

**DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL BACTERIOCINOGÉNICO DE BACTERIAS  
ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS A PARTIR DE LECHE CRUDA**

**CRISTIAN SCHMELINK RAMOS  
MONTERROSA**

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA.  
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS  
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
2015**

**DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL BACTERIOCINOGENICO DE BACTERIAS  
ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS A PARTIR DE LECHE CRUDA**

**CRISTIAN SCHMELINK RAMOS  
MONTERROSA**

**Director: Danny Armando**

**Pisciotti Ortega (MSc)**

**Codirector: Rodolfo Andrés**

**Cabeza Herrera (MSc)**

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA.  
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS  
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
2015**

## **AGRADECIMIENTOS**

**En el presente trabajo quiero dar mis gracias como primera medida a Dios por permitirme estudiar Biología, la ciencia que me apasiona.**

**A mi familia por su gran esfuerzo y apoyo, ya que en todos los momentos que los necesite allí estuvieron.**

**A mis profesores, por permitirme aprender de ellos, como profesionales y como personas.**

**A mis amigos, por brindarme tantos momentos de alegrías y acompañamiento que serán inolvidables.**

**A mi profesora Ángela Cajio, por permitirme desarrollar mis prácticas en el CEPARIO Universidad de Pamplona, y por ser un gran aporte de experiencia y aprendizaje para mi vida profesional y personal.**

**Gracias a todas estas personas por hacer parte de un logro muy importante en mi vida y es el de ser Biólogo.**

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN	7
1. OBJETIVOS	9
1.1 OBJETIVO GENERAL	9
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
2. JUSTTIFICACIÓN	10
3. MARCO REFERENCIAL	11
3.1 BASES LEGALES	11
3.2 ANTECEDENTES	11
4. SISTEMA TEÓRICO	12
4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	12
4.2 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	12
4.3 BACTERIOCINAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	13
4.4 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS	13
4.5 PRODUCCIÓN, BIOSÍNTESIS Y SECRECIÓN	15
4.6 MODO DE ACCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS	16
4.6.1 Espectro de inhibición	16
4.6.2 Modo de acción	17
4.6.3 Resistencia e inmunidad	18
4.7 UTILIDAD DE LAS BACTERIOCINAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	18
4.8 REFERENTES ACTUALES	19
5. METODOLOGÍA.	20
5.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE LECHE	20
5.2 MANEJO DE LAS MUESTRAS	21

5.3 AISLAMIENTO DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	21
5.4 PRODUCCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS	21
5.5 DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LAS BACTERIOCINAS	22
5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	22
6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	24
7 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	25
7.1 MICROORGANISMOS SELECCIONADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS	25
7.2 PERFIL BIOQUÍMICO COMPARATIVO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADA DE BAL	26
7.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS SOBRE ALGUNAS BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS	29
7.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	33
8. CONCLUSIONES	38
9. RECOMENDACIONES	39
10. BIBLIOGRAFÍA	40
11. ANEXOS	44

## LISTA DE IMAGENES- GRAFICAS

	<b>Pág.</b>
Imagen 1. Modo de acción de los lantibióticos (clase I), no-lantibioticoa (clase II) y bacteriolisinas (clase III)	17
Imagen 2. Fincas productoras de leche cruda. a) Finca el Suárez, b) Finca la Esperanza, c) Finca la Colonia	20
Imagen 3. División del sobrenadante en tubos estériles a) Cultivos en caldo MRS; b) extracto crudo; c) extracto purificado	22
Gráfica 1. Evaluación de extractos crudos obtenidos de microorganismos BAL sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , bajo la técnica de antibiograma en placa	30
Gráfica 2. Evaluación de extractos puros obtenidos de microorganismos BAL sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , bajo la técnica de antibiograma en placa	32
Gráfica 3. Índice de variación para los extractos crudo y puro	34

## LISTA TABLAS

	Pág
Tabla 1. Tipos de lantibioticos de clase I	14
Tabla 2. Subgrupos de no lantibióticos clase II	14
Tabla 3. Bacteriocinas de clase III y clase IV	15
Tabla 4. Obtención de las muestras de leche	20
Tabla 5. Cronograma y descripción de actividades	24
Tabla 6. Características morfológicas y tinción Gram para los diferentes microorganismos aislados en agar MRS	25
Tabla 7. Resultados bioquímicos comparativos para especies de <i>Enterococcus spp</i> y <i>Streptococcus spp</i>	26
Tabla 8. Resultados bioquímicos comparativos para especies de <i>Leuconostoc spp</i> y <i>Lactococcus spp</i>	27
Tabla 9. Resultados bioquímicos comparativos para especies de <i>Lactobacillus spp.</i>	28
Tabla 10. Desviación estándar y promedios de cada efecto inhibitorio	29
Tabla 11. Desviación estándar y promedios de cada efecto inhibitorio	31
Tabla 12. Índice de variación para los extractos crudos y puros	33
Tabla 13. Análisis de varianza – <i>E. coli</i> – Tipo de Extracto – Tratamiento	35
Tabla 14. Análisis de varianza – <i>L. monocytogenes</i> – Tipo de Extracto – Tratamiento	35
Tabla 15. Análisis de varianza – <i>B. cereus</i> – Tipo de Extracto – Tratamiento	36
Tabla 16. Análisis de varianza – <i>P aeruginosa</i> – Tipo de Extracto – Tratamiento	36
Tabla 17. Análisis de varianza – <i>S. aureus</i> – Tipo de Extracto – Tratamiento	37
Tabla 18. Análisis de varianza – <i>E. faecalis</i> – Tipo de Extracto – Tratamiento	37

## INTRODUCCION

Las bacterias ácido lácticas son un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivos, anaerobios facultativos, no esporulados, inmóviles y catalasa negativo, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* spp; *Carnobacterium* spp; *Leuconostoc* spp; *Pediococcus* spp; *Streptococcus* spp; *Tetragenococcus* spp; *Lactococcus* spp; *Vagococcus* spp; *Enterococcus* spp; *Aerococcus* spp; y *Weissella* spp. Constituyen un grupo de microorganismos que han sido utilizados en la manufactura de una gran variedad de alimentos fermentados y elaborados de forma artesanal, como queso, yogurt. (Hofvendahl y Hagerdal, 2000). Los estudios efectuados con bacterias ácido lácticas han reportado efectos positivos en el crecimiento, sobrevivencia y eliminación de patógenos de los organismos acuáticos; sin embargo, la gran diversidad de compuestos inhibidores producidos por las bacterias ácido lácticas, como las bacteriocinas, requieren de rigurosos estudios sobre el modo de acción de estos compuestos sobre otros microorganismos (O'Sullivan *et al.*, 2002).

Este es el metabolito sobre el cual se han centrado la mayor parte de estudios en los últimos años, desarrollándose diversas investigaciones en torno a su detección, producción, purificación, forma de acción, caracterización bioquímica, propiedades bactericidas, microorganismos inhibidos o sensibles y aplicación con éxito en la biopreservación de alimentos.

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana producidos por síntesis ribosomal y son segregadas por un gran número de bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores (Papagianni, 2003., Joerger, 2003; Katikou *et al.*, 2005; Motta *et al.*, 2008). Estas sustancias con frecuencia actúan frente a las bacterias más estrechamente relacionadas. Sin embargo, estudios recientes afirman que también pueden actuar frente a otras especies bacterianas, hongos y algunos parásitos (Eijsink *et al.*, 1998; Cotter *et al.*, 2005; Svetoch *et al.*, 2008). Recientemente este concepto se ha modificado ya que se han encontrado también acciones bactericidas contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora (Sablón *et al.*, 2000).

La producción de las bacteriocinas ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida (Cáceres y Felipe, 2007). La secreción es través de la membrana citoplasmática por la actividad de transportadores específicos de tipo ABC.

El blanco primario de acción de las bacteriocinas parece ser la membrana plasmática. Éstas alteran la permeabilidad selectiva de la membrana de las células vegetativas sensibles, provocando la inmediata e inespecífica liberación de iones, compuestos de bajo peso molecular y algo más tarde del ATP intracelular (Venema *et al.*, 1993).

De todas las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas, las bacteriocinas aparecen como las más adecuadas desde un punto de vista tecnológico para ser utilizadas como conservantes de grado alimentario, su naturaleza peptídica permite la degradación por las enzimas digestivas, resultando así presuntivamente inocuas para el consumidor, sus propiedades fisicoquímicas las hacen resistentes a los tratamientos térmicos y cambios de pH que sufren los alimentos durante su fabricación y

almacenamiento (Mora y García, 2007).

Con la finalidad de obtener bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas se propusieron los siguientes objetivos en esta investigación: identificar bacterias ácido lácticas, mediante parámetros morfológicos y metabólicos. Asimismo, evaluar la capacidad inhibitoria de los extractos sobre algunas bacterias Gram positivas y Gram negativas.

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el potencial bacteriocinogénico de bacterias ácido lácticas presentes de manera natural en la leche cruda.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Identificar bacterias ácido lácticas aisladas mediante parámetros morfo-fisiológicos.
- Inducir la producción de bacteriocinas de las cepas aisladas e identificadas mediante procesos de crecimiento en medios de cultivo.
- Separar las diferentes sustancias obtenidas durante los procesos de crecimiento mediante técnicas fisicoquímicas simples.
- Evaluar la capacidad inhibitoria de los extractos sobre algunas bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- Inferir sobre la relación existente entre los efectos inhibitorios y los microorganismos evaluados.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La participación de diversos agentes patógenos en productos alimenticios, así como la creciente preocupación por la preservación y de alimentos mínimamente procesados han estimulado una mayor conciencia de la importancia de la seguridad alimentaria. Esto ha llevado a nuevos enfoques para inhibir patógenos transmitidos por los alimentos. En particular, ha habido un renovado interés en la actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas.

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimenticia ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos puros que en un momento dado podrían reemplazar a los conservadores químicos ya que tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman compuestos secundarios.

Las bacterias ácido lácticas están presentes en la alimentación del hombre desde hace mucho tiempo y es posible encontrarlas en muchos productos de leche fermentada como yogurt, también se encuentran en quesos frescos, en diferentes carnes y sus productos y en algunas hortalizas; su actividad antimicrobiana ha sido atribuida a la acumulación de los productos finales de los procesos de fermentación, como ácido láctico, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, o bacteriocinas (León y Pérez, 2005).

La necesidad de ofrecer alimentos “frescos” mínimamente procesados y el creciente rechazo del consumidor actual hacia los aditivos químicos han llevado a la industria alimentaria a reconsiderar el potencial antimicrobiano de las bacterias lácticas como una nueva estrategia de conservación. Viendo esta problemática asociada a los conservantes en la actualidad, se hace necesario recurrir a nuevas técnicas de preservación de alimentos o alternativas que aseguren una correcta preservación de dichos productos y a su vez que prolonguen la vida útil de los mismos sin que afecten la salud humana, por lo tanto, se inicia el desarrollo de este trabajo en donde la finalidad es determinar el potencial bacteriocinogénico de ciertas bacterias ácido lácticas para la posible biopreservación de alimentos.

### 3. MARCO REFERENCIAL

#### 3.1 BASES LEGALES

Actualmente la nisina es la única bacteriocina que ha sido aprobado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), para ser utilizada como conservante en la industria alimentaria;

Dado que el péptido (nisina) es aceptado como un bioconservante de los alimentos debido a sus propiedades antibacterianas, a su impacto mínimo con relación a los cambios a las propiedades organolépticas de los alimentos (Beristain *et al.*, 2012).

Actualmente las bacteriocinas se emplea en más de 50 países, aunque con distintos criterios en cuanto a los límites máximos de utilización permitidos y de alimentos donde se puede emplear. La nisina es conocida comercialmente como Nisina (E234), está autorizada como conservante alimentario en la Unión Europea por la Directiva 95/2/(CE) sobre aditivos alimentarios diferentes a los colorantes y los edulcorantes (The EFSA Journal, 2006).

#### 3.2 ANTECEDENTES.

Hace miles de años se utilizan las bacterias ácido lácticas como conservantes, ya que producen otras sustancias antimicrobianas como el ácido láctico, el etanol, el dióxido de carbono, el benzoato y sustancias proteicas denominadas bacteriocinas.

Las primeras observaciones de antibiosis microbiana realizada por Pasteur y Joubert año (1877) permitieron vislumbrar las posibilidades terapéuticas de los fenómenos de antagonismo. Posteriormente, Rogers (1928) identificó una sustancia de naturaleza peptídica (nisina), producida por *Streptococcus lactis*, que inhibía a microorganismos Gram positivos, incluyendo patógenos y alterantes de alimentos. En la década de los 80's surge el uso de las bacteriocinas como bioconservantes para la industria alimentaria, ya que se evidencia que contribuyen favorablemente en la conservación de los alimentos por su capacidad para inhibir el desarrollo de un gran número de microorganismos patógenos y/o alterantes presentes en las materias primas o que llegan al producto por una mala manipulación, por lo tanto permiten reducir el uso de conservantes químicos y suavizar los tratamientos a los que se someten los alimentos procesados, sin que esto afecte su calidad y seguridad. Por lo anterior, las bacteriocinas son el metabolito sobre el cual ha aumentado el interés en los últimos 30 años, tanto de la comunidad científica como de los sectores industriales y en la cual han centrado la mayor parte de sus estudios, desarrollándose diversas investigaciones en torno a su detección, producción, purificación, forma de acción, caracterización bioquímica, propiedades bactericidas, microorganismos inhibidos o sensibles y aplicación con éxito en la bioconservación de alimentos (Vásquez *et al.*, 2009).

## 4. SISTEMA TEÓRICO

### 4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas son un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas, no esporuladas, inmóviles y catalasa negativo, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* spp; *Carnobacterium* spp; *Leuconostoc* spp; *Pediococcus* spp; *Streptococcus* spp; *Tetragenococcus* spp; *Lactococcus* spp; *Vagococcus* spp; *Enterococcus* spp; *Aerococcus* spp; y *Weissella* spp (Evelia, A. capítulo 15).

La mayoría de las especies pertenecientes a estos géneros tienen alta tolerancia a pH por debajo de 5. Esta tolerancia ácida les da ventajas competitivas sobre otras bacterias; la temperatura óptima de crecimiento varía entre géneros y está en un rango de 20°C a 45°C, también tienen requerimientos nutricionales complejos debido a su limitada habilidad para sintetizar aminoácidos y vitamina B (Hofvendahl & Hagerdal, 2000).

### 4.2 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Bajo el término antibiosis se engloban todas aquellas asociaciones entre microorganismos en las que al menos uno de ellos se ve desfavorecido. Las primeras observaciones de antibiosis microbiana realizada por Pasteur y Joubert (1877) permitieron vislumbrar las posibilidades terapéuticas de los fenómenos de antagonismo. Posteriormente, Rogers (1928) identificó una sustancia de naturaleza peptídica (nisina), producida por *Streptococcus lactis*, que inhibía a microorganismos Gram positivos, incluyendo patógenos y alterantes de alimentos, debido a que la cepa productora era utilizada como cultivo iniciador en la producción de derivados lácteos, se plantearon nuevas aplicaciones no sólo con fines terapéuticos del antagonismo microbiano.

La variedad de especies microbianas que se encuentran inicialmente en el alimento crudo o materia prima, solamente unas pocas están dotadas de las capacidades fisiológicas necesarias para multiplicarse masivamente en las condiciones concretas que ofrecen el alimento y el medio ambiente que se genera. Así pues, las bacterias lácticas llegan a proliferar en la mayoría de estos hábitats, constituyendo un claro ejemplo de antagonismo microbiano (McKay y Baldwin, 1990).

La capacidad de producir grandes cantidades de ácido (láctico, acético) por fermentación de los carbohidratos presentes y la consecuente caída del pH son los factores primarios en los que se basa la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas. Este efecto es muy importante ya que los hábitats de estas bacterias, en especial los alimentos sin elaborar, poseen una alta actividad de agua y son muy ricos en nutrientes, por lo que la proliferación bacteriana se ve muy favorecida.

Los ácidos lipofílicos son capaces de atravesar la membrana plasmática en su forma no disociada e interferir con las funciones básicas del metabolismo celular, disminuyendo el pH interno de la célula. Así se explica el amplio rango de microorganismos inhibidos, con la única excepción de los organismos acidodúricos como levaduras, mohos y las propias bacterias lácticas. Sin embargo, el complejo sistema antagonista de las bacterias lácticas

no sólo se basa en la producción de ácidos sino que también participan activamente otros metabolitos inhibitorios que, a pesar de ser sintetizados en menor cantidad, contribuyen significativamente a los fenómenos de antibiosis.

La competencia por sustratos esenciales, la acumulación de D-aminoácidos, el descenso del potencial de óxido-reducción y la coagregación también participan activamente en la acción inhibitoria. La producción de estas sustancias inhibitorias de naturaleza proteica parece ser un fenotipo muy extendido dentro de las bacterias lácticas y se ha establecido en muchas ocasiones, su implicación directa en la inhibición específica de microorganismos patógenos (Ruiz *et al.*, 1994).

### **4.3 BACTERIOCINAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana producidos por síntesis ribosomal y son segregadas por un gran número de bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores (Papagianni, 2003; Joerger, 2003; Katikou, 2005; Motta, *et al.*, 2008). Estas sustancias con frecuencia actúan frente a las bacterias más estrechamente relacionadas. Sin embargo estudios afirman que también pueden actuar frente a otras especies bacterianas, hongos y algunos parásitos (Eijsink *et al.*, 1998; Cotter *et al.*, 2005; Svetoch *et al.*, 2008). En la naturaleza existe una enorme diversidad de bacteriocinas que han sido encontradas en casi todas las especies bacterianas examinadas, y aun dentro de una especie podrían producirse diferentes tipos de bacteriocinas (Joerger, 2003).

Se describieron por primera vez en *Escherichia coli* y posteriormente en bacterias Gram positivas. Las colicinas, bacteriocinas producidas por *E. coli* han sido estudiadas en profundidad, estas bacteriocinas se caracterizan no sólo por su naturaleza proteica y su acción bactericida restringida. Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas constituyen un grupo estructural y funcionalmente más amplio y muy heterogéneo. Existe una gran diversidad en cuanto a su tamaño y al número de subunidades que componen la molécula activa, su espectro de inhibición puede ser en ocasiones bastante amplio, no siempre requieren de receptores específicos para su acción bactericida, y sus determinantes genéticos pueden localizarse tanto en el cromosoma como en plásmidos (Ruiz, *et al.*, 1994).

### **4.4 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS**

Tradicionalmente, se considera a las bacteriocinas como péptidos biológicamente activos que tienen propiedades bactericidas contra otras especies estrechamente relacionadas con la cepa productora, sin embargo, recientemente este concepto se ha modificado ya que se han encontrado también acciones bactericidas contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora (Sablón, *et al.*, 2000). Actualmente se conoce la estructura primaria de numerosas bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, bien por secuenciación directa de los péptidos purificados o por traducción del correspondiente ADN. Teniendo en consideración sus propiedades fisicoquímicas, tamaño, espectro de inhibición y presencia de aminoácidos modificados, las bacteriocinas de las bacterias lácticas se han clasificado en 4 grandes clases (Nes *et al.*, 1996).

➤ **Lantibioticos de (clase I)**

Péptidos pequeños (< 5 kDa), termoestables. Se caracterizan por la presencia de aminoácidos no usuales en su composición, estos se generan postraduccionalmente por deshidratación de serina y treonina para dar dehidroalanina y dehidrobutirina respectivamente. Aunque estos precursores puedan formar parte de la estructura final del lantibiótico, en muchas ocasiones sufren una condensación con el grupo sulfhidrilo de las cisteínas presentes en la molécula, formándose puentes alanina-S-alanina (lantionina) o ácido aminobutírico-S-alanina, se distinguen 2 tipos de lantibióticos como se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1.** Tipos de lantibioticos de clase I

<b>Tipo A</b>	Péptidos elongados y catiónicos que actúan a nivel de membrana y que engloban a los lantibioticos de un solo péptido y a aquellos que requieren la presencia de dos péptidos para ejercer su actividad antimicrobiana total (Monroy <i>et al.</i> , 2009).
<b>Tipo B</b>	Péptidos de estructura globular, con tamaños comprendidos entre 1959 y 2041 Da, sin carga o cargados negativamente. Hasta el momento, no se han identificado lantibióticos de tipo B dentro de las bacterias lácticas (Montville y Chen, 1998; Monroy <i>et al.</i> , 2009).

➤ **No lantibióticos (clase II)**

Péptidos (<15 kDa), estables al calor y que no contienen aminoácidos modificados en su estructura primaria, junto con los lantibióticos, es la clase más numerosa de bacteriocinas. Se caracterizan además porque tienen una señal de procesamiento del péptido líder común (-Gly-2-Gly-1). En función de homologías en su estructura primaria, espectro de inhibición y número de péptidos componentes (Stoffels *et al.*, 1992). Estos a su vez pueden subdividirse en 4 subgrupos evidenciado en la tabla 2.

**Tabla 2.** Subgrupos de no lantibióticos clase II

<b>Clase IIa</b>	Péptidos activos frente a <i>Listeria</i> que comparten una secuencia consenso en la región NH2-terminal: -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys-. Dentro de este grupo se encuentran: la pediocina PA-1/AcH de <i>P. acidilactici</i> ; las sakacinas A y P producidas por <i>Lb. Sake</i> y la mesentericina Y105 y las carnobacteriocinas BM1 y B2 de <i>C. piscicola</i> LV17
<b>Clase IIb</b>	Bacteriocinas cuya actividad biológica depende de la acción complementaria de dos péptidos distintos. En este grupo se incluyen la lactococina M y la lactococina, producidas por cepas de <i>L. lactis</i> . Otros ejemplos son la lactacina F y la plantaricina S, sintetizadas por <i>Lb. johnsonii</i> y <i>Lb. plantarum</i> , respectivamente
<b>Clase IIc</b>	Este grupo tiene, hasta el momento, un único representante: la lactococina B. Su actividad biológica depende del estado reducido de un residuo de cisteína al igual que ocurre con ciertas toxinas tiol-activadas.
	Incluye todas aquellas bacteriocinas que no cumplen alguno de los

<b>Clase IId</b>	requisitos exigidos en los grupos anteriores como, por citar algún ejemplo, la diplococina/lactococina A producidas por <i>L. lactis</i> , la carnobacteriocina A y la piscicolina 61, ambas producidas por <i>C. piscicola</i> , y la lactacina B sintetizada por <i>Lb. acidophilus</i> (Abee <i>et al.</i> , 1994).
------------------	--

**Tabla 3.** En la tabla 3 se presentan bacteriocinas de clase III y clase IV

<b>No lantibióticos (Clase III)</b>
Proteínas de más de 15 kDa que están constituidas exclusivamente por aminoácidos no modificados y son sensibles al calor. La helveticina J es la principal representante de este grupo, en el que también se incluyen la acidofilucina A, las lactinas A y B y la caseicina 80 todas ellas producidas por cepas de <i>Lactobacillus spp.</i>
<b>Bacteriocinas mixtas (Clase IV)</b>
Asociada a la porción peptídica, un componente glucídico o lipídico esencial para su actividad biológica. Como ejemplo de bacteriocinas con fracciones glucídicas podemos citar a la leucocina S (Sablón <i>et al.</i> , 2000).

#### 4.5 PRODUCCIÓN, BIOSÍNTESIS Y SECRECIÓN

La producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida (Van der Meer *et al.*, 1994).

Las bacteriocinas se sintetizan en los ribosomas a partir de transcritos procedentes de la expresión del correspondiente gen estructural y se traducen como prepeptidos inactivos con una extensión aminoterminal de 24 a 30 residuos en el caso de los lantibióticos o más corta (18-24 residuos) en las bacteriocinas no lantibióticos.

La secuencia líder de las bacteriocinas no exhiben habitualmente las características propias de los péptidos señal involucrados en los procesos de secreción. El péptido líder actúa como sistema protector manteniendo la bacteriocina inactiva en el interior de la célula productora. No obstante, al menos en el caso de la nisina, su presencia es necesaria para que ocurra una biosíntesis correcta siendo, probablemente, reconocido por las proteínas de modificación y transporte.

La secreción de las bacteriocinas a través de la membrana citoplasmática se produce por la actividad de transportadores específicos de tipo ABC. Estos complejos proteicos presentan dos dominios claramente diferenciados:

- **1)** dominio de unión a ATP en el extremo carboxilo, donde se genera la energía necesaria para el transporte mediante la hidrólisis de ATP.
- **2)** región hidrofóbica e integrada en la membrana en el extremo amino que reconoce y transporta el sustrato.

Los transportadores ABC de las bacteriocinas de la clase II contienen, además, un

dominio con actividad proteolítica en su región amino que reconoce específicamente la secuencia consenso Gly-2-Gly-1. Por lo tanto, estos transportadores tienen una doble función: translocar la bacteriocina al exterior y actuar como peptidasas específicas. En el caso de la nisina y otros lantibióticos, sus transportadores ABC (LanT) carecen de este dominio proteolítico (Van der Meer *et al.*, 1994).

## **4. 6 MODO DE ACCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS**

### **4.6.1 Espectro de inhibición**

Dentro de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas se pueden distinguir 2 grandes grupos:

- **1)** Activas frente a cepas o especies relacionadas (lactococinas A, B, M y G, lactacina B, helveticina J.
- **2)** Inhiben un rango mucho más amplio de microorganismos, entre los que se incluyen patógenos y alterantes de alimentos Gram positivos (nisina, pediocinas, lactacina F).

Hasta la fecha no se ha descrito ninguna bacteriocina de bacterias lácticas activas frente a microorganismos Gram negativos, excepto en aquellos casos en los que la integridad de la membrana externa ha sido previamente dañada por tratamiento con agentes quelantes (EDTA) o por choque osmótico.

Los lantibióticos actúan sobre células vegetativas y también inhiben la germinación de esporas. En el primer caso, como se describirá posteriormente, forman canales iónicos en la membrana plasmática; en el segundo, modifican los grupos sulfhidrilo presentes en la envuelta de la spora actuando, probablemente, los residuos deshidratados como aceptores de los electrones.

Estudios con péptidos mutantes de nisina y subtilina, en los que la dehidroalanina en la posición 5 había sido sustituida por alanina, han confirmado esta hipótesis, ya que pierden su actividad antimicrobiana frente a las esporas germinantes pero no frente a las células en crecimiento activo (Ojcius y Young, 1991).

### **4.6.2 Modo de acción**

El blanco primario de acción de las bacteriocinas parece ser la membrana plasmática, estas alteran la permeabilidad selectiva de la membrana de las células vegetativas sensibles, provocando la inmediata e inespecífica liberación de iones, compuestos de bajo peso molecular y algo más tarde del ATP intracelular. Sin embargo, algunas bacteriocinas sólo son activas frente a células enteras y/o vesículas derivadas de las mismas, por lo que sí parecen necesitar un receptor localizado en la membrana o en la pared celular (Venema *et al.*, 1993).

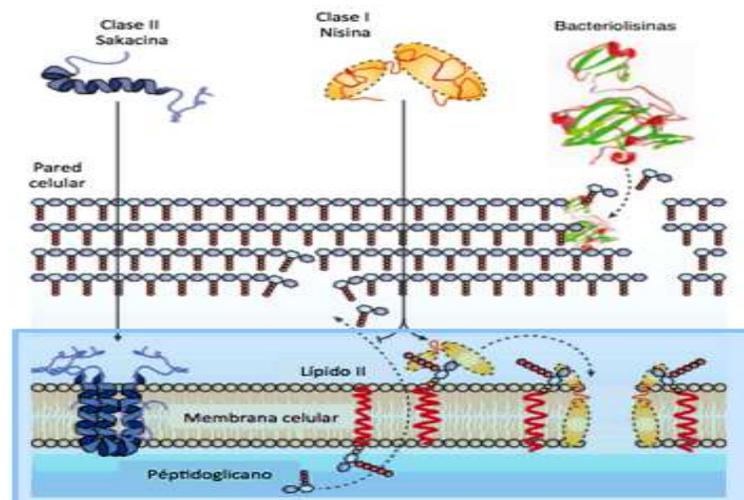
La hipótesis más aceptada sobre cómo las bacteriocinas desestabilizan las membranas es que, en función de su carácter catiónico, éstas serían inicialmente atraídas

electrostaticamente por la superficie celular, las bacteriocinas se adsorben inespecíficamente a células sensibles, a resistentes y a las propias células productoras.

Unas de las alteraciones ocasionadas en la membrana citoplasmática es la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza protón motriz necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácido nucleicos lo que supone la muerte celular.

Además las bacteriocinas pueden formar láminas  $\beta$  y hélices  $\alpha$  anfipáticas, motivos estructurales asociados a proteínas que interactúan con la membrana plasmática y que abren poros en la misma. En general, los poros son inespecíficos y permiten la salida de cualquier soluto intracitoplasmático, únicamente limitado por el tamaño. No obstante, en algunas ocasiones, como ocurre con la lactococina G, el poro generado es específico para iones  $K^+$  (Venema *et al.*, 1994).

La siguiente imagen muestra los diferentes modos de acción de las bacteriocinas



**Imagen 1.** Modo de acción de los lantibióticos (clase I), no-lantibioticoa (clase II) y bacteriolisinas (clase III) (Adaptado de Cotter *et al.*, 2005).

### 4.6.3 Resistencia e inmunidad

Las bacterias sensibles pueden desarrollar diversos mecanismos de resistencia frente a la acción de las bacteriocinas. Así, para la nisina se han identificado dos fenotipos de resistencia. El primero probablemente se basa en la expresión de nisinasa, una dehidroreductasa que inactiva uno de los residuos deshidratados de la nisina y de la subtilina, esta enzima se encuentra codificado en un plásmido movilizable. El fenotipo Nism, sin embargo, parece estar provocado por una alteración en la membrana plasmática de las células sensibles. Se ha sugerido además, que la composición de la pared celular de las bacterias Gram positivas podría ejercer un papel protector, al igual que ocurre con la membrana externa en las Gram negativas. Finalmente, otro mecanismo de resistencia podría deberse a la pérdida del receptor específico.

Por otro lado, las bacterias productoras de bacteriocinas han de desarrollar mecanismos de inmunidad que eviten su suicidio, particularmente en aquellos casos en los que la bacteriocina no precisa de receptores específicos para alcanzar su blanco de acción. Los mecanismos de inmunidad presentes en las células productoras no se conocen en detalle. En la mayor parte de los casos, a partir de datos genéticos, se asume que la inmunidad se debe a una proteína, probablemente asociada a la membrana y codificada por un gen que forma parte del mismo operón que la bacteriocina. Hasta la fecha se han purificado las proteínas de inmunidad de la lactococina A -LciA- y de la carnobacteriocina B2 -CiB2. Por homología con las proteínas de inmunidad de las colicinas, se ha especulado que podrían interaccionar, bien con la bacteriocina evitando su agregación y/o la inserción en la membrana, o bien bloqueando el poro una vez formado. En el caso de la nisina es probable que la inmunidad no sólo se deba a la actividad de la lipoproteína de inmunidad (NisI). También parece estar implicado un sistema de transporte tipo ABC, constituido por dos proteínas de membrana (NisEG) y otra citoplasmática (NisF), que captaría la nisina adsorbida en la membrana y actuaría transportándola hacia el exterior o hacia el citoplasma celular para su degradación. En cuanto a las bacteriocinas no lantibióticas han evidenciado que la proteína de inmunidad para la lactococina A (LciA) se encuentra asociada a la membrana e interacciona con el receptor de la lactococina A y con la propia bacteriocina (Mora y García, 2007).

## 4.7 UTILIDAD DE LAS BACTERIOCINAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

La necesidad de ofrecer alimentos “frescos” mínimamente procesados y el creciente rechazo del consumidor actual hacia los aditivos químicos han llevado a la industria alimentaria a reconsiderar el potencial antimicrobiano de las bacterias lácticas como una nueva estrategia de conservación (Stoffels *et al.*, 1992). De todas las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas, las bacteriocinas aparecen como las más adecuadas desde un punto de vista tecnológico para ser utilizadas como conservantes de grado alimentario. En principio, su naturaleza peptídica permite la degradación por las enzimas digestivas, resultando así presuntamente inocuas para el consumidor, y por último, sus propiedades fisicoquímicas las hacen resistentes a los tratamientos térmicos y cambios de pH que sufren los alimentos durante su fabricación y almacenamiento y, además, su pequeño tamaño permite la difusión en sistemas semisólidos, propios de la mayoría de los productos alimentarios. Adicionalmente, las bacterias lácticas ofrecen la posibilidad de producir las bacteriocinas in situ durante el proceso de fabricación. De hecho, se ha demostrado que muchos de los cultivos

iniciadores utilizados en sistemas alimentarios producen bacteriocinas. Por lo tanto, se podría evitar la adición directa de una preparación pura de la bacteriocina, que implicaría un mayor gasto económico. La inclusión de cepas bacteriocinogénicas en los cultivos iniciadores puede realizarse siguiendo dos estrategias diferentes: 1) utilizar la cepa productora como cultivo iniciador puro o bien, 2) como cultivo iniciador mixto, combinando la cepa productora con una segunda especie microbiana resistente a la bacteriocina y responsable, al menos en parte, de la fermentación (Mora y García, 2007).

#### **4.8 REFERENTES ACTUALES**

Con el fin de observar el impacto de esta tecnología sobre la calidad alimentaria en Latinoamérica, se desarrolló una breve búsqueda en la cual se evidencia el efecto y avance actual; pudiendo encontrar que existe un interés amplio en el cual podemos referenciar, en conjunto el aporte y aprovechamiento del potencial bacteriocinogénico, los trabajos de Sánchez (2005) titulado: Potencial biotecnológico de bacterias lácticas silvestres en productos lácteos fermentados: actividad metabólica y producción de exopolisacáridos; igualmente León & Pérez (2005) evaluaron el efecto de bacterias ácido lácticas termoresistentes en salchichas cocidas. Por su parte Rodríguez (2005) exploró la producción biotecnológica de ácido láctico. Por otro, lado Neries (2006) evaluó la capacidad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de productos lácteos. Mora & García (2007) probaron la susceptibilidad de bacterias ácido lácticas frente a diversos antibióticos; Vásquez *et al.*, (2008) aplicaron sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne; el cual es una revisión que abarca aspectos de la biopreservación en alimentos y específicamente en carne y productos cárnicos, susceptibles de alteración y ataques de diversos microorganismos. Ortiz (2013) realizó la identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo. Abad y Llenque, (2014) evaluaron el efecto del sobrenadante del cultivo de *Bifidobacterium animalis lactis* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE LECHE

Para la realización del presente trabajo se procesaron 30 muestras de leche cruda, obtenidas directamente de tres fincas productoras del departamento Norte de Santander (Colombia), tal como se describe en la siguiente tabla.

**Tabla 4.** Obtención de las muestras de leche

ZONA	SECTOR	FINCA	N° MUESTRAS
1	Monte dentro	La Esperanza	10
1	Monte dentro	La Colonia	10
2	Ragonvalia	El Suárez	10

Las muestras se colectaron en recipientes estériles y se mantuvieron bajo condiciones de refrigeración ( $4 + 2$  °C), durante el transporte y almacenamiento hasta ser procesadas (4 horas).



**Imagen 2.** Fincas productoras de leche cruda. **a)** Finca El Suárez, **b)** Finca La Esperanza, **c)** Finca La Colonia. Fuente: **Google Earth.**

## **5.2 MANEJO DE LAS MUESTRAS**

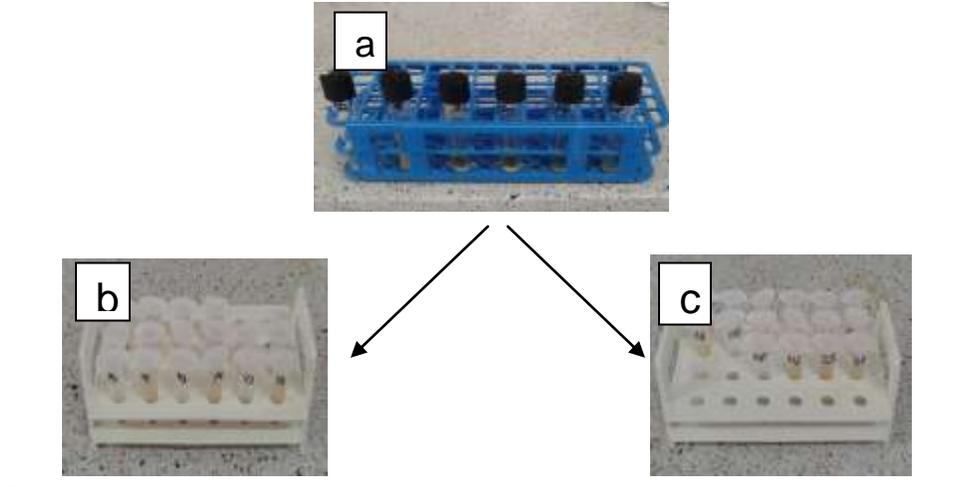
Las muestras de leche recolectadas se homogenizaron con el fin de obtener dos grupos principales, que se distribuyeron de la siguiente manera: grupo **1.** 1000ml del homogenizado correspondiente a 500ml de la finca La Esperanza y 500ml de la finca La Colonia; grupo **2.** 1000ml correspondiente a la mezcla de las muestras de la finca el Suárez.

## **5.3 AISLAMIENTO DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

A partir de los grupos de las muestras de leche cruda se realizaron tres diluciones decimales seriadas, en solución salina (NaCl 0,85%), posteriormente se sembraron de la última dilución en superficie sobre agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe - Merck). La siembra se incubó a 32° C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis. Del crecimiento obtenido, se aislaron cinco morfotipos coloniales que se presentaban en mayor proporción en las muestras para los diferentes grupos analizados, por lo que se decidió purificar estas cepas, repitiendo las condiciones de incubación tanto para medios y tiempo. Los cultivos obtenidos se clasificaron según la tinción de Gram y el resultado de la prueba de catalasa. Separando las muestras de las bacterias que se ajustaron a los criterios de selección (cocos, bacilos, cocobacilos Gram positivos y catalasa negativos), se almacenaron congeladas -18°C en caldo MRS con glicerol al 20%. La identificación de las cepas se realizó de acuerdo a los criterios establecidos por Omafuvbe y Enyioha (2011). Respecto a las características generales de bacterias lácticas (Hernández y Dubón, 1992).

## **5.4 PRODUCCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS**

De los morfotipos coloniales aislados y purificados, que fueron codificados como M1, M2, M3, M4 Y M5, se realizaron cultivos en tubos con caldo MRS teniendo en cuenta que las bacteriocinas son metabolitos secundarios, la incubación a 32°C bajo anaerobiosis se llevó hasta las 72 horas. El sobrenadante por reposo de cada medio líquido se dividió en dos fracciones en tubos estériles para los ensayos antibacterianos. Un mililitro para la primera fracción que fue evaluada como extracto crudo y dos mililitros para la segunda fracción la cual se centrifugó a 10000rpm/4°C durante 10 minutos recuperando un mililitro del centrifugado evaluado como extracto puro como se muestra en la Imagen 3. Los extractos se trataron con NaOH 1M, para ajustar el pH a 6.5 (Zapata *et al.*, 2009).



**Imagen 3.** División del sobrenadante en tubos estériles **a)** Cultivos en caldo MRS; **b)** extracto crudo ; **c)** extracto purificado. Fuente. Autor

## 5.5 DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LAS BACTERIOCINAS

Para evaluar la actividad bactericida de los extractos (bacteriocinas presentes), se utilizó el método de difusión en agar empleando como medio de prueba MH (Mueller-Hinton-Merck) (Juan, 2000). Como microorganismos blancos se utilizaron *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Listeria monocytogenes* ATCC7644, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC17036, suministradas por el cepario de la Universidad de Pamplona. Las cepas bacterianas se inocularon en caldo BHI y se incubaron hasta alcanzar una población aproximada de  $1.5 \times 10^8$  bacteria/ml correspondiente al patrón 0.5 de la escala McFarland o su valor en densidad óptica por espectrofotometría a 600nm (0.137). (Icontec, 2000) Posteriormente, a partir de cada cepa se sembraron masivamente en las cajas con agar MH ubicando en ellas sobre las siembras los discos humedecidos de cada extracto. Estas cajas se incubaron a 32°C durante 24 horas. La actividad de las bacteriocinas se determinó por, la aparición de zonas de inhibición alrededor de los discos, considerándose dos milímetros como medida mínima de inhibición (Juan, 2000).

## 5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se empleó un diseño experimental completamente aleatorio. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y la evaluación estadística se realizó mediante un análisis de índice de variación para medidas de las medias individuales y por agrupaciones para finalmente establecer su análisis de varianza "ANOVA" mediante la herramienta Excel para Microsoft Office 2011 empleando la función análisis de varianza para dos grupos con varias repeticiones.

**Estableciendo como criterios de prueba lo siguiente:**

**Hipótesis alterna (Ha).** Los resultados de las inhibiciones para los microorganismos de prueba evaluados frente a distintos extractos y sus tratamientos, difieren significativamente del promedio.

**Hipótesis nula (Ho).** Las diferencias de los resultados de inhibición para los microorganismos de prueba en relación con los extractos y sus tratamientos se deben al azar, por lo que no hay diferencias significativas y corresponden al mismo comportamiento.

**Nivel de significación.**

Para todo valor estadístico de prueba  $F$  igual o mayor al valor crítico de significancia ( $FC$ ) se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_a$ .

**Zona de rechazo.**

Para todo valor estadístico de prueba  $F$  menor al valor crítico de significancia ( $FC$ ) se acepta  $H_0$  y se Rechaza  $H_a$ .

## 6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

**Tabla 5 Cronograma y descripción de actividades**

ACTIVIDAD SEMANAS	AGOSTO				SEPTIEMBRE				OCTUBRE				NOVIEMBRE				DICIEMBRE			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
I	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
II					■															
III	■				■				■				■				■			
IV	■	■			■	■			■	■			■	■			■	■		
V			■				■				■				■				■	
VI			■	■			■	■			■	■			■	■			■	■
VII					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
VIII														■	■					
VIII																	■			

**Descripción de actividades:**

- I. Revisión bibliográfica
- II. Inicio de pasantía
- III. Obtención de las muestras de leche
- IV. Aislamiento de las bacterias ácido lácticas
- V. Producción de las bacteriocinas
- VI. Detección de la actividad inhibitoria de las bacteriocinas
- VII. Análisis de los resultados obtenidos
- VIII. Elaboración del documento final
- VIII. Sustentación del trabajo final

## 7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 7.1 MICROORGANISMOS SELECCIONADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS

Con el fin de determinar el potencial bacteriocinogénico de BAL, se seleccionaron los microorganismos aislados en agar MRS y que presentaron morfología de cocos, bacilos, cocobacilos y coloración Gram positivos, como se muestra la Tabla 6.

**Tabla 6.** Características morfológicas y tinción Gram para los diferentes microorganismos aislados en agar MRS.

Microorganismo	Morfología	Tinción Gram	Microscopia 100x
M1	Cocos	Positivos	
M2	Cocobacilos	Positivos	
M3	Cocobacilos	Positivos	
M4	Bacilos	Positivos	
M5	Bacilos	Positivos	

**Fuente: Autor**

En la anterior tabla podemos observar que las BAL son un grupo muy heterogéneo debido a su característica morfológica y tinción, según Moreira (1993) quien menciona que este grupo de bacterias probablemente sea el más abundantemente difundida en la naturaleza.

## 7.2 PERFIL BIOQUÍMICO COMPARATIVO PARA LA IDENTIFICACION DE LAS CEPAS AISLADAS DE BAL

Para la identificación de las cepas de BAL se utilizaron 17 pruebas bioquímicas para construir el perfil fisiológico el cual fue comparado con resultados de referencia como lo muestra la siguiente tabla.

**Tabla 7.** Resultados bioquímicos comparativos para especies de *Enterococcus* spp y *Streptococcus* spp.

Prueba	Perfil Práctico (M1)	<i>E. faecium</i>	<i>S. bovis</i>	<i>E. faecalis</i>
Catalasa	-	-	-	-
Resistencia bilis 40%	+	+	+	+
Hidrólisis de Arginina	-	+	-	+
Producción de Gas	-	+	+	-
Rojo de Metilo	-	+	-	-
Reducción de Nitrato	-	+	+	-
Crecimiento a 15°C	+	-	-	+
Crecimiento a 45°C	+	+	-	+
Crecimiento a pH 9.6	+	-	-	+
crecimiento a 6.5%NaCl	+	+	-	+
Sorbitol	-	-	-	-
Manitol	-	+	+	-
Maltosa	+	-	+	+
Lactosa	-	-	-	-
Raffinosa	-	+	+	-
Sacarosa	+	+	-	+
Hemolisis (sangre humana)	B	α, β, γ	α, γ	α, β, γ
%afinidad (17 pruebas)	17	8/17*100= 47.05%	6/17*100= 35.29%	16/17*100= 94.1%

\*= Valores de referencia Según Luretta Duran ENTEROCOCOS: procedimientos de aislamiento e identificación en el laboratorio

+: Positivo, -: Negativo, α: Hemolisis Parcial, B: Hemolíticos, γ: No Hemolíticos

M1: Identificado como posible *Enterococcus faecalis* con un 94.1% de afinidad

En la tabla 7 se presentan los Resultados bioquímicos comparados en su valor porcentual con especies de *Enterococcus* spp.y *Streptococcus* spp.; donde se evidenció que el perfil bioquímico que más se ajusta o muestra mayor afinidad corresponde a *Enterococcus faecalis* con un 94.1% y que en el mismo procedimiento, se descarta que sea otro microorganismo pues su número de similitud es muy bajo (<50%).

Los estudios para construir el perfil fisiológico para la cepas M2 y M3 se constituyó de 17 pruebas, cotejadas con especies de *Leuconostoc* spp. y *Lactococcus* spp. de acuerdo a la morfología celular presentada.

**Tabla 8.** Resultados bioquímicos comparativos para especies de *Leuconostoc* spp y *Lactococcus* spp.

Prueba	Perfil Práctico (M2)	Perfil Práctico (M3)	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. reffinolactis</i>	<i>L. lactis</i>
Catalasa	-	-	-	-	-
Resistencia bilis 40%	-	-	-	-	-
Hidrólisis de Arginina	-	-	-	+	+
Producción de Gas	+	+	+	-	-
Rojo de Metilo	-	+	+	-	-
Reducción de Nitrato	-	-	-	-	-
Crecimiento a 15°C	+	-	+	+	+
Crecimiento a 45°C	+	+	+	-	-
Crecimiento a pH 9.6	+	+	+	-	-
Crecimiento a 6.5%NaCl	+	+	+	-	-
Sorbitol	-	-	-	+	+
Manitol	-	-	-	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	+	+
Rafinosa	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+
Hemolisis (sangre humana)	A	α	α	α	α
%afinidad M2(17prueba)	17	17	16/17*100= 94.1%	10/17*100= 58.8%	10/17*100= 58.8%
%afinidad M3(17prueba)	17	17	17/17*100= 100%	8/17*100= 47.05%	8/17*100= 47.05%

\*= Valores de referencia Según Omafuvbe, B. y Enyioha, L. 2011

+: Positivo, -: Negativo, α: Hemolisis Parcial

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla 8, una vez cotejados los perfiles bioquímicos prácticos respecto a los teóricos, se evidenció que el perfil bioquímico que más se ajusta o muestra mayor afinidad para M2 y M3 corresponde *L. mesenteroides* con un 94.1 y 100%, respectivamente.

La identificación bioquímica para la cepas M4 y M5, cotejadas para los perfiles de *Lactobacillus* spp. de acuerdo a sus características de crecimiento, arrojaron el siguiente resultado.

**Tabla 9.** Resultados bioquímicos comparativos para especies de *Lactobacillus* spp.

Prueba	Perfil Practico (M4)	Perfil Practico (M5)	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. casei</i>
Catalasa	-	-	-	-	-
Hidrólisis de Arginina	+	+	+	+	-
Producción de Gas	-	+	-	+	-
Rojo de Metilo	+	+	+	+	-
Reducción de Nitrato	-	-	-	-	-
Crecimiento a 15°C	-	-	-	-	+
Crecimiento a 45°C	-	+	-	+	-
Crecimiento a pH 9.6	+	+	+	+	+
Crecimiento a 6.5%NaCl	-	+	-	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	+
Manitol	-	-	-	-	+
Maltosa	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	+	-
Rafinosa	-	+	-	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+
Hemólisis (sangre humana)	γ	γ	α, γ	α, γ	α, γ
%afinidad M4(16 pruebas)	16	16	$16/16 \cdot 100 = 100\%$	$11/16 \cdot 100 = 68.75\%$	$9/16 \cdot 100 = 56.25\%$
%afinidad M5 (16 pruebas)	16	16	$12/16 \cdot 100 = 75\%$	$15/16 \cdot 100 = 93.75\%$	$9/16 \cdot 100 = 56.25\%$

\*= Valores de referencia Según Omafuvbe, y Enyioha, L. (2011)

+ : Positivo, - : Negativo, α: Hemólisis Parcial, γ: No Hemolíticos

M4: *Lactobacillus acidophilus* con un 100% de afinidad , M5: *Lactobacillus fermentum* 93.75%

En la Tabla 9 Resultados bioquímicos comparativos para especies de *Lactobacillus* spp; se demuestra que los perfiles bioquímicos que muestran mayor afinidad corresponden para M4 con un 100% *Lactobacillus acidophilus* y (M5) con un 93.75% para *Lactobacillus fermentum*.

### 7.3 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS SOBRE ALGUNAS BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS

Desviación estándar y promedios de cada efecto inhibitorio evaluado para los diferentes extractos crudos.

**Tabla 10.** Desviación estándar y promedios de cada efecto inhibitorio (mm)

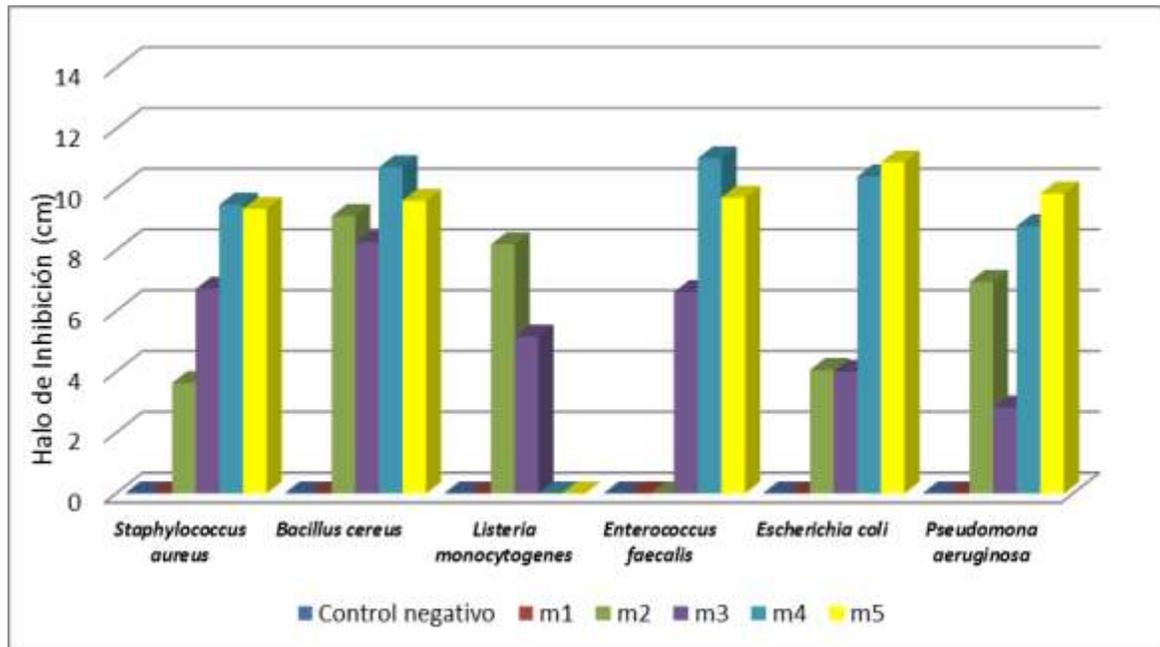
	S	d	B	d	L	d	E	d	E	d	P	d
	<i>aureus</i>		<i>cereus</i>		<i>monocitogenes</i>		<i>faecalis</i>		<i>coli</i>		<i>auriginosa</i>	
CONTROL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M2	3,6	0,2	9,1	2,2	8,2	0,7	0	0	4,0	0,7	6,9	0,6
M3	6,7	0,1	8,2	1,3	5,1	1,4	6,6	0,3	4	0,02	2,8	0,3
M4	9,5	0,5	10,7	8,8	0	0	11,0	2,0	10,4	0,7	8,8	1,0
M5	9,3	1,2	9,6	4,0	0	0	9,7	3,1	10,9	5,4	9,8	5,3

d: Desviación Estándar

En la anterior tabla se observa que la mayoría de los promedios de halo de inhibición se encuentran por encima de dos milímetro sobrepasando la medida mínima de inhibición bajo el método de difusión en agar tal como lo ha propuesto Juan (2000).

Cabe resaltar que los promedios de halos de inhibición más altos los presentan M4 con un promedio de 11,0 para *Enterococcus faecalis* y M5 con un promedio de 10,9 para *Escherichia coli*. Por el contrario, M1 no presentó inhibición alguna y M3 presentó un promedio de 2,8 para *Pseudomonas aeruginosa* siendo el promedio de halo de inhibición más bajo encontrado.

La siguiente Grafica muestra los promedios obtenidos del efecto inhibitorio de cada extracto crudo evaluado de microorganismos BAL.



**Gráfica 1.** Evaluación de extractos crudos obtenidos de microorganismos BAL sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, bajo la técnica de antibiograma en placa.

En la Gráfica 1 se observa que los extractos que presentan mayor inhibición frente a microorganismos evaluados son M4 y M5, evidenciando la eliminación de bacterias Gram positivas y Gram negativas mostrando halos de inhibición de nueve milímetros hasta once milímetros. Estos resultados difieren con lo mencionado por Vásquez *et al.* (2009) en el cual no se conocían bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas activas naturalmente frente a bacterias Gram negativas.

Para el caso de M1 no presentó ninguna inhibición sobre los microorganismos evaluados, mientras que M2 y M3 presentaron actividad bactericida en todos los microorganismos evaluados con un halo de inhibición no mayor a ocho milímetros. Este resultado muestra una actividad bactericida sin ningún tipo de tratamiento previo como menciona Rodríguez y Torres (2006), quienes afirman que las bacterias Gram negativas son tratadas inicialmente con agentes quelantes como el EDTA que permiten la entrada de las bacteriocinas debido a la alta presión hidrostática o alguna otra lesión que destruye la pared celular hasta lograr el efecto antibacterial.

En la Tabla 11 se presenta la desviación estándar y promedios de cada efecto inhibitorio evaluado para los diferentes extractos puros.

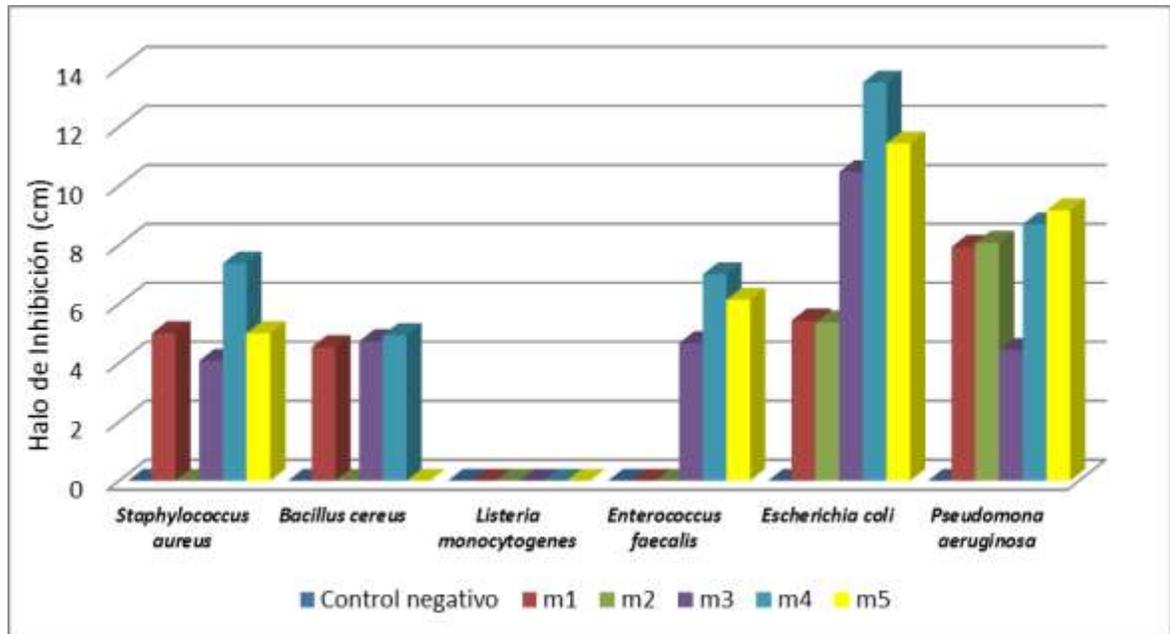
**Tabla 11.** Desviación estándar y promedios de cada efecto inhibitorio

	S	d	B	d	L	d	E	d	E	d	P	d
	<i>aureus</i>		<i>cereus</i>		<i>monocitogenes</i>		<i>faecalis</i>		<i>coli</i>		<i>auriginosa</i>	
CONTROL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M1	5	0,08	4,5	0,6	0	0	0	0,72	5,4	0,6	7,9	0,3
M2	0	0	0	0	8,2	0,7	0	0	5,3	0,8	8,0	0,1
M3	4,0	0,6	4,7	1,1	5,1	1,4	4,6	0,7	10,4	3,3	4,4	0,5
M4	7,3	0,6	4,9	0,3	0	0	7	0,3	13,5	19,5	8,7	0,7
M5	5	0,3	0	0	0	0	6,1	2,1	11,4	3,9	9,1	2,1

d: Desviación Estándar

Se observa que los promedios más altos de inhibición son para *Escherichia coli* con 13,5, 11,4 y 10,4 para los microorganismos M4, M5 y M3 respectivamente. Se observa además que el valor promedio más bajo se da para *Staphylococcus aureus* con un valor de inhibición de 4,0 para el microorganismo M3.

De los extractos purificados obtenidos de cada microorganismo BAL aislado, se refieren los siguientes resultados:



**Gráfica 2.** Evaluación de extractos puros obtenidos de microorganismos BAL sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, bajo la técnica de antibiograma en placa.

En esta gráfica se observa que al centrifugar los extractos la actividad bactericida disminuye para la mayoría de los mismos al compararse con los extractos crudos evaluados en la gráfica 1, lo cual se evidencia notoriamente para el caso de *Listeria monocytogenes*. La disminución de esta actividad puede deberse a la precipitación de las posibles bacteriocinas presentes en los extractos debido a la centrifugación lo cual influye sobre la eficacia de la actividad (López *et al.*, 2008). Sin embargo para *Escherichia coli* no presentaron cambios significativos en comparación a los extractos crudos mientras que para M1 se evidencia actividad bactericida, lo cual no se evidenció en la gráfica 1 evaluados como extracto crudo.

La actividad bactericida encontrada para M1 se explica debido a la técnica de centrifugación empleada. Esta técnica de separación es utilizada para aislar o concentrar partículas suspendidas en un medio líquido. En este sentido, concentrar los extractos puros de M1 posiblemente tuvo un efecto sobre la actividad bactericida haciéndola mayor, tal y como lo menciona López *et al.*, (2008), en donde el espectro de inhibición de las bacteriocinas o sus extractos puede verse afectado o favorecido según el tratamiento al que son sometidos como concentración del sobrenadante.

## 7.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

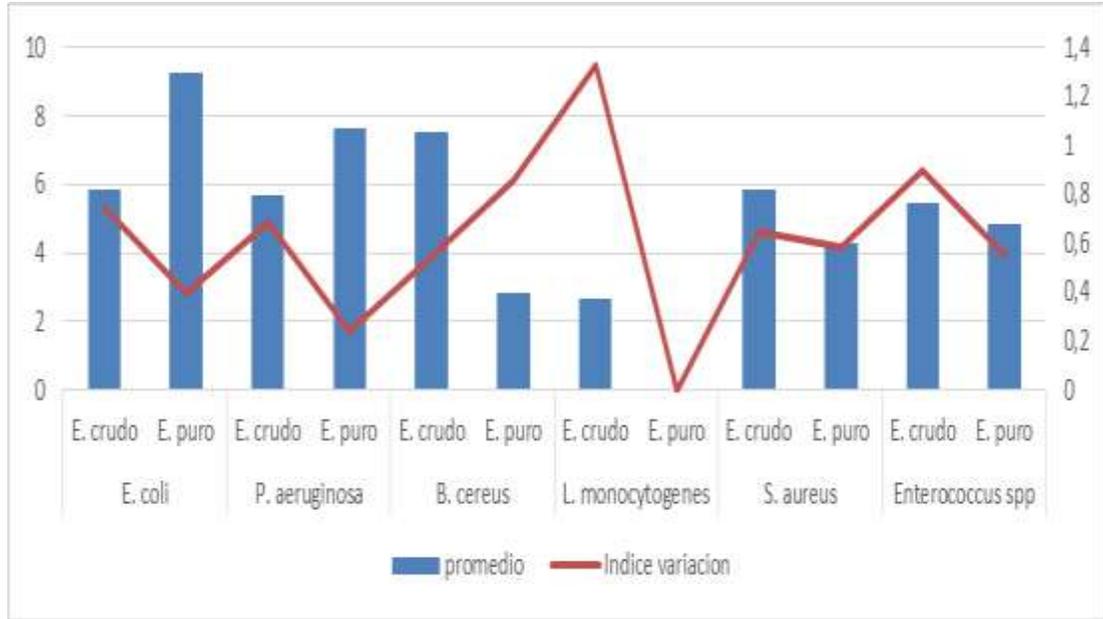
A partir de los resultados obtenidos para cada extracto y organismo de prueba, se determinó su promedio general para todas las pruebas y su desviación, tanto para extracto crudo como para extracto puro; de la interacción de los mismos se estableció su índice de variación para establecer si los comportamientos inhibitorios no presentan diferencias entre grupos de prueba, obteniendo la siguiente tabla.

**Tabla 12.** Índice de variación para los extractos crudos y puros

		Promedio(mm)	Índice variación	Mejores Interacciones
<i>E. coli</i>	E. crudo	5,88	0,745	
	E. puro	9,24	0,398	x
<i>P. aeruginosa</i>	E. crudo	5,69	0,688	
	E. puro	7,66	0,236	x
<i>B. cereus</i>	E. crudo	7,55	0,548	
	E. puro	2,84	0,857	
<i>L. monocytogenes</i>	E. crudo	2,67	1,329	
	E. puro	0,00	0,000	
<i>S. aureus</i>	E. crudo	5,84	0,644	
	E. puro	4,28	0,586	
<i>Enterococcus spp</i>	E. crudo	5,48	0,894	
	E. puro	4,84	0,553	

Tal como se puede apreciar, los resultados presentan variaciones tanto para las interacciones extracto – tipo – microorganismo; pero, entre ellos los índices más bajos son asociados a aquellos que presentan mayores halos de inhibición, correspondientes a *E. coli* y para *P.aeruginosa*; esto permite determinar que el efecto inhibitorio para estos microorganismos es el más alto respecto al grupo y este varía en menor proporción siempre y cuando se emplee el extracto puro.

En la Gráfica 3 se presentan el índice de variación para los extractos crudos y puros



**Gráfica 3.** Índice de variación para los extractos crudo y puro

Ahora, de acuerdo al mismo análisis se puede apreciar, que la menor inhibición en las pruebas corresponde a **Listeria monocytogenes** donde su comportamiento cambia de acuerdo al extracto, presentando el mayor índice de variación para el extracto crudo, por lo que se puede establecer que su comportamiento varía dependiendo del origen del extracto.

**Tabla 13.** Análisis de varianza – **E. coli** – Tipo de Extracto - Tratamiento

ANÁLISIS DE VARIANZA – **E. coli** – Tipo de Extracto - Tratamiento

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio cuadrados	F	Prob.	F crítico
Extracto	384,45	4	96,11	54,67	1,7E-10	2,86
Tratamiento	84,67	1	84,67	48,16	9,7E-07	4,35
Interacción	39,40	4	9,85	5,60	0,0034	2,86
Dentro del grupo	35,16	20	1,758			
Total	543,69	29				

Alfa = 0.05; GL = grados de libertad; Prob. = Probabilidad.

Los efectos de inhibición para **E. coli** son explicados tanto para el origen del extracto como el tratamiento del mismo, donde los valores de significancia (F) para estas interacciones son mayores al límite crítico de probabilidad (Fc), por lo que se explica que los resultados son diferentes y dependen del extracto y su tratamiento.

**Tabla 14.** Análisis de varianza – *L monocytogenes* – Tipo de Extracto - Tratamiento

ANÁLISIS DE VARIANZA – *Listeria monocytogenes* – Origen Extracto – Tratamiento.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio cuadrados	F	Prob.	F crítico
Extracto	87,30	4	21,82	197,81	8,9E-16	2,86
Tratamiento	53,60	1	53,60	485,80	1,6E-15	4,35
Interacción	87,30	4	21,82	197,81	8,9E-16	2,86
Dentro del grupo	2,20	20	0,11			
Total	230,4	29				

Alfa = 0.05; GL = grados de libertad; Prob. = Probabilidad.

Los efectos de inhibición para *Listeria monocytogenes* son explicados tanto para el origen del extracto como para el tratamiento del extracto, donde todos los valores de significancia (F) para estas interacciones son mayores al límite crítico de probabilidad (Fc), lo que se explica que los comportamientos de inhibición varían y no hay similitud entre las respuestas.

**Tabla 15.** Análisis de varianza – *B cereus* – Tipo de Extracto - Tratamiento

ANÁLISIS DE VARIANZA – *Bacillus cereus* – Origen extracto – tratamiento.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio cuadrados	F	Prob.	F crítico
Extracto	106,66	4	26,66	28,69	4,92E-08	2,86
Tratamiento	166,61	1	166,61	179,28	1,91E-11	4,35
Interacción	197,72	4	49,43	53,19	2,22E-10	2,86
Dentro del grupo	18,58	20	0,92			
Total	489,58	29				

Alfa = 0.05; GL = grados de libertad; Prob. = Probabilidad.

Para *Bacillus cereus*, los valores de significancia (F) para las pruebas y sus variables presentan resultados muy diferentes, razón por la cual su comportamiento no es el mismo frente a los extractos en relación al valor crítico de significancia para los valores esperados (Fc).

**Tabla 16.** Análisis de varianza – *P aeruginosa* – Tipo de Extracto - Tratamiento

ANÁLISIS DE VARIANZA –*Pseudomonas aeruginosa*– Origen extracto – tratamiento.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio cuadrados	F	Prob.	F crítico
Extracto	178,05	4	44,51	79,30	5,6E-12	2,86
Tratamiento	29,00	1	29,00	51,67	5,8E-07	4,35
Interacción	71,80	4	17,95	31,97	1,9E-08	2,86
Dentro del grupo	11,22	20	0,561			
Total	290,39	29				

Alfa = 0.05; GL = grados de libertad; Prob. = Probabilidad.

El comportamiento de *P. aeruginosa* frente a los diferentes extractos, es diferente y depende del tipo de extracto y su tratamiento, razón por la cual su valor de significancia (F) en todo sentido es mayor al valor crítico de aceptación (Fc)

**Tabla 17.** Análisis de varianza – *S aureus* – Tipo de Extracto - Tratamiento

ANÁLISIS DE VARIANZA –*Staphylococcus aureus* – Origen extracto – tratamiento.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio cuadrados	F	Prob.	F crítico
Extracto	198,45	4	49,61	261,58	5,8E-17	2,86
Tratamiento	18,25	1	18,25	96,23	4,3E-09	4,35
Interacción	85,14	4	21,28	112,22	2,1E-13	2,86
Dentro del grupo	3,7933	20	0,189			
Total	305,64	29				

Alfa = 0.05; GL = grados de libertad; Prob. = Probabilidad.

Existen diferencias en los efectos de inhibición sobre *Staphylococcus aureus*, que está influenciado por el origen del extracto y su tratamiento.

**Tabla 18.** Análisis de varianza – *E faecalis* – Tipo de Extracto - Tratamiento

ANÁLISIS DE VARIANZA – *Enterococcus faecalis* – Origen extracto - tratamiento

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio cuadrados	F	Prob.	F crítico
Extracto	318,09	4	79,52	170,28	3,8E-15	2,86
Tratamiento	3,20	1	3,20	6,85	0,0164	4,35
Interacción	108,69	4	27,17	58,18	9,8E-11	2,86
Dentro del grupo	9,34	20	0,46			
Total	439,33	29				

Alfa = 0.05; GL = grados de libertad; Prob. = Probabilidad.

Al igual que el resto de organismos de prueba, los efectos inhibitorios en *Enterococcus faecalis*, presentan diferencias significativas, las cuales están relacionadas con el proceso de evaluación asociado al extracto.

## 8. CONCLUSIONES

De las muestras de leche cruda analizadas, se identificaron cinco géneros bacterianos (*Enterococcus faecalis*; *Leuconostoc spp.*; *Lactococcus spp.*; *Lactobacillus acidophilus*; *Lactobacillus fermentum*), los cuales corresponden a las poblaciones lácticas más comunes y que se encuentran en mayor proporción en las leches obtenidas en algunas fincas productoras de los municipios de Pamplona y Ragonvalia del departamento Norte de Santander (Colombia).

La producción de metabolitos solubles durante las fases de crecimiento de estos géneros bacterianos pueden ser fácilmente obtenibles en medios de cultivo naturales (la misma leche cruda) o sintéticos (Caldo MRS), siendo el segundo más aconsejable debido a que no presenta sustancias interferentes o alterantes de las reacciones.

Los gradientes de densidad de los metabolitos producidos generan respuestas inhibitorias diferentes, esto se debe a su tamaño molecular, lo que modifica los procesos de difusión de membrana, razón por la cual los más pequeños (menor densidad) obtenidos mediante centrifugación demostraron ser más efectivos para bacterias Gram negativas mientras que los extractos completos o crudos presentaron ser más efectivos hacia las Gram positivas.

Dentro de los extractos evaluados se puede comprobar que de los diez tratamientos generados los mayores efectos inhibitorios corresponden a los aislamientos M4 y M5 asociados a los microorganismos *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus fermentum* respectivamente con un promedio general de inhibición de 5,88 y 5,69 para el tratamiento crudo 9,24 y 7,66 para el tratamiento puro.

Finalmente, se puede inferir sobre los extractos y sus resultados de inhibición, existen diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre las pruebas y estas están influenciadas por la interacción organismo productor de bacteriocina (origen) tratamiento (crudo y puro) y microorganismo de prueba, por lo que no se puede asociar un comportamiento normalizado.

## 9. RECOMENDACIONES

Se recomienda hacer una indagación más amplia en el tema de las bacteriocinas, seguir compilando e investigando sobre las bacteriocinas de una forma más específica debido a que cada bacteriocina tiene un protocolo diferente de obtención y purificación, unas características bioquímicas muy específicas de acuerdo a su especie y de esto depende el posible uso o aplicación a la cual se puede destinar.

Se recomienda realizar un procedimiento que ayude a separar las diferentes bacteriocinas producidas por las diferentes bacterias BAL mediante sus pesos moleculares.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Abad, J., llenque, L. (2014). Efecto del sobrenadante del cultivo de *Bifidobacterium animalis* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*. REBIOLEST, Revista Científica de Estudiantes, volumen 1.
2. Abee, T., Klaenhammer, L., Letellier. (1994). Kinetic studies of Lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that form poration complex in the cytoplasmic membrane. Env. Microbiol volumen 3, pp 1006-1013.
3. Beristain, B., Palou, E., y Lopez A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. Temas selectos de ingeniería de alimentos, pp 64-78.
4. Cáceres, F., Y Felipe, P. (2007) Aislamiento y caracterización Bacteriocinas producidas por *lactobacillus plantarum* LPBM10 en suero de leche. Tesis Msc Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Medellín -Colombia, p 84.
5. Cotter, P., Hill, C., y Ross, R. (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiol, volume 3, pp 777-788.
6. Do Santos, M., y Luiz, W. (1993) Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producidas por *Pediococcus* spp. 347 de origen cárnico. Tesis Doctorado Universidad complutense de Madrid Facultad de veterinaria. Departamento de Nutrición y Bromatología III, p 266.
7. EFSA Journal. (2006). Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on the safety in use of nisin produced using a modified production process as a food additive. The EFSA Journal. (EFSA, European Food Safety Authority, pp 1 - 8.
8. Eijsink,V., Skeie, M., Middelhoven, P., Brurberg, M., y Ness, I. (1998) Comparative Studies of Class IIa Bacteriocins of Lac- tic Acid Bacteria. Microbiol, volumen 64, pp 3275-328.
9. Evelia, A. taxonomía de bacterias acido láctica (capitulo 15).
10. Hernández, H., y Dubón, P. (1992). Sistemática Bacteriana, 3ª Edición.

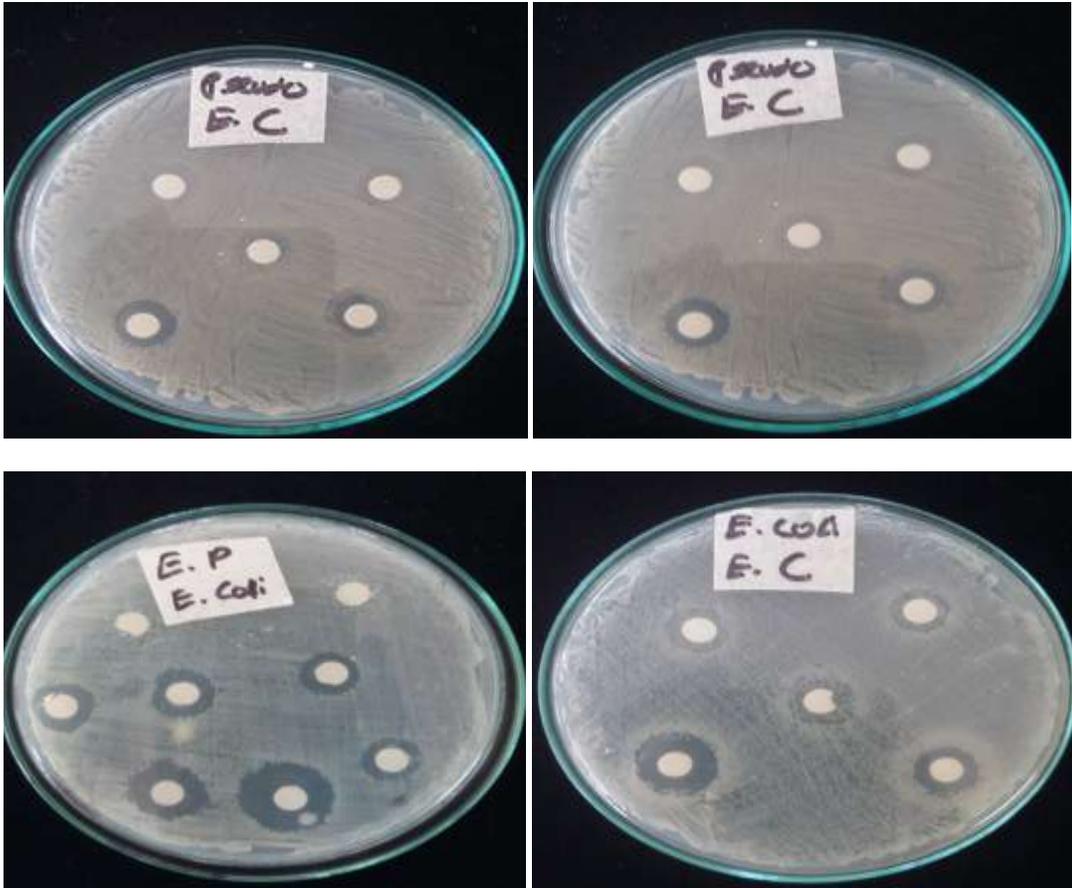
11. Hofvendahl, K., y Hägerdal, H. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb Technol*, pp (2-4), 87-107.
12. ICONTEC. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. (2000). NTC 2455. Desinfectantes. Limpiadores Líquidos. Desinfectantes para uso doméstico. Tercera actualización, pp 25-10.
13. Joerger, R. (2003) Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages, *Poult. Sci*, volume 82, pp 640-647.
14. Katikou, P., Ambrosiadis, I., Georgantelis, D., Koidis, P., Georgakis, S. (2005). Effect of *Lactobacillus* protective cultures with bacteriocin like inhibitory substances producing ability on microbiological, chemical and sensory changes during storage of refrigerated vacuum packaged sliced beef, *J. Appl Microbiol*, volume 99, pp1303-1313.
15. León, V., y Pérez, C. (2005). Efecto de bacterias ácido lácticas termoresistentes en salchichas cocidas. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, volumen 2, pp135-141.
16. McKay, L., y Baldwin, K. (1990). Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *Microbiology Reviews* volumen 87, pp 3-14.
17. Monroy, M., Castro, T., Fernández, F., y Mayorga L. (2009). Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas.
18. Montville, Y., y Chen. (1998). Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved question. *Microbiol Biotechnol*, volume 50, pp 511-519
19. Mora, N., y García, A. (2007). Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas frente a diversos antibióticos. Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del estado de Hidalgo.
20. Motta, S., y Brandelli, A., (2008) Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin like substance by *Bacillus* sp. *Microbiol Biotechnol*, volumen 24, pp 641-646.
21. Neria, A. (2006). Evaluación de la capacidad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de productos lácteos. Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del estado de Hidalgo.

22. Nes, I., Diep, D., Havarstein, L., Brurberg, M., Eijsink, V., y Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, volumen 2, pp 113-128.
23. Ojcius, D., y Young, J. (1991). Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif. *Trends in biochemical sciences*, volumen 16, pp 225–229.
24. Ortiz, M. (2013). Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos. Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del estado de Hidalgo.
25. O'Sullivan, L., Ross, R., y Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, volumen 84, pp 593-604.
26. Papagianni, M. (2003) Ribosomally synthesized peptides and antimicrobial properties: Biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol*, volumen 21, pp 465-499.
27. Picazo, J. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Procedimientos en Microbiología Clínica*.
28. Rodríguez, J., y Torres L. (2006). Proyecto de grado. Evaluación de sustancias antimicrobianas presentes en extractos obtenidos de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. Bogotá, Colombia: Universidad de la Sabana.
29. Rodríguez, S. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico. *Revista de la Asociación de Licenciados en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Galicia*, volumen 5, pp 54-65.
30. Ruiz, J., Cathcart, D., Warner, P., y Jiménez, R. (1994). Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer as starter culture in Spanish style green olive fermentations, *Environ Microbiol*, volumen 60, pp 2059-2064.
31. Sablón, E., Contreras, E., y Vandamme. (2000). Antimicrobial peptides of Lactic Acid Bacteria: Mode of Action, Genetic and Biosynthesis. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, volumen 68, pp 21-60.
32. Sánchez, J. (2005). Potencial biotecnológico de bacterias lácticas silvestres en productos lácteos fermentados: actividad metabólica y producción de exopolisacáridos. Tesis doctoral, Departamento de Biología funcional y molecular, y del Instituto de Productos lácteos de Asturias, Universidad de Oviedo.

33. Stoffels, G., Nissen, J., Gudmundmeister, A., Sletten, K., y Holo, H. (1992). Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. Applied and Environmental Microbiology, volumen 58, pp 1417-1422.
34. Svetoch, E., Eruslanov, B., Perelygin, V., Mitsevich, E., Mitsevich, I., Borzenkov, V., Levchuk, V., Svetoch, O., Kovalev, Y., Stepanshin, Y., Siragusa, N., Bruce, R., Norman, J. (2008) Diverse Antimicrobial Killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 Bacteriocin., J. Agric. Food Chem. Volume 56, pp 1942-1948.
35. Van der Meer, J., Rollema, S., Siezen, J., Berrthuyzen, M., Kuipers, P., y de Vos, M. (1994). Influence of amino acid substitutions in the nisin leader peptide on biosynthesis and secretion of nisin by *Lactococcus lactis*. The Journal of Biological Chemistry, (2699), pp 3555-3562.
36. Vásquez, S., Suárez, H., y zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Revista Chilena de Nutrición, volumen 36-(1), pp 0717-7518.
37. Venema, K., Abee, T., Haandrikman, J., Leenhouts, J., Kok, J., Konings, N., y Venema, G. (1993). Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. Environ. Microbiol, volume 59, pp 1041-1048.
38. Venema, K., Haverkort, E., Abee, T., Haandrikman, J., Leenhouts, J., de Leij, L., Venema, G., y Kok, J. (1994). Mode of action of LciA, the lactococcin A immunity protein. Molecular Microbiology, volume 14, pp 521–532.

## 11. ANEXOS

Anexo 1. Imagen Halos de inhibición bajo la técnica de antibiograma en placa



Fuente. Autor

