prepararon usando este agar y haciendo pozos de 0,8 cm de diámetro aproximadamente en forma equidistante. Cuando se solidificó el agar se agregó 100 µL de la bacteriocina correspondiente a la prueba en cada uno de los pozos, y en el pozo del centro se colocó una solución de nisina 1000 ppm como control positivo. Las cajas se incubaron toda una noche en nevera a 4 °C para permitir la difusión de la muestra y luego durante 24 h a temperatura óptima del microorganismo correspondiente para evaluar los halos de crecimiento formados. Esta prueba solo se realizó para cada par de microorganismos con la muestra de bacteriocina en la que mejores resultados se obtuvieron en medio líquido y también entre las bacterias lácticas para ver si existía algún tipo de inhibición entre ellas (de la Fuente-Salcido *et al.*, 2008).

Para evaluar el efecto de la cantidad del FOS en la actividad antimicrobiana se seleccionó la bacteria láctica cuya bacteriocina presentó el mejor efecto contra los microorga-

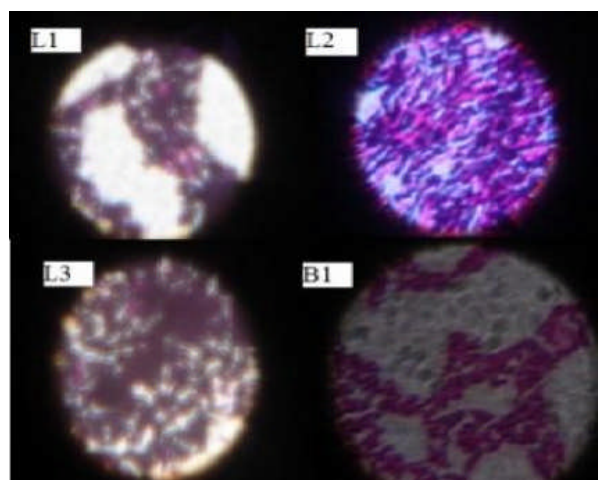
nismos evaluados. Esta bacteria se creció en medio MRS enriquecido con FOS al 5 % para poder comparar los resultados con los obtenidos al enriquecer el medio al 1,2 %.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Activación, caracterización e identificación de microorganismos

A las 24 horas de incubación a 37° C de las cepas seleccionadas se encontró una cuajada debido a la coagulación de la proteína de la leche por acción del ácido láctico producido por las bacterias. Demostrando de hecho la actividad de las cepas seleccionadas para el estudio (González-Villarreal, 2002).

Inicialmente se analizaron los cultivos y se presenciaron otro tipo de microorganismos diferentes pero mediante más repiques fue posible purificar las cepas. Estudiando la morfología de las cepas con tinción de Gram, se encontró que *L. sp.* L1 son bacilos largos, mientras que *L. sp.* L2 son bacilos largos circulares; no poseen esporas ni flagelos y son microorganismos no móviles. Finalmente, la *Bifidobacterium sp.* B1 mostró una estructura bacilar, siendo microorganismos más cortos y más redondos que los anteriores (Fig. 3).



**Figura 3.-** Microscopia de las cepas.

El primer paso de la caracterización de las cepas se basa en establecer o comprobar a que género pertenecen estas, para ello se siguió el proceso establecido por MacFaddin (1980).

Mediante las pruebas realizadas (Cuadro 1) y lo publicado por MacFaddin (1980) se pudo concluir que las cepas pertenecen al género de bacterias lácticas y *Lactobacillus* spp.

**Cuadro 1.-** Caracterización de las cepas.

Características	L1	L2	L3	B1
Morfología	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos cortos
Motilidad	(-)	(-)	(-)	(-)
Flagelos	(-)	(-)	(-)	(-)
Pigmentación colonias	(+)	(+)	(+)	(+)
Tinción de Gram	Morado	Morado	Morado	Morado

El Cuadro 2 presentan las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas para su identificación. Mediante el manual Bergeys's (Garrity *et al.*, 2001; Garrity *et al.*, 2005) se estimó a que especie correspondía cada cepa. La mayoría de estas pruebas se realizaron para conocer el comportamiento de crecimiento de la cepa exceptuando la prueba de Voges-Proskauer la cual permite determinar si la bac-

teria problema sigue la vía de la fermentación butanodiólica para la conversión del ácido pirúvico, produciendo mayoritariamente productos neutros como resultado del proceso de fermentación; el resultado negativo obtenido en esta prueba para todas las cepas mostró que las bacterias realizan la fermentación por una vía diferente pues estas bacterias producen más de un ácido durante su crecimiento.

**Cuadro 2.-** Pruebas fisiológicas y bioquímicas.

Prueba	L1	L2	L3	B1
Catalasa	(-)	(-)	(-)	(-)
Crecimiento a 15 °C	(+)	(+)	(-)	(-)
Crecimiento a 45 °C	(+)	(-)	(+)	(-)
Tolerancia al NaCl 7 %	(+)	(+)	(+)	(+)
Tolerancia al NaCl 10 %	(+)	(+)	(+)	(+)
Tolerancia a pH 3,9	(+)	(+)	(+)	(+)
Oxidación o fermentación de glucosa	Fermentación	Fermentación	Ninguna	Oxidación
Voges-Proskauer	(-)	(-)	(-)	(-)

Para poder obtener un resultado más específico se realizaron las pruebas API. API® 50 CHL es un sistema multiprueba especializado para caracterizar *Lactobacillus*,

razón por la cual la codificación de esta prueba permitió identificar a *L. sp.* L1 como *Lactobacillus pentosus* sp. Por otro lado el sistema API® 20A es un sistema de fermenta-

ción de carbohidratos, es decir que muestra si las diferentes cepas son capaces de fermentar ciertos carbohidratos. Los resultados obtenidos al ser contrastados con lo indicado el manual Bergey's (Garrity *et al.*, 2001; Garrity *et al.*, 2005) permitieron identificar a las cepas L2 y L3 como *Lactobacillus plantarum* sp. y *Lactobacillus helveticus*, respectivamente, y a B1 como *Bifidobacterium infantis*.

### Producción y purificación de bacteriocinas

Al realizar las curvas de crecimiento de las BAL se pudo ver que la adición de FOS aunque no aceleraba el crecimiento, ya que las curvas eran muy parecidas; permitió notar que la fase exponencial se vio retrasada pero en algunos casos se alcanzaron mayores valores en la fase estacionaria (Fig. 4).

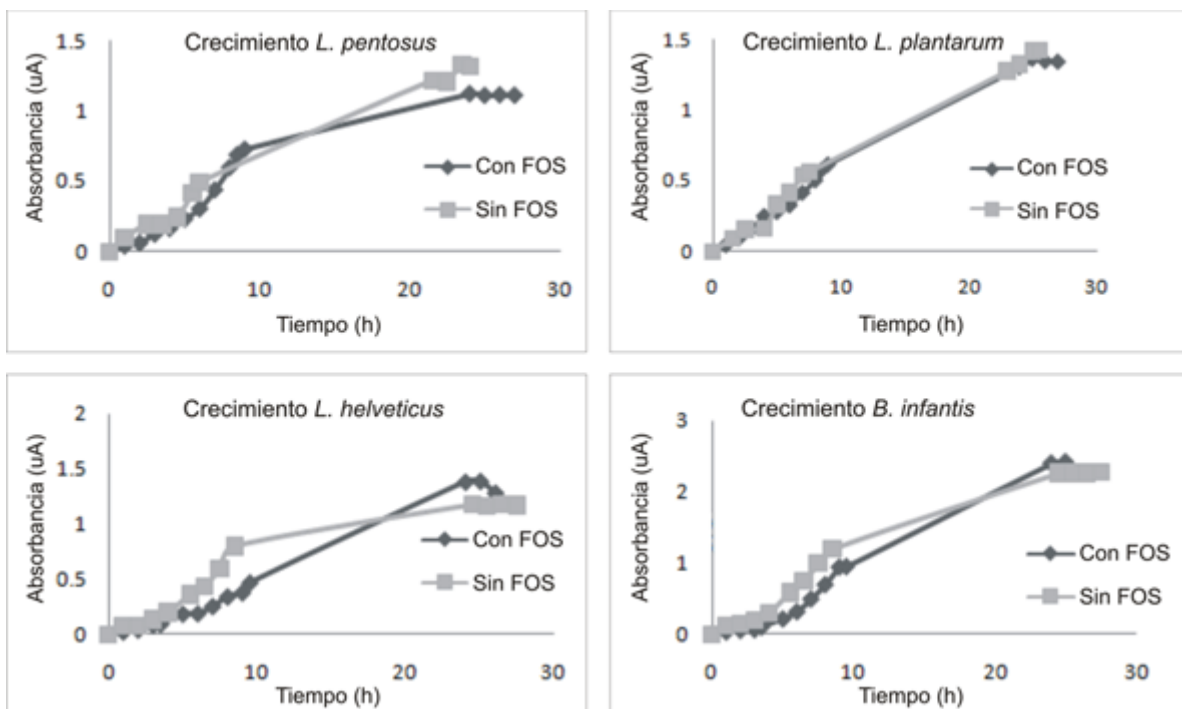
### Evaluación de actividad de las bacteriocinas

#### Actividad antimicrobiana de la nisina

Es importante ver el efecto de la nisina

sobre el crecimiento de estos microorganismos ya que como se dijo anteriormente este sería el control positivo de las pruebas.

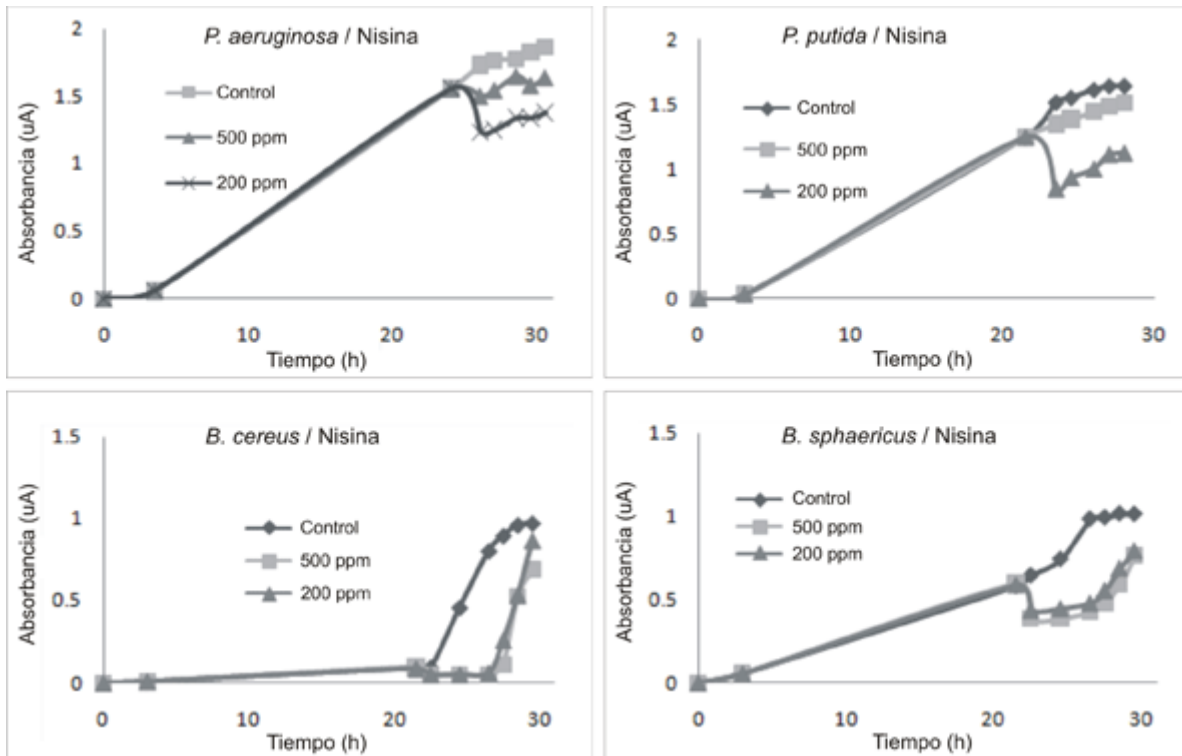
Como se puede apreciar en la Fig. 5, existe una clara diferencia entre la acción de la nisina sobre las pseudomonas y sobre los *Bacillus*, el efecto que ejerció en las pseudomonas fue de disminuir la Absorbancia y mantenerla relativamente constante, lo cual se traduce en un efecto bactericida o bacteriostático, no se pudo saber a ciencia cierta cual efecto debido a que no se realizó conteo celular durante el crecimiento; por otro lado, el efecto que se observa en los *Bacillus* fue disminución de la Absorbancia inmediatamente a la adición de la bacteriocina pero con el tiempo, ésta comenzó a incrementarse nuevamente, lo cual, después se comprobó, fue efecto de la dilución de la muestra, y para obtener efecto antimicrobiano con los *Bacillus* debió trabajarse con una solución de nisina más concentrada, lo cual se hizo para las pruebas de difusión en gel.



uA: unidades de Absorbancia (adimensional) medidas a 600 nm.

**Figura 4.-** Curvas de crecimiento de BAL con FOS y sin FOS.





uA: unidades de Absorbancia (adimensional) medidas a 600 nm.

**Figura 5.-** Evaluación de actividad de nisina con *Pseudomonas* y *Bacillus*.

### Actividad antimicrobiana de bacteriocinas en medio líquido

Luego de realizar las pruebas de actividad contra las *Pseudomonas* y *Bacillus* escogidos fue posible ver que para todas las bacterias lácticas, la bacteriocina con mejores efectos antimicrobianos fue aquella que se produjo en la fase estacionaria (muestra #2), como se aprecia en el Cuadro 3, donde se ve la diferencia promedio entre la Absorbancia del control y la de la respectiva muestra.

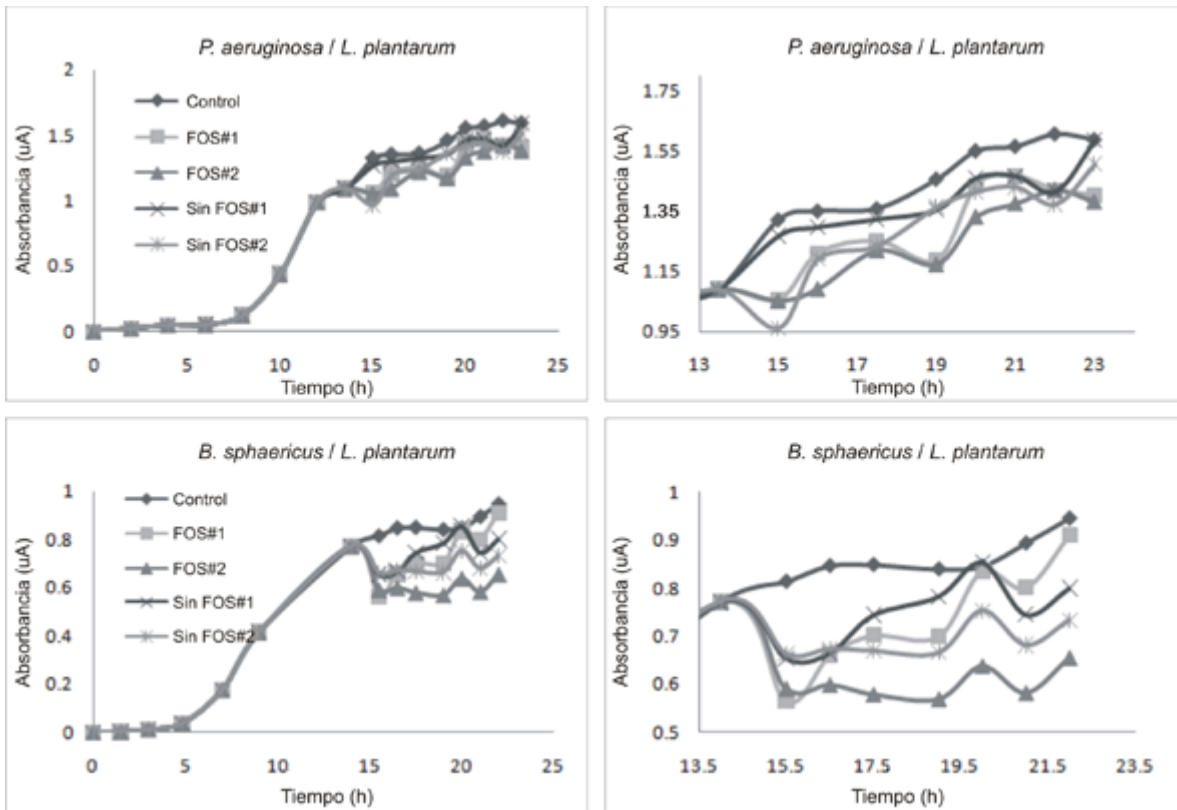
Con respecto al enriquecimiento del medio de cultivo con FOS, se observó que para los *Lactobacillus* en general, este favorece la actividad antimicrobiana de la bacteriocina producida debido al aumento en la tasa de cre-

cimiento del microorganismo como a la actividad de la bacteriocina producida, mientras que para la bifidobacteria en casi todos los casos la actividad antimicrobiana más eficiente fue lograda con el extracto enzimático crudo obtenido sin adición de FOS (Cuadro 3).

Con respecto a la bacteriocinas producida por *L. plantarum*, se puede decir que esta no fue tan potente y efectiva contra los microorganismos ensayados, ya que esta produjo un efecto oscilante en la Absorbancia como se observa en la Fig. 6, lo cual pudo deberse a su poca actividad. Las bacteriocinas de *L. plantarum*, ha sido demostrado, que son efectivas en la inhibición de *Listeria monocytogenes* (Aguilar-Rivera y Vanegas-López, 2007).

**Cuadro 3.-** Diferencia promedio de Absorbancias.

<i>L. helveticus</i>				
	FOS#1	FOS#2	Sin FOS#1	Sin FOS#2
<i>B. sphaericus</i>	0,20014	0,22314	0,08200	0,14357
<i>B. cereus</i>	0,10744	0,26056	0,22467	0,33033
<i>P. aeruginosa</i>	0,07822	0,19611	0,08067	0,14467
<i>P. putida</i>	0,05425	0,20050	0,07325	0,17888
<i>B. infantis</i>				
	FOS#1	FOS#2	Sin FOS#1	Sin FOS#2
<i>B. sphaericus</i>	0,04960	0,17050	0,02800	0,07325
<i>B. cereus</i>	0,15467	0,18544	0,19167	0,22422
<i>P. aeruginosa</i>	0,13878	0,15522	0,00889	0,18478
<i>P. putida</i>	0,71111	0,41167	0,11333	0,50833
<i>L. plantarum</i>				
	FOS#1	FOS#2	Sin FOS#1	Sin FOS#2
<i>B. sphaericus</i>	0,12329	0,25943	0,11200	0,17129
<i>B. cereus</i>	0,12225	0,17538	0,14525	0,18650
<i>P. aeruginosa</i>	0,17263	0,22013	0,07863	0,16563
<i>P. putida</i>	0,21529	0,61171	0,22671	0,52400
<i>L. pentosus</i>				
	FOS#1	FOS#2	Sin FOS#1	Sin FOS#2
<i>B. sphaericus</i>	0,04814	0,18923	0,07843	0,14000
<i>B. cereus</i>	0,06563	0,48875	0,30138	0,06900
<i>P. aeruginosa</i>	0,20988	0,27975	0,18175	0,31213
<i>P. putida</i>	0,24513	0,54263	0,22763	0,57325



uA: unidades de Absorbancia (adimensional) medidas a 600 nm.

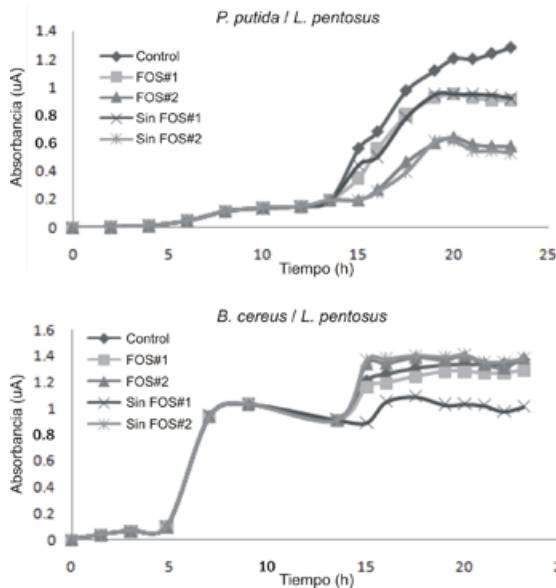
**Figura 6.-** Pruebas de actividad en medio líquido de la bacteriocina producida *L. plantarum* contra pseudomonas y bacilos.

*L. pentosus* por su parte produjo un efecto diferente, ya que como se observa en la Fig. 7 éste disminuye la Absorbancia y la mantiene constante en valores inferiores a los del control. Este efecto es más deseado y refleja mayor potencia de la bacteriocina producida. Este efecto se conoce como bacteriostático el cual consiste en inhibir el crecimiento del microorganismo y por lo tanto mantener la Absorbancia de la muestra constante.

El efecto que produjo la bacteriocinas de *L. helveticus* fue similar al de *L. pentosus* como se observa en la Fig. 8; siendo la más potente de todas ya que presentó efecto bacteriostático contra todos los microorganismos y la diferencia de

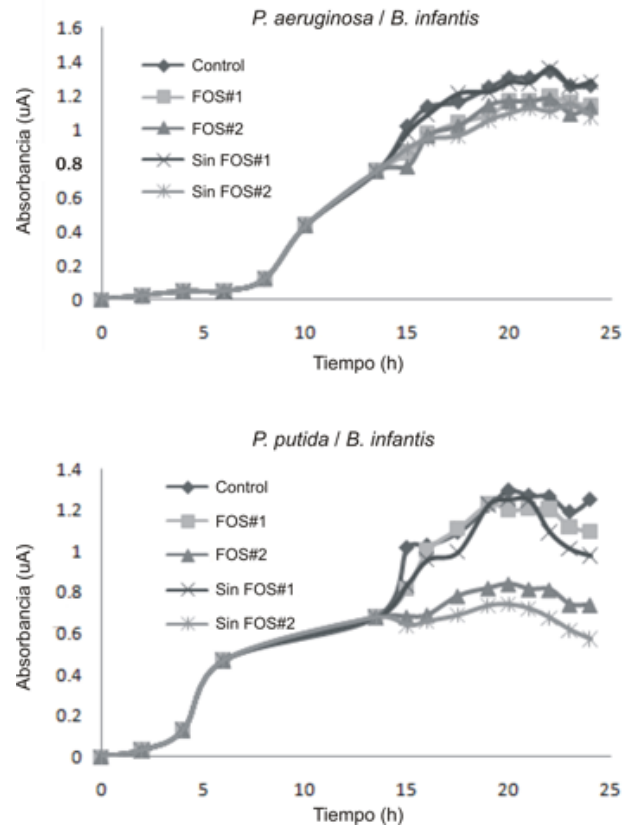
Absorbancia que ocasiona entre el control y los ensayos es significativamente mayor a los obtenidos con los otros BAL. Topisirovic *et al.* (2006) estudiaron el efecto antimicrobiano de algunas bacteriocinas producidas por diversas cepas de BAL, entre ellas, *L. helveticus* contra *B. cereus*, obteniendo el mismo resultado.

La sustancia producida por *Bifidobacterium infantis* produjo una tendencia diferente a las anteriores, ya que en casi todos los casos las curvas suben y vuelven a bajar como se observa en la Fig. 9, lo cual representa posiblemente un efecto bacteriolítico, es decir que la sustancia genera lisis celular y por lo tanto la Absorbancia comienza a disminuir significativamente.



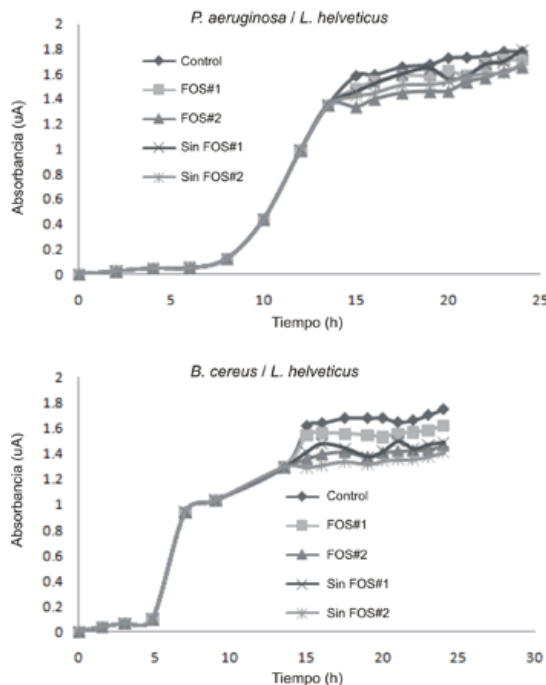
uA: unidades de Absorbancia (adimensional) medidas a 600 nm.

**Figura 7.-** Pruebas de actividad en medio líquido de la bacteriocina producida *L. pentosus* contra pseudomonas y bacilos.



uA: unidades de Absorbancia (adimensional) medidas a 600 nm.

**Figura 9.-** Pruebas de actividad en medio líquido de la bacteriocina producida *B. infantis* contra pseudomonas y bacilos.

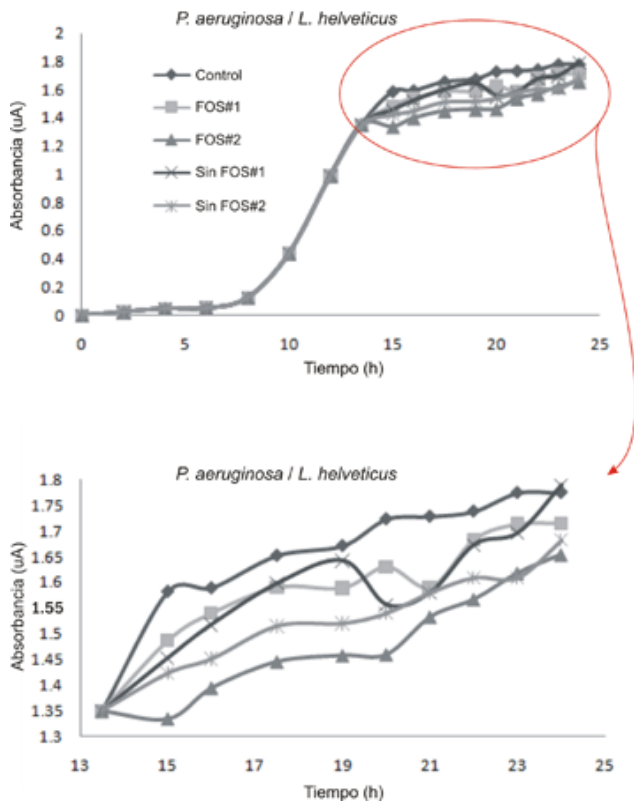


uA: unidades de Absorbancia (adimensional) medidas a 600 nm.

**Figura 8.-** Pruebas de actividad en medio líquido de la bacteriocina producida *L. helveticus* contra pseudomonas y bacilos.

Con relación a *L. helveticus* la mayor diferencia de Absorbancia con respecto al control se encontró con la *Pseudomonas aeruginosa* razón por la cual se puede decir que esta bacteriocina fue más efectiva contra esta especie que contra los otros microorganismos evaluados. Para este caso se puede ver en la Fig. 10 que la Absorbancia tiende a aumentar nuevamente sin mantenerse constante, razón por la cual se pudo afirmar que esta sustancia no tuvo efecto bacteriostático o bactericida frente a este microorganismo.

Por otro lado, el mejor efecto obtenido con *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* y *Bifidobacterium infantis* se obtuvo contra *Pseudomonas putida* pues se ve un claro efecto bacteriostático al disminuir la Absorbancia y mantenerla constante (Fig. 11).



uA: unidades de Absorbancia (adimensional) medidas a 600 nm.

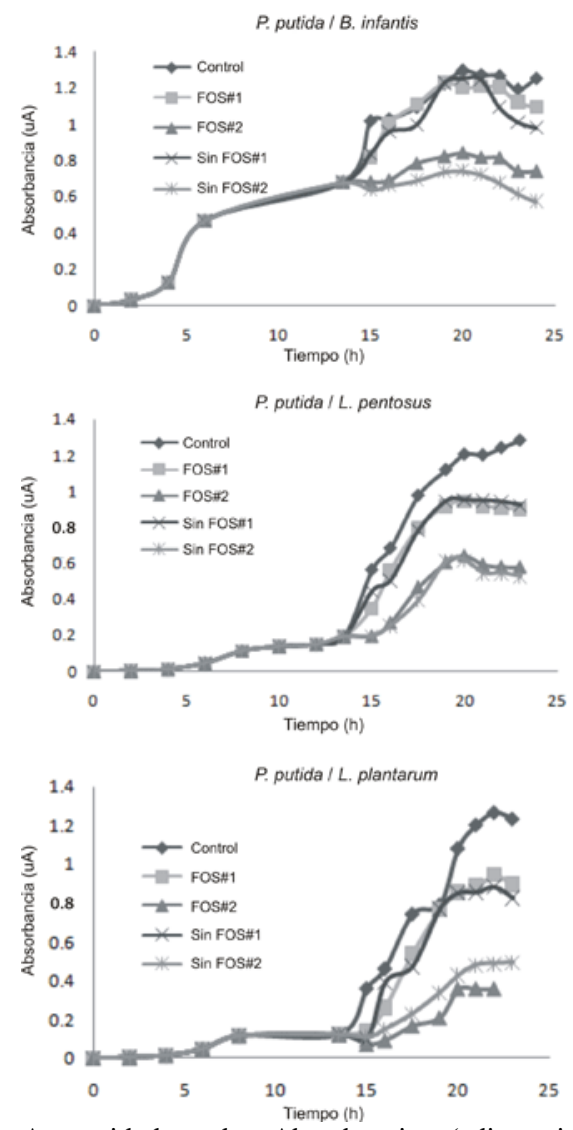
**Figura 10.-** Mejores resultados obtenidos por *L. helveticus* en la prueba de actividad en medio líquido contra pseudomonas y bacilos.

Hasta el momento en la literatura se han presentado varias bacteriocinas diferentes producidas por estas bacterias. Para poder identificar cuales fueron las obtenidas en este trabajo debió hacerse un estudio de ADN y pruebas más detalladas de las sustancias obtenidas, razón por la cual, no fue posible saber que bacteriocinas fueron obtenidas.

**Actividad antimicrobiana de bacteriocinas en medio sólido. Prueba de difusión en gel**

Las muestras escogidas para realizar las pruebas de actividad en medio sólido fueron aquellas que mejores resultados mostraron en

las pruebas en medio líquido. Luego de 24 horas de incubadas las cajas, existían pocos halos de inhibición; el más notable fue el generado por la nisina, lo cual era esperado ya que ésta es una sustancia comercial que se encontraba en estado puro mientras que las bacteriocinas producidas eran extracto crudo de la fermentación. A pesar de esto se vio cierta inhibición de crecimiento.



uA: unidades de Absorbancia (adimensional) medidas a 600 nm.

**Figura 11.-** Mejores resultados obtenidos en la prueba de actividad en medio líquido contra pseudomonas y bacilos.

Comparando los resultados del Cuadro 4 con los obtenidos en medio líquido, se puede observar que existe concordancia entre estos, ya que en medio líquido *L. plantarum*, *L. pentosus* y *B. infantis* actúan mejor contra *P.*

*putida* resultado que se comprueba con la prueba de difusión en gel; por otro lado *Lactobacillus helveticus* fue muy efectivo con *P. aeruginosa* lo cual también pudo observarse en esta prueba.

**Cuadro 4.-** Resultados de pruebas de difusión en gel.

Bacteriocina de	<i>L. plantarum</i>	Inhibió el crecimiento de	<i>B. Cereus – P. putida</i>
	<i>L. pentosus</i>		<i>P. putida</i>
	<i>L. helveticus</i>		<i>P. aeruginosa</i>
	<i>B. infantis</i>		<i>B. sphaericus – P. putida</i>

Con relación a las pruebas entre las bacterias lácticas no se observó ningún halo de inhibición en las cajas. Al contrario, como se observa en la Fig. 12, donde se supone que debe haber halos, los pozos, son los lugares donde más microorganismos crecieron. Esto debido posiblemente a las células presentes de cada microorganismo en su respectivo extracto.

#### Evaluación del efecto de la cantidad de FOS

El efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con FOS sobre la producción de bacteriocinas, se determinó mediante el efecto causado sobre la Absorbancia de los diferentes microorganismos evaluados. Los resultados obtenidos en la Fig. 10 mostraron que la bacteriocina más efectiva contra los microorganismos estudiados fue la producida por *Lactobacillus helveticus*, razón por la cual se produjo su crecimiento en medio líquido enriquecido con FOS al 5% y se evaluó la actividad de la sustancia frente a *Pseudomonas aeruginosa* ya que era la más inhibida por este *Lactobacillus*. Se observó que el aumento de la cantidad de FOS en la producción de las

bacteriocinas aumenta el poder bacteriostático de la bacteriocina producida, y por lo tanto su potencia aumenta ya que los resultados al 1,2 % muestran que la Absorbancia tiende a volver aumentar y con 5 % se mantiene constante (Fig. 13); adicionalmente la diferencia de Absorbancia lograda fue mayor con un medio enriquecido con FOS en un 5 % que con 1,2 % (Fig. 14).



**Figura 12.-** Prueba de inhibición entre BAL.

**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

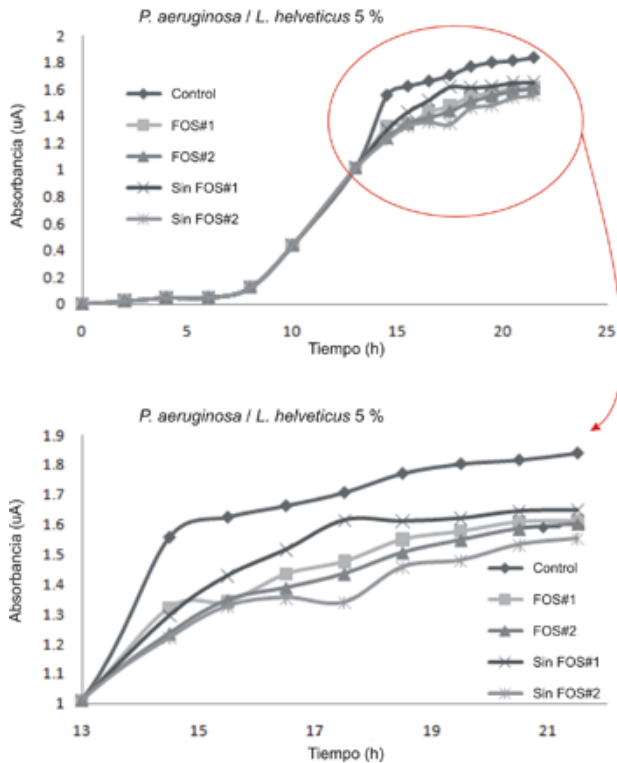
Con las pruebas físicas y bioquímicas que se realizaron a las cepas es posible concluir que estas pertenecen al género *Lactobacillus*, ya que todas cumplen con las características principales de este género, tales como, forma bacilar, ausencia de motilidad y de flagelos, crecimiento óptimo anaeróticamente y reacción negativa a la catalasa, entre otras.

Con la utilización de sistemas más complejos y exactos como el API 50® CH y el API 20® A fue posible caracterizar completamente las cepas teniendo en cuenta principalmente su fermentación de carbohidratos. Así es posible concluir que las cepas *L. sp.* L1, L2, L3 y *B. sp.* B1 corresponden a *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus* y *Bifidobacterium infantis*, respectivamente.

Con el fin de homologar un poco el proceso de producción de las bacteriocinas estas se produjeron a las mismas condiciones de temperatura 37 °C , agitación 150 rpm y de pH el del caldo MRS ya que todas las bacterias crecieron en estas condiciones pero hay que tener en cuenta que las condiciones óptimas para la producción de bacteriocinas dependen de cada microorganismo en especial, de manera que podrían haber mejores condiciones para la producción de la cada una de las bacteriocinas y es algo que debe estudiarse a futuro.

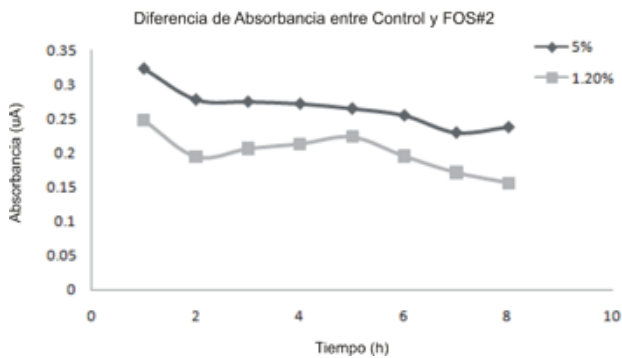
Aunque los FOS no aceleraron el crecimiento del microorganismo en tiempo, si aumentó la velocidad de crecimiento en la fase exponencial del microorganismo y la sustancia bacteriocina que se produjo al usar FOS tuvo mejores efectos al evaluar su actividad frente a otro tipo de microorganismos. De igual manera el aumento de FOS, aumentó la bacteriostaticidad que la sustancia produce sobre otros microorganismos.

En todos los casos y sobre todo los microorganismos evaluados, la bacteriocinas que tuvieron mayor efecto antimicrobiano sobre



uA: unidades de Absorbancia (adimensional) medidas a 600 nm.

**Figura 13.-** Pruebas de actividad en medio líquido de la bacteriocina producida *L. helveticus* con 5 % FOS contra *Pseudomonas aeruginosa*.



uA: unidades de Absorbancia (adimensional) medidas a 600 nm.

**Figura 14.-** Diferencia de Absorbancias en pruebas de actividad en medio líquido de la bacteriocina producida *L. helveticus* con 1,2 % y 5 % FOS contra *Pseudomonas aeruginosa*.

otros microorganismos fueron la obtenida en la fase estacionaria de crecimiento de la bacteria láctica y la obtenida usando FOS para los *Lactobacillus* y sin FOS para la bifidobacteria.

Los mejores resultados de actividad antimicrobiana que se obtuvieron y los más prometedores fueron de la bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* y *B. infantis* contra *Pseudomonas aeruginosa* tanto en medio líquido como en la prueba de difusión en gel.

Teniendo en cuenta que las bacterias lácticas son microorganismos Gram positivos teóricamente se esperaba que su mayor actividad fuera contra microorganismo Gram positivos por su semejanza membranal pero en este caso los mejores resultados se obtuvieron contra *Pseudomonas* los cuales son microorganismos Gram negativos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Rivera, Carolina y Vanegas-López, María Consuelo. 2007. Inhibición de *Listeria monocytogenes* contra bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas. *Revista Alimentos Hoy*. N° 12. <http://www.acta.org.co/Pdf/Revista/IV Premio/IV%20PREMIO%203%20PUEST O.pdf>
- Cleveland, Jennifer; Montville, Thomas J.; Nes, Ingolf F. and Chikindas, Michael L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 71(1):1-20.
- de la Fuente-Salcido, Norma Margarita; Morales-Pérez, Gabriela; Alanís-Guzmán María Guadalupe; Salcedo-Hernández, Rubén y Barboza-Corona, J. Eleazar. 2008. Síntesis por inducción y actividad antimicrobiana de bacteriocinas de *B. thuringensis*. *Revista Salud Pública y Nutrición*. Edición especial N° 8. <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2008/ee-08-2008/documentos/A047.pdf>
- Deegan, Lucy H.; Cotter, Paul D.; Hill, Collin and Ross, Paul. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*. 16(9):1058–1071.
- Dos Santos-Moreira, Wagner Luis. 1993. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *peddiococcus* sp. 347, de origen cárnico. Tesis Doctoral. Departamento de Nutrición y Bromatología III, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Garrity, George M.; Boone, David R. and Castenholz, Richard W. 2001. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volume One: The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria. (2nd. ed.). USA: Springer.
- Garrity, George M.; Brenner, Don J.; Krieg, Noel R. and Staley, James T. 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volume Two: The proteobacteria. (2nd. ed.). USA: Springer.
- González-Villarreal, Manuel. 2002. Tecnología para la elaboración de queso amarillo, cremas y mantequilla. SENACYT-ampyme (Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación-Autoridad de la Micro, Pequeña y Mediana Empresa). Macaracas, Los Santos, República de Panamá.
- Gross, Erhard and Morell, John L. 1971. Structure of nisin. *Journal of the American Chemical Society*. 93(18): 4634-4635.
- Hartemink, R.; Domenech, V.R. and Rombouts, F.M. 1997. Lamwab-a new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiological Methods*. 29(2):77-84.
- Klaenhammer, Todd R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. 70(3):337-349.
- MacFaddin, Jean F. 1980. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Pana-



- mericana.
- Manning, T.S. and Gibson, G.R. 2004. Prebiotics. *Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology*. 18(2):287-298.
- Muñoz-Rojas, Jesús. 2004. Bacteriocinas: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano. Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México.
- Núñez, Griselda A.; Cayré, María, E.; Castro, Marcela P. y Garro, Oscar A. 2002. Efectividad y modo de acción de nisina sobre *Lactobacillus fructivorans*. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Ciencias Exactas. E-004. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina. <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2002/cyt.htm>
- Ortiz, Libia Mercedes. 2007. Evaluación del potencial de producción de bacteriocinas de lactobacilos aislados de ensilaje contra microorganismos patógenos. Tesis. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Quiles-Sotillo, Alberto y Hevia-Méndez, María Luisa. 2006. Características de la flora intestinal del lechón: efecto de los probióticos. *Producción Animal*. 21(219):4-19.
- Ruiz-Larrea, F.; Rojo-Bezares, B.; Sáenz, Y.; Navarro, L.; Díez, L.; Zarazaga, M. y Torres, C. 2007. Bacteriocinas para la estabilización microbiológica y reducción de la dosis de CO<sub>2</sub>. En *International Symposium Microbiology and Food Safety of Wine "Microsafetywine"*. 20-21 Noviembre. Vilafranca del Penedès, Barcelona, España.
- Sierra-Salinas, C. 2007. Alimentos funcionales: probióticos y prebióticos (13). En *Manual práctico de Nutrición en pediatría*. (pp. 185-194). Majadahonda, Madrid, España: Ergon.
- Topisirovic, Ljubisa; Kojic, Milan; Fira, Djordje; Golic, Natasa; Strahinic, Ivana and Lozo, Jelena. (2006). Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 112(3):230-235.