



**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO
DE CARACTERÍSTICAS DE INTERÉS
TECNOLÓGICO DE CEPAS PERTENECIENTES
AL GÉNERO *Lactobacillus***

Por

Ana LEVIN FIORELLI

2003

**MONTEVIDEO
URUGUAY**

012 TG
Aislamiento, id
Levin Fiorelli, Ana



FV/26232

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE
CARACTERÍSTICAS DE INTERÉS TECNOLÓGICO DE CEPAS
PERTENECIENTES AL GÉNERO *Lactobacillus***

POR

Ana LEVIN FIORELLI



TUTORA: Delma de Lima

CO-TUTORA: Stella Reginensi

MONTEVIDEO

URUGUAY

2003

INDICE

INDICE	2
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
SUMMARY	6
INTRODUCCIÓN	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
<u>BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS</u>	10
<u>CARACTERÍSTICAS DE LOS DIFERENTES GÉNEROS DE BAL</u>	11
<u>Género Streptococcus</u>	11
<u>Género Pediococcus</u>	11
<u>Género Aerococcus</u>	12
<u>Género Leuconostoc</u>	12
<u>Género Lactobacillus</u>	12
<u>IMPORTANCIA EN LA ALIMENTACIÓN</u>	13
<u>LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS COMO PROBIÓTICOS</u>	16
<u>COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS PRODUCIDOS POR BAL</u>	17
<u>Bacteriocinas</u>	17
<u>Ácidos orgánicos</u>	21
<u>Peróxido de hidrógeno</u>	22
<u>Diacetilo</u>	22
<u>Acetaldehído</u>	22
<u>Reuterina</u>	23
OBJETIVOS	24
2.1 <u>OBJETIVO GENERAL</u>	24
2.2 <u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	24
MATERIALES Y METODOS	25
<u>AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS</u>	25
<u>IDENTIFICACIÓN BACTERIANA</u>	26
<u>CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA</u>	27
<u>Técnica de la doble capa</u>	27
<u>Técnica de difusión</u>	27
<u>CINÉTICA DE CRECIMIENTO, ACIDIFICACIÓN Y PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS</u>	27
ESQUEMA 1. METODOLOGÍA REALIZADA	29

<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	30
<u>CONCLUSIONES</u>	40
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	42

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Stella Reginensi por su paciencia, continuo apoyo y dedicación.
- A la Dra. Delma de Lima por su colaboración.
- A José por su apoyo incondicional.
- A mis padres, ya que gracias a su enseñanza y cariño me han encaminado en el no siempre fácil camino de la vida.
- A mis hermanos, por bancarme siempre.
- A las Sras. Sonia Cozzano y Teresa Tombolini por su colaboración durante el procesamiento de las muestras.
- A todos aquellos que de una manera u otra me han acompañado y me han permitido llegar hasta aquí.

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas participan en la bioconservación de alimentos por la producción de ácidos u otros metabolitos utilizados en la industria. El objetivo del presente trabajo fue identificar y determinar la actividad antimicrobiana de una cepa de *Lactobacillus* tolerante al cloruro de sodio aislada de suero de queserías artesanales. El aislamiento se realizó a partir de muestras de suero de leche, incubadas con diferentes concentraciones de NaCl (1, 2, 3%) y a 42°C. Las bacterias crecidas en medio selectivo SL se identificaron por pruebas bioquímicas como API 50CH y por sus características en medios de cultivos selectivos. La cepa seleccionada, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* A25, se incubó a 42°C por 72 h en caldo MRS y se evaluó la velocidad de crecimiento, pH y la producción de sustancias antimicrobianas. Estas últimas se determinaron por: a) *técnica de difusión* con los sobrenadantes filtrados 0.22 μm y neutralizados a pH 6,2, contra cepas bacterianas Gram positivas y negativas; b) *técnica de doble capa* en placas con PCA inoculadas en superficie con una dilución (10^{-3}) de cultivos de 16 h de la bacteria en estudio. Luego de 48 h se agregó una sobrecapa de 5 mL de medio mínimo con 0,6% de agar previamente inoculado con 1×10^5 u.f.c/mL de bacterias indicadoras (*E. coli* K12, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Pseudomonas fluorescens*). Los resultados indican que *L. paracasei* subsp. *paracasei* A25 produce sustancias antimicrobianas detectadas por la técnica de la doble capa, con halos de inhibición contra: *E. coli* K12, *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* en condiciones nutritivas mínimas. La técnica de difusión en placa no reveló halos claros de inhibición posiblemente a causa de la dilución de los metabolitos producidos en el medio de crecimiento líquido. El relevamiento realizado por la técnica de la doble capa permitió determinar la producción de sustancias antimicrobianas sin discriminar la producción de ácidos o de bacteriocinas.

Palabras clave: Bacteria ácido láctico, Bacteriocinas, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, acidificación.



SUMMARY

The lactic acid bacteria take part in the food bioconservation for the production of acids or other substances used in the industry. The target of the present work was to identify and to determine the antimicrobial activity of a vine-stock of tolerant *Lactobacillus* to the chloride of sodium isolated of whey of handmade dairies. The isolation was realized from samples of whey of milk, incubated with different concentrations of NaCl (1, 2, 3 %) and to 42°C. The bacteria grown in way selective SL were identified by biochemical tests as API 50CH and by his characteristics in means of selective cultures. The chosen vine-stock, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* A25, incubated to 42°C for 72 h in broth MRS and the speed of growth was evaluated, pH and the production of antimicrobial substances. The above mentioned decided for: a) skill of diffusion with the leaked supernatants 0.22 µm and neutralized to pH 6,2, against bacterial vine-stocks Gram prints and denials; b) skill of double gels in badges with PCA inoculated in surface with a dilution (10⁻³) of cultures of 16 h of the bacterium in study. After 48 h a top layer of 5 joined mL of minimal way with 0,6 % of agar previously inoculated with 1 x 10⁵ u.f.c/mL of warning bacteria (*E. coli* K12, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Pseudomonas fluorescens*). The results indicate that *L. paracasei* subsp. *paracasei* A25 produces antimicrobial substances detected by the skill of the double layer, with auras of inhibition against: *E. coli* K12, *P. aeruginosa* and *P. fluorescens* in nourishing minimal conditions. The skill of diffusion in badge did not reveal clear auras of inhibition possibly because of the dilution of the substance produced in the way of liquid growth. The report realized by the skill of the double layer allowed determining the production of substances antimicrobial without discriminating against the production of acids or of bacteriocins.

Key words: Lactic acid bacteria, bacteriocins, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, acidification.

INTRODUCCIÓN

La habilidad de producir y conservar grandes cantidades de alimentos fue uno de los factores más importantes que permitió el establecimiento y desarrollo de las civilizaciones. El almacenamiento de alimentos siempre se ha asociado con el deterioro de los mismos. Se tienen registros de que miles de años antes de Cristo, el hombre ya utilizaba métodos biológicos para procesar alimentos y obtener productos de características especiales mediante la fermentación de carnes, leches, granos y frutos (Lactic acid bacteria, 2003).

Las bacterias ácido láctico (BAL) constituyen la microflora dominante en algunos alimentos. Estos organismos pueden producir compuestos antimicrobianos contra su flora competitiva, incluyendo contaminantes que deterioren alimentos y bacterias patógenas. También las BAL producen una gran variedad de compuestos, los cuales contribuyen al sabor, color, textura y consistencia de alimentos fermentados.

Actualmente, existe una inmensa variedad de productos obtenidos mediante la fermentación de materia prima por microorganismos. Estos productos son de gran relevancia en la industria alimentaria y su comercialización contribuye cada vez más al crecimiento de las economías (Sanjurjo, 2002). La búsqueda de nuevas cepas bacterianas para su utilización en la elaboración de productos lácteos fermentados ha generado un gran interés en el sector industrial. Esto es debido a que se procura optimizar la calidad de los productos y evitar pérdidas económicas que ocurren como consecuencia del uso de cepas sensibles a bacteriófagos o que carecen de las propiedades deseadas en el cultivo iniciador. El principal efecto antimicrobiano realizado por las BAL es la producción de ácido láctico y reducción de pH. También las BAL producen varios compuestos antimicrobianos, clasificados como compuestos de bajo peso molecular tales como: peróxido de hidrógeno, CO₂, diacetilo y de alto peso molecular, tales como las bacteriocinas.

Pasteur, junto a Joubert, fueron y son los primeros recordados como observadores de la interacción antagónica entre bacterias (Martínez Magro y col., 2000). Las bacteriocinas se descubrieron por primera vez en la industria láctea, cuando se apreció que algunas bacterias utilizadas en la fermentación eran mejores que otras

para prevenir que el alimento se deteriore. En los últimos quince años, las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas han despertado gran interés científico e industrial debido a su potencial como bioconservantes alimentarios (Ralph y col., 1995). La frecuencia en reportes científicos de bacterias productoras de moléculas antibacterianas como las bacteriocinas aparece ahora en fase de crecimiento. Estos organismos han sido ampliamente usados en la industria de alimentos pero ahora ofrecen más perspectivas en la aplicación para mejorar la preservación de alimentos, existiendo gran interés en la aplicación de éstos en la interferencia bacteriana como una estrategia para la prevención de algunas enfermedades infecciosas.

A finales de los años 20 y principio de los 30, el descubrimiento de la nisina inició las investigaciones en el campo de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (Gasser, 1994). Desde entonces se han identificado y caracterizado un gran número de estos polipéptidos antimicrobianos, particularmente durante la última década. Las bacteriocinas se definieron como sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica y activas frente a bacterias que guardan una estrecha relación taxonómica con la especie productora. Sin embargo, esta definición estaba muy influida por los estudios sobre las colicinas de *E. coli*, que fueron las primeras bacteriocinas descritas (Gratia, 1925) y las más conocidas en aquel momento. Actualmente se sabe que, si bien esta definición es válida para algunas bacteriocinas de las producidas por las bacterias lácticas, existen otras con actividad bactericida frente a microorganismos taxonómicamente distantes de la especie bacteriocinogénica. Bloom (1997) las definió como agentes antimicrobianos de naturaleza peptídica cuya síntesis no es letal para la célula productora y Aymerich (1996) como un grupo heterogéneo de compuestos antibacterianos de naturaleza peptídica que varían en su espectro de actividad, modo de acción, peso molecular, determinantes genéticos y características bioquímicas.

Debido a la fuerte demanda de alimentos naturales o mínimamente procesados, ha crecido el interés del uso de compuestos antimicrobianos producidos por BAL, siendo éste un camino seguro y natural para la preservación de alimentos.

El presente estudio pretende identificar cepas BAL nativas de leche productoras de sustancias antimicrobianas capaces de controlar el crecimiento de patógenos, como una característica de interés tecnológico (Ralph y col., 1995).

Bacterias Ácido Lácticas

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas que comparten la característica de generar ácido láctico como producto del metabolismo fermentativo. Esta característica es lo que ha llevado a los taxónomos a agruparlos en una misma categoría. El ácido láctico producido por estas bacterias es un excelente conservador de alimentos y nutrientes, ampliamente aceptado por los humanos y los animales. Los estudios genéticos de bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus*, debido a su rápido desarrollo, permiten aislar, modificar y transferir gran número de caracteres genéticos de interés tecnológico, como ser: resistencia a fagos; producción de aromas y sabores derivados del metabolismo secundario de estas bacterias.

Las BAL pueden dividirse en subgrupos, de acuerdo a dos características: sus productos finales del metabolismo de fermentación y su temperatura óptima de crecimiento. Las *homofermentativas* comprenden bacterias que generan ácido láctico como único o principal producto de fermentación, mientras que aquellas que además de ácido láctico generan etanol y anhídrido carbónico, son incluidas en el subgrupo de las bacterias *heterofermentativas* (Sneath y col. 1986).

Las bacterias lácticas gozan de gran importancia económica ya que, bien de forma natural o añadidas intencionalmente, desempeñan un papel importante en la fermentación de una gran variedad de alimentos. En ellos sus actividades metabólicas no sólo contribuyen al desarrollo de características organolépticas y reológicas deseables, sino que, además, permiten conservar o aumentar el valor nutritivo y la salubridad de la materia prima.

La capacidad de producir grandes cantidades de ácidos orgánicos (fundamentalmente ácido láctico) por fermentación de los carbohidratos presentes en los alimentos y el consecuente descenso del pH son los factores primarios en los que se basa la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas. Sin embargo, en los fenómenos de antibiosis de las bacterias lácticas también participan activamente otros metabolitos, entre ellos las bacteriocinas (Martinez Magro y col., 2000).

Son microorganismos Gram positivos, no esporulados, anaerobios aerotolerantes, cuya única forma de generar ATP es mediante la fermentación de carbohidratos. Dado que no producen compuestos de hierro porfina, no son capaces de sintetizar la catalasa, enzima que producen y utilizan los microorganismos respiradores para descomponer el peróxido de hidrógeno formado durante el crecimiento aerobio.

Nutricionalmente, las BAL son muy exigentes, requieren además de carbohidratos, vitaminas y factores de crecimiento para su desarrollo, que varían según la especie. Las vitaminas B son requeridas por estas bacterias como cofactores enzimáticos (Madigan, Martinko y Parker, 1999).

Características de los diferentes géneros de BAL

Género Streptococcus

Bacterias cocos, Gram+, catalasa (-), no esporuladas y principalmente metabolismo homofermentativo.

Los trabajos realizados sobre la composición de ARNr 16S y la hibridación ADN-ARNr indican que los *Streptococcus* pueden estar divididos en 4 géneros:

- *Streptococcus* comprende la mayoría de estas especies.
- *Lactococcus* pertenecientes al grupo serológico N.
- *Vagococcus* pertenecientes al grupo serológico N con proximidad filogenética a los géneros *Enterococcus* y *Carnobacterium*.
- *Enterococcus* integra los estreptococos fecales del grupo serológico D.

Un ejemplo de este género son los *Streptococcus thermophilus* de gran interés industrial, se agrupan en largas cadenas, son homofermentativos y producen ácido láctico L (+).

Género Pediococcus

Son homofermentativos y producen a partir de hexosas, DL o L (+) ácido láctico. Sus células son esféricas con formación de tétradas, son raramente aislados y no forman cadenas. La temperatura óptima de crecimiento es entre 25 a 40°C. Este género se destaca por ser incapaz de utilizar la lactosa y de coagular la leche.

Género *Aerococcus*

Son homofermentativos, poco acidificantes, los *Aerococcus* presentan similitud bioquímica y fisiológica con los pediococos, enterococos, lactococos y estreptococos. Su identificación fenotípica es confusa.

Género *Leuconostoc*

Su metabolismo es heterofermentativo, producen CO₂, etanol y ácido láctico D (+). La disposición celular es en pares o en cadena. Los cocos son alargados y se confunden con bacilos cortos que se pueden diferenciar por pruebas fisiológicas, análisis de isómeros de ácido láctico y por hibridización ADN-ADN.

Género *Lactobacillus*

Son bacterias Gram +, catalasa (-), (algunas pueden actuar sobre H₂O₂ por una pseudo-catalasa), forma de bastones aislados o en cadenas, no esporuladas, anaerobios facultativos o microaerofílicos, incapaces de reducir los NO₃ y de hidrolizar la gelatina.

Son homofermentativos con producción de 85% de ácido láctico a partir de glucosa, los heterofermentativos producen ácido láctico, ácido acético y CO₂. Los isómeros de ácido láctico producidos son L (+), DL o D (-).

La subdivisión de *Lactobacillus* se detalla a continuación:

□ Grupo I:

Lactobacillus homofermentativos estrictos

Especies de termófilos:

L. delbrueckii lactis

L. delbrueckii bulgaricus

L. helveticus

□ Grupo II:

Lactobacillus heterofermentativas facultativas

a. *L. plantarum*

b. "grupo casei". "*L. casei spp. casei*" ATCC 393, actualmente son: *L. casei* (especie única) y dos nuevas especies *L. paracasei* con dos subespecies *paracasei* o *tolerans*; y otra *L. rhamnosus*.

- Grupo III:
Lactobacillus heterofermentativos estrictos.

Fermentan hexosas a ácido láctico, acético, etanol y CO₂, a las pentosas las fermentan a ácido láctico y acético. Las especies de *L. brevis* presentan diversidad fenotípica importante. Es extremadamente difícil diferenciar *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. kefir* por las pruebas fisiológicas simples y es necesario recurrir a la biología molecular.

Importancia en la Alimentación.

En la actualidad también se hace buen uso de estos ilustres aliados microbianos en la elaboración de una amplia gama de productos lácteos fermentados, ya sean líquidos, como el kefir, o densos y semisólidos, como el queso o el yogurt.

La ingeniería bioquímica de las fermentaciones lácticas ha desarrollado nuevas técnicas para el diseño, control y operación de los bioreactores que permiten acelerar este tipo de procesos, mejorar su rendimiento y en consecuencia optimizar la economía de producción. Estos antecedentes indican la importancia de estudios con bacterias lácticas ya que las fermentaciones en las cuales participan, desempeñarán un papel cada vez más valioso en la industria alimentaria orientada al procesamiento de leche, vino, cereales, carne y tubérculos, así como la conservación de gran número de forrajes y alimentos de uso ganadero. Cuando estas bacterias se desarrollan sobre alimentos provocan que el ácido láctico generado como consecuencia de la fermentación altere las características de dichos alimentos, obteniéndose así productos con propiedades organolépticas particulares, como quesos, yogures, kefir, embutidos, vinos, panes y productos cárnicos, entre otros (Balows y col., 1992).

Las bacterias lácticas gozan de gran importancia económica ya que, bien de forma natural o añadidas intencionalmente, desempeñan un papel importante en la fermentación de una gran variedad de alimentos. En ellos, sus actividades metabólicas no sólo contribuyen al desarrollo de características organolépticas y reológicas deseables, sino que, además, permiten conservar o aumentar el valor nutritivo y la salubridad de la materia prima.

Si por bioconservación se entiende la extensión de la vida útil e incremento de la seguridad sanitaria de los alimentos mediante la microflora natural o sus metabolitos, entonces las bacterias lácticas son los candidatos ideales para su selección como cultivos bioprotectores. Así, no es de extrañar que se haya llegado a definir bioconservación como el empleo de bacterias lácticas, sus productos metabólicos o ambos para mejorar o asegurar la seguridad y calidad de los alimentos (Martinez Magro y col., 2000).

En contraposición con los aditivos químicos, los consumidores perciben las bacterias lácticas como algo “natural” y “beneficioso para la salud”, por lo que su empleo en la conservación de los alimentos tiene gran aceptabilidad.

La acción de estas bacterias desencadena un proceso microbiano por el cual la lactosa (el azúcar de la leche) se transforma en ácido láctico. A medida que el ácido se acumula, la estructura de las proteínas de la leche va modificándose (van cuajando), y lo mismo ocurre con la textura del producto. Existen otras variables, como la temperatura y la composición de la leche, que influyen en las cualidades particulares de los distintos productos resultantes. El ácido láctico es también el que confiere a la leche fermentada ese sabor ligeramente acidulado. Los elementos derivados de las bacterias ácido-lácticas producen a menudo otros sabores o aromas característicos. El acetaldehído, por ejemplo, da al yogurt su aroma característico, mientras que el diacetilo confiere un sabor de mantequilla a la leche fermentada. Pueden añadirse asimismo al cultivo de microorganismos, levaduras, a fin de obtener sabores particulares. El alcohol y el dióxido de carbono producidos por las levaduras, por ejemplo, dan al kefir, el koumiss y el leben (variedades de yogurt líquido) una frescura y una esponjosidad características. Entre otras técnicas empleadas cabe mencionar las que consisten en eliminar el suero o añadir sabores, que permiten crear una variada gama de productos.

En lo que concierne al yogurt, su elaboración deriva de la simbiosis entre dos bacterias, la *Streptococcus thermophilus* y la *Lactobacillus bulgaricus*, que se caracterizan porque cada una estimula el desarrollo de la otra. Esta interacción reduce considerablemente el tiempo de fermentación y el producto resultante tiene

peculiaridades que lo distinguen de los fermentados mediante una sola cepa de bacteria. Gracias a la elaboración del yogurt y otros productos lácteos fermentados, las bacterias ácido-lácticas seguirán representando un filón de explotación como cultivos probióticos. Éstas se complementan con las bacterias presentes en nuestra flora intestinal y contribuyen al buen funcionamiento del aparato digestivo. Ante la creciente demanda de los consumidores, cada día más preocupados por la salud, el mercado internacional de estos productos no cesa de incrementarse.

Las bacterias ácido-lácticas resultan excelentes embajadoras del mundo de los microbios, tan poco apreciado por lo general. Su importancia no se limita al orden económico, sino que se debe ante todo a sus propiedades, que contribuyen a preservar y mejorar la salud.

Este grupo bacteriano también es importante en la conservación de productos cárnicos. La carne contiene grandes cantidades de aminoácidos libres, pero sólo unos pocos carbohidratos fermentables, esto significa que después de la glucólisis postmortem, la concentración de éstos difícilmente excede el 0.3% y puede ser aún más baja en tejidos con un contenido inicial bajo de glucógeno o ricos en grasa y colágeno. Es por esto que las bacterias lácticas compiten pobremente en la carne cruda fresca, al tiempo que el oxígeno molecular está disponible para la degradación aeróbica de carbohidratos y aminoácidos (Lucke, 1996).

Hugas y col. (1996) realizaron un estudio con seis cepas productoras de bacteriocinas, con el fin de evaluar su potencial anti-listeria en productos manufacturados con diferentes tecnologías de fabricación (salmuera con nitrato y nitrito y salmuera elaborada únicamente con nitrato), estas cepas se evaluaron en comparación a un control no inoculado y a un cultivo no productor de bacteriocinas. Se estableció un efecto sinérgico de la bacteriocina y el nitrito en la reducción de *Listeria*, además de una acción diferencial de las distintas cepas en cada uno de los tratamientos aplicados.

Juven y col. (1998) estudiaron el efecto de la adición de *L. alimentarius* en carne molida de res envasada al vacío inoculada con *L. monocytogenes*. Los resultados

indicaron una reducción significativa de este microorganismo atribuyéndolo a la producción de ácido láctico, ya que no se observó la producción de ningún otro metabolito. Anderson y Jelle (1999) estudiaron el efecto anti-*Listeria* en salami y pepperoni de dos cepas productoras de bacteriocinas, encontrando que la mezcla de ambas junto con *Staphylococcus xylosus* como cultivo iniciador, disminuían los niveles de *Listeria* y producían buenas características de fermentación en estos productos (Victoria y col., 2003).

Las Bacterias Ácido Lácticas como probióticos.

Nuestro intestino posee una compleja población microbiana. De hecho, las células bacterianas que contiene nuestro cuerpo son veinte veces más numerosas que las células humanas. Estas bacterias son esenciales para nuestra salud, ya que nos protegen contra las infecciones intestinales, contribuyen a mejorar nuestra alimentación e influyen en nuestro sistema inmunológico.

Las bacterias beneficiosas se denominan probióticas y los ingredientes alimenticios que estimulan su crecimiento en el intestino se llaman prebióticos. Los alimentos que contienen organismos tanto probióticos como prebióticos se denominan simbióticos. Así, cada vez es más frecuente incluir bacterias probióticas, tales como determinados tipos de bacilos lácticos o bifidobacterias, en la composición de yogures y otros alimentos.

En nuestro intestino viven más de 400 especies diferentes de bacterias. La mayoría de ellas poseen numerosas cepas y a medida que envejecemos, se cree que la composición del ecosistema bacteriano del intestino varía lentamente, haciéndonos más vulnerables a enfermedades del colon. (Las bacterias ácido lácticas en la alimentación, 2003).

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas ejercen una influencia positiva en la salud o en la fisiología del hospedero (Chrezenmeir y col., 2001). La forma más frecuente de consumir probióticos es a través de alimentos lácteos que contienen especies intestinales de lactobacilos y bifidobacterias; por los efectos benéficos adicionales a los nutritivos,

estos alimentos se consideran en el grupo de los alimentos funcionales (Palou y Serra, 2000).

Una forma de actuar de los probióticos para lograr alcanzar un buen estado de salud del individuo, es a través de la resistencia otorgada contra la invasión de microorganismos patógenos, que se logra mediante la generación de sustancias antimicrobianas como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, y metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas (Marteau y col., 2001; Sanders, 2000).

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimenticia, porque 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 (Stiles, 1996).

Compuestos antimicrobianos producidos por BAL

Bacteriocinas

Las bacterias lácticas crecen en ambientes no aptos para el desarrollo de la mayoría de los microorganismos y son responsables de muchas fermentaciones de productos alimenticios de elevado consumo por el hombre. Este carácter le permite controlar microfloras mixtas, eliminando bacterias indeseables como consecuencia de la producción de sustancias antimicrobianas: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y/o bacteriocinas.

Si se pudiera juntar los varios miles de millones de microorganismos que tenemos en el cuerpo sano, pesarían más de dos kilos, aproximadamente 1/3 de la eliminación cotidiana por las heces sólidas está formada por bacterias probióticas vivas y muertas. Estas bacterias trabajan en protooperación con los seres humanos (Las bacterias probióticas, 2003).

Las bacteriocinas son péptidos microbianos de reducido tamaño, con una actividad antimicrobiana muy potente frente a bacterias zoonóticas y productoras de

toxiinfecciones alimentarias en el hombre. Son resistentes al calor y son hidrolizadas por las proteinasas gástricas, lo que permite su posible utilización como conservadores naturales de los alimentos. Se sintetizan a nivel ribosómico, y posteriormente pueden sufrir modificaciones (Martinez Magro y col., 2000).

Por otra parte, las bacterias lácticas de origen natural o genéticamente modificadas productoras de bacteriocinas, podrían utilizarse en la elaboración de alimentos nutracéuticos o funcionales y como aditivos para consumo animal, lo que reduciría el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos potenciando en los animales el desarrollo de una flora intestinal competitiva frente a muchos patógenos. La utilización de bacterias lácticas de origen natural o genéticamente modificadas (OGM's) productoras de varias bacteriocinas, permitiría su utilización no solamente como cultivos iniciadores, sino también como cultivos protectores en muchos alimentos. La incorporación de estas bacterias productoras de bacteriocinas a los alimentos, permitiría eliminar o reducir la utilización de aditivos químicos de síntesis.

Las bacteriocinas son resistentes al calor, acidez, baja a_w (actividad agua), pueden utilizarse para incrementar la seguridad y la vida útil de muchos alimentos tratándose, además, de aditivos naturales, elaborados por microorganismos considerados como seguros en los alimentos. Normalmente, su efecto antimicrobiano se debe a su acción sobre las membranas celulares de los otros organismos.

Una de las ventajas de las bacteriocinas en relación con los antibióticos elaborados es que éstas suelen ser bastante especializadas. Su espectro de actividad es estrecho y sólo inhiben uno o dos organismos. Otra ventaja para el consumo animal es que las bacteriocinas son proteínas, por lo que cuando abandonan el rumen, pueden ser digeridas por el animal, suplementando su alimentación y no dejando residuos.

En condiciones normales, las bacteriocinas de las bacterias lácticas son activas únicamente frente a bacterias Gram positivas. La amplitud del espectro de especies y cepas inhibidas depende de cada bacteriocina y oscila entre aquellas con un espectro muy reducido, limitado a ciertas cepas muy relacionadas taxonómicamente

con la productora y las que poseen un amplio espectro que incluye microorganismos alterantes y patógenos. Además, las concentraciones inhibitorias mínimas para las células vegetativas y las esporas sensibles varían ostensiblemente dependiendo de la cepa productora, el tipo de muestra y las condiciones del ensayo de actividad antimicrobiana (Blom, 1997). Asimismo, conviene señalar que dentro de una especie generalmente sensible a una bacteriocina pueden existir cepas resistentes, e incluso se pueden seleccionar células resistentes entre la población de una cepa sensible.

La estructura y composición de las membranas externas de las bacterias Gram-negativas, mohos y levaduras impiden el acceso de las bacteriocinas de las bacterias lácticas a su lugar de acción, las membranas plasmáticas. Sin embargo, aunque estos microorganismos no resulten afectados por las bacteriocinas en condiciones fisiológicas, se pueden sensibilizar si se les somete a tratamientos subletales que alteren la permeabilidad de sus membranas externas, como la congelación, el calentamiento suave, la exposición a ácido láctico y EDTA o la presión hidrostática (Martínez Magro y col., 2000).

A continuación se presenta la clasificación de las bacteriocinas propuesta por Ness en 1996 en base a las características bioquímicas y genéticas:

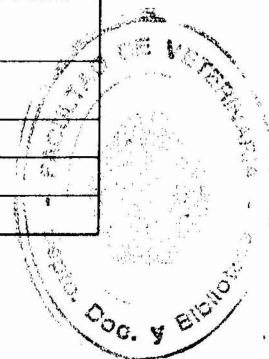
- *Clase I* (lantibióticos): péptidos pequeños (< 5 kDa), termoestables y con aminoácidos modificados. El prototipo de esta clase es la nisina, la bacteriocina de las bacterias lácticas más estudiada hasta la fecha.
- *Clase II* No lantibióticos: Son bacteriocinas de peso molecular variable, que contienen aminoácidos regulares: péptidos pequeños (< 10 kDa), termoestables y sin aminoácidos modificados en su estructura primaria.
- *Clase III*: proteínas de más de 30 kDa, termolábiles y sin aminoácidos modificados en su estructura primaria. Estas bacteriocinas son las que poseen un menor interés industrial en la actualidad.

En la Tabla 1 se citan algunos ejemplos de la clasificación de las bacteriocinas y el microorganismo productor descrito por Montville y col., 1998.

Tabla1. Bacteriocinas y Microorganismos productores

Bacteriocina	Clase	Microorganismo productor
	I	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
	II	<i>Pediococcus acidilactici</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i> WHE92
	II	<i>Pediococcus acidilactici</i> JD1-23
	II	<i>Lactobacillus sake</i> 706
	II	<i>Lactobacillus sake</i> LTH673
	II	<i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174
	II	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	II	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11
	II	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>
	II	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> 9B4
	II	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
	II	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13
	III	<i>Lactobacillus helveticus</i>

*Citado por Montville y col., 1998



Modo de acción

El modo de acción de las bacteriocinas es complejo. La nisina en la clase I y la pediocina como representante de la clase II, son las más estudiadas en este concepto y comparten algunas características en común. Por lo general, actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácido nucleicos (Montville y col., 1998; Chikindas y col., 1993).

Es posible que las clases I y II de las bacteriocinas compartan mecanismos de acción semejantes. Al parecer, los péptidos se unen a la membrana citoplasmática a través de uniones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente, luego se insertan a la membrana con una reorientación que depende del potencial de membrana, el cual está influenciado por el pH y la composición fosfolípida. Los monómeros de bacteriocina forman agregados proteicos que resultan en la formación del poro con la consecuente salida de iones (principalmente potasio y magnesio), pérdida de la fuerza motriz de protones (FMP), salida de ATP y

aminoácidos. La fuerza motriz de protones juega un papel central en la síntesis de ATP, en el transporte activo y el movimiento bacteriano, por lo tanto, se inhibe la síntesis de macromoléculas y la producción de energía dando como resultado la muerte celular (Montville y col., 1998).

Actualmente se utilizan compuestos con actividad antimicrobiana como la nisina a la reuterina producida por *L. reuteri* que inhibe a cepas de *Escherichia coli* (Daeschel, 1989).

Ácidos orgánicos

La fermentación por las BAL es caracterizada por la acumulación de ácidos orgánicos acompañada por la reducción del pH. Los niveles y tipos de ácidos orgánicos producidos durante el proceso de fermentación dependen de la especie de organismo, composición del medio de cultivo y condiciones de crecimiento (Lindgren y Dobrogosz, 1990). El efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos se debe a la disminución de pH, como también a la forma asociada de las moléculas. Se ha propuesto que al disminuir el pH externo se acidifica el citoplasma celular, mientras que el ácido asociado, siendo lipofílico, puede difundir pasivamente a través de la membrana. El ácido asociado puede alterar la permeabilidad de la membrana con la consiguiente alteración del sistema de transporte de sustrato. El ácido láctico es el mayor metabolito de las BAL donde está en equilibrio la forma disociada y asociada. Al bajar el pH, una gran cantidad de ácido láctico está en forma asociada y es tóxico para algunas bacterias, hongos y levaduras.

A pH 5.0 el ácido láctico es inhibitorio para el desarrollo de bacterias esporuladas pero es inefectivo contra levaduras y hongos (Woolford, 1975). Lindgre y Dobrogosz (1990) demuestran que a diferentes rangos de concentración mínima inhibitoria, el ácido láctico asociado fue diferente contra *Clostridium tyrobutiricum*, *Enterobacter sp.* y *Propionibacterium freundereichii subsp. shermanii*. También los estereoisómeros del ácido láctico tienen diferente actividad antimicrobiana, L-ácido láctico es más inhibitorio que el isómero D (Benthin y Villadsen, 1995).

La producción de ácido acético y propiónico por parte de las BAL es a través de la vía heterofermentativa, pueden interactuar con la membrana celular y causar

acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas (Huang et al. 1986). Son más efectivos como antimicrobianos que el ácido láctico debido a su alto valor pKa (ácido láctico 3.08, ácido acético 4.75 y ácido propiónico 4.87), y mayor porcentaje de ácidos asociados que el ácido láctico a un pH determinado. El ácido acético es más inhibitorio que el ácido láctico y cítrico contra *Listeria monocytogenes* (Richards et al. 1995), y crecimiento y germinación de *Bacillus cereus* (Wong y Chen, 1988).

Peróxido de hidrógeno

El efecto bactericida resultante de estos metabolitos del oxígeno ha sido atribuido no sólo a su fuerte efecto oxidante sobre la célula bacteriana, sino también a la destrucción de estructuras básicas moleculares de ácidos nucleicos y proteínas celulares (Requena y Peláez, 1995).

Diacetilo

Es un producto del metabolismo final de las bacterias lácticas, sintetizado a partir de piruvato. Ciertas especies de los cuatro géneros (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*) tienen esta capacidad sintética. El diacetilo es reconocido por su actividad antimicrobiana y se conoce por el aroma a mantequilla que le imparte a los productos lácteos fermentados. Su utilidad como preservante de alimentos es limitada porque se necesitan grandes cantidades para ese fin (Fragoso y Fernández, 2000; Holzapfel y col., 1995).

Acetaldehído

Es formado durante el metabolismo de carbohidratos por bacterias lácticas heterofermentativas, es reducido a etanol por la reoxidación de nucleótidos de piridina. Ha sido reportado como inhibidor sobre algunos patógenos en concentraciones de 10-100 ppm (De Vuyst y Vandamme, 1984).

Reuterina

Es un producto de bajo peso molecular, altamente soluble, de pH neutro, producido por la especie heterofermentativa *Lactobacillus reuteri* y muestra un amplio espectro

antimicrobiano, siendo activa contra bacterias Gram negativas, Gram positivas, levaduras y hongos filamentosos (Helander y col., 1995).

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar características tecnológicas de cepas nativas de interés para la industria láctea, bacterias ácido lácticas provenientes de suero de queserías artesanales y pertenecientes al género *Lactobacillus*.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Aislar e identificar bacterias ácido lácticas nativas a partir de suero de cuajada.
- 2) Evaluar características de interés industrial:
 - ♦ Temperatura de crecimiento en medio de cultivo líquido.
 - ♦ Velocidad de crecimiento de una cepa de *Lactobacillus* productora de sustancias antimicrobianas.
 - ♦ Acidificación en MRS durante la cinética de crecimiento.
 - ♦ Producción de sustancias con actividad antimicrobiana en una cepa de *Lactobacillus*.

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de la Unidad de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Agronomía.

Se procesaron un total de 70 muestras provenientes de suero de cuajada de 3 queserías artesanales ubicadas en el departamento de Colonia. Las muestras se transportaron refrigeradas en tubos de 50 mL de capacidad, estériles, con 1, 2 y 3 % de NaCl, se incubaron durante 72 horas a 42°C (se tomaron alícuotas para los estudios posteriores cada 24 horas).

Aislamiento de bacterias ácido lácticas

Las muestras se procesaron antes de 8 horas posteriores a su extracción. Fueron evaluadas cada 24 horas para el aislamiento de bacterias del género *Lactobacillus*, resistentes a pH bajos y a la concentración de NaCl.

Las muestras se homogenizan en vortex y se realizan diluciones hasta 10^{-5} en solución salina fisiológica (0.85% NaCl). Utilizando 1 mL de las 3 últimas diluciones se sembró en Medio Agar SL (Atlas, 1993). La técnica de sembrado fue por incorporación del inóculo (1 mL) a 20 mL del medio, previamente fundido a 45°C. La selectividad de este medio se logra por su bajo pH y la acción de la Azida de sodio, la cual inhibe la síntesis de compuestos hierro-porfirínicos. Las bacterias del ácido láctico no sintetizan ni utilizan estos compuestos, por lo tanto no son inhibidos por la Azida de sodio. Las colonias se detectan por su coloración rosada al rojo, luego de incubarse en cámaras con condiciones microaerofílicas a 41°C por 48 horas.

Se eligieron las colonias características y se transfirieron 10 colonias por cada placa a tubos de ensayo con MRS (de Man, Rogosa, Sharpe, 1960. OXOID), con el objetivo de obtener mayor biomasa microbiana y poder discriminar diferentes morfologías celulares. La selección de las colonias provenientes de Agar SL para transferirlos a cada tubo se realizó con la ayuda de una lupa y con tubos capilares estériles.

Luego de la evidencia macroscópica de crecimiento en los tubos se procedió a la tinción de Gram. El crecimiento en medios líquidos se manifiesta como una turbidez distribuida uniformemente, aunque luego de que el crecimiento cesa, las células sedimentan. La mayoría de las BAL tienden a crecer en la parte inferior de los tubos por su relación con el O₂ (microaerófila o de anaerobiosis facultativa).

Se comprobó la pureza de los cultivos provenientes de los tubos con MRS por siembra en superficie en placa con PCA (Plate Count Agar, OXOID), medio no selectivo, y en medio selectivo SL. Se seleccionaron colonias y se identificaron por medio de números, se incubaron a 42°C en una cámara de microaerofilia.

Identificación bacteriana

La identificación de los cultivos puros de cada cepa se realizó a través de diferentes pruebas bioquímicas, medios selectivos y se complementó con el empleo de sistemas comerciales de identificación (API 50CH).

Se realizaron las siguientes pruebas:

1. Tinción de Gram para la observación de la morfología y coloración diferencial de los diferentes grupos de bacterias.
2. Prueba de catalasa a partir de colonias aisladas en PCA.
3. Prueba de crecimiento de todas las cepas a diferentes temperaturas (10, 15 y 45°C) en MRS e incubadas durante 72 horas inoculados con 150 µl de un cultivo de 12 horas en MRS.
4. Crecimiento en Bilis esculina. Es un medio diferencial, lo utilizamos para el aislamiento e identificación presuntiva de los cocos, ya que en este medio se desarrollan estreptococos del grupo D, éstos hidrolizan la esculina, lo que da un color marrón oscuro al medio. Se evidencia crecimiento después de 18-24 horas de incubación a 37°C en cámara de microaerofilia.
5. Los estudios de fermentación de azúcares se realizó utilizando API 50 CH, que permitieron la identificación de bacterias ácido lácticas.

Caracterización biológica de la actividad antimicrobiana

Se emplearon 2 métodos para la evaluación de sustancias antimicrobianas con varias cepas de *Lactobacillus*.

Técnica de la doble capa

Se utilizó el medio PCA en placa y se sembró en superficie por las cepas en estudio de la actividad antimicrobiana incubadas por 24 horas en condiciones microaerófilas. Se cubrieron luego de la presencia de colonias con una sobrecapa (6-8 mL) del medio mínimo soft con 6 g/l de agar previamente inoculado con la bacteria indicadora (inóculo de una noche de *Escherichia coli* K12, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae*).

Técnica de difusión

Se realizó a partir de muestras obtenidas de la cinética de crecimiento de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (cepa 50). El medio utilizado con este fin fue PCA, al cual se le incorporó un cultivo de 16 horas (100 μ l) de las cepas indicadoras. Se inocularon los pozos realizados en el PCA con 30 μ l de las muestras neutralizadas, centrifugadas y filtradas (0,22 μ m) obtenidas de la cinética que se detalla a continuación. Se incubaron a 37°C durante 24 horas y tras el crecimiento de la cepa indicadora se midió el diámetro del halo de inhibición producido alrededor de cada muestra.

Cinética de crecimiento, acidificación y producción de sustancias antimicrobianas

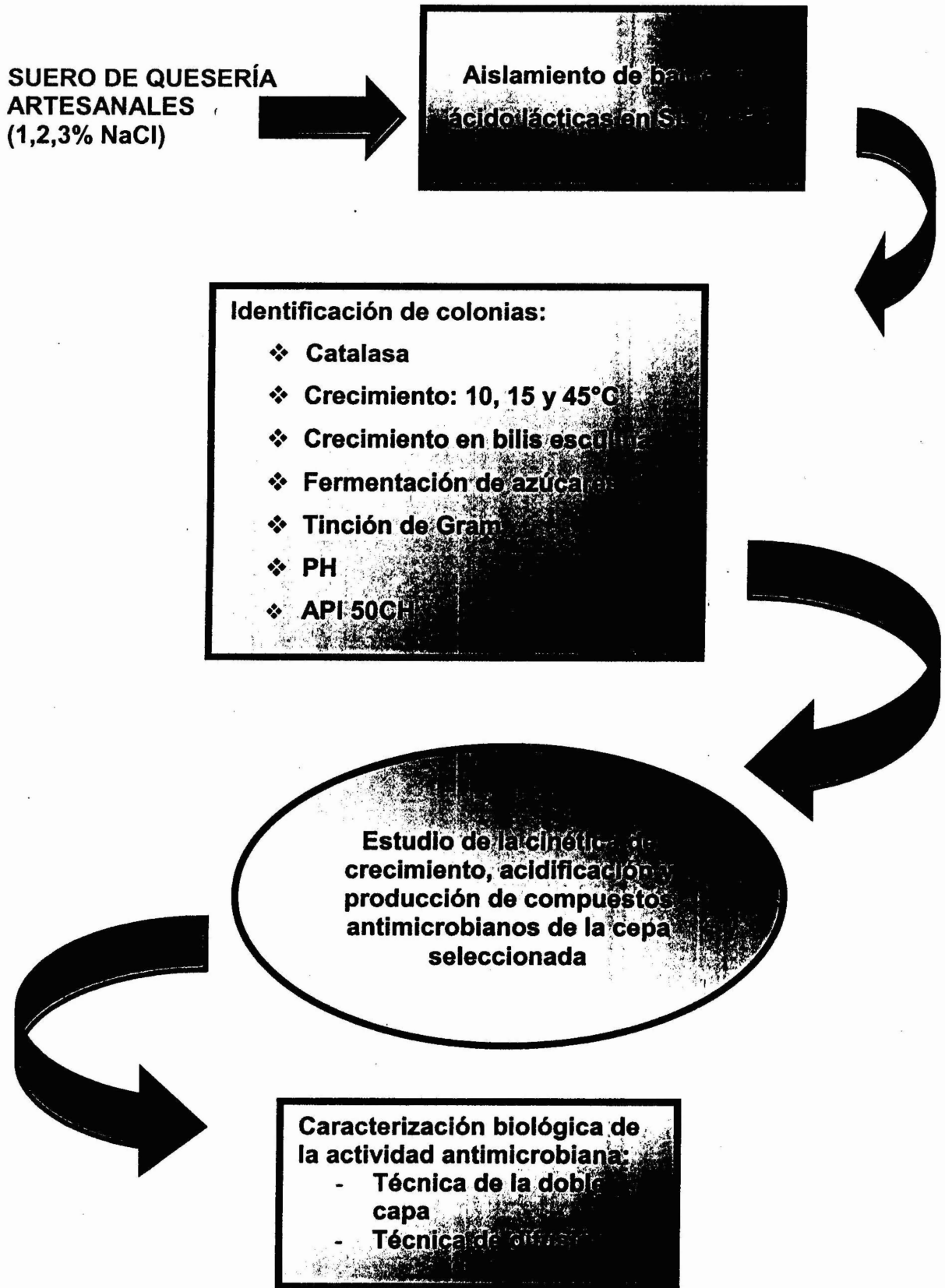
Se seleccionó el *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (cepa 50) de acuerdo a los resultados obtenidos en relación a su actividad antimicrobiana. Los estudios de velocidad de crecimiento y acidificación se realizaron con cultivos de 16 horas en MRS, inoculando con 10 mL en matraces (Erlenmeyer de 250 mL) con 150 mL de MRS, incubándose por 72 horas a 42°C. Los recuentos microbianos se obtuvieron por siembra en superficie en agar MRS. Se evaluó periódicamente hasta 72 horas el recuento de bacterias viables en PCA, variación de pH y la producción de sustancias antimicrobianas. El recuento de viables en agar MRS se realizó a partir

de las 3 últimas diluciones de cultivos en SSF. Las placas de Petri se incubaron en cámara microaerófila por 48 horas a 42°C.

La variación de pH se determinó en el transcurso de la cinética de crecimiento, midiéndolo con un potenciámetro durante el período de muestreo (72 horas).

La producción de sustancias antimicrobianas se realizó a partir de los sobrenadantes obtenidos de las muestras extraídas durante la cinética de crecimiento en MRS. El cultivo fue centrifugado a 5°C y 10.000 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante obtenido fue utilizado para determinar el efecto inhibitorio sobre cepas indicadoras. Antes de filtrar (0.22 μm) se ajustó el pH de los cultivos a un valor entre 6-6.2 agregando NaOH para que se produzca la máxima adsorción de moléculas de bacteriocinas. Las cepas identificadas se mantienen en una colección por congelación en medios especiales con crioprotectores en el Laboratorio.

En el esquema 2 se detalla la metodología realizada.



Esquema 1. metodología realizada

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de cepas BAL

De las 70 muestras procesadas se aislaron 120 cepas bacterianas Gram + de diferentes morfologías y disposición detectadas en los frotis observados. En la tabla 2 se detalla la morfología del examen microscópico luego de realizada la tinción de Gram y la resistencia a diferentes concentraciones de sales en 22 ejemplos:

Tabla 2. Cepas de BAL aisladas de suero de queserías

Número de tubo	Morfología microscópica	Concentración de NaCl
1-4	Cocos en cadena Gram+	2 g
5	Cocos en tétradas Gram +	3 g
6	Cocos Gram + aislados	2 g
7	Cocos y bastones	2g
8-11	Cocos y bastones	3 g
12	Cocos y bastones	2 g
13-14	Cocos en cadena Gram+	3 g
15-20	Cocos aislados	2 g
21-23	Cocos en tétradas Gram +	3 g
24-25	Cocos aislados	2 g
26-35	Cocos en cadena Gram+	3 g
36-45	Cocos y bastones	2 g
46	Bastones en cadena Gram +	3 g
47-49	Bastones en cadena Gram +	3 g
50	Bastones en cadena Gram +	2 g
51-59	Bastones aislados	3 g
60-68	Cocos aislados Gram +	2 g
69-78	Cocos y bastones	2 g
79-83	Cocos en cadena Gram+	2 g
84-97	Cocos aislados	2 g
98-105	Bastones en cadena Gram +	3 g
106-120	Bastones aislados	2 g

Identificación de cepas BAL

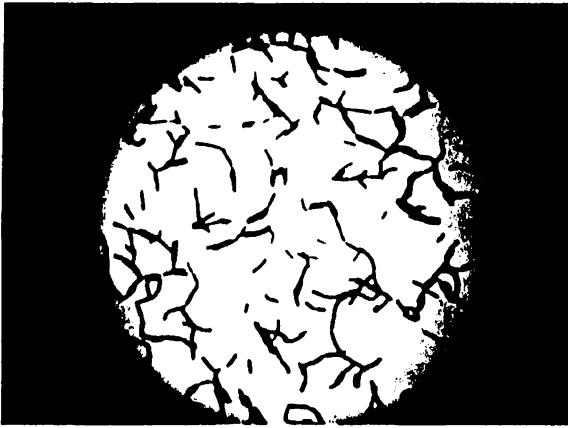
Se seleccionaron 36 cepas y se complementaron las pruebas para su identificación. En la Tabla 3 se detalla la morfología microscópica de las cepas seleccionadas, el resultado de la prueba de la catalasa y crecimiento en MRS a 10, 15 y 45°C:

Tabla 3: Cepas seleccionadas.

Número de tubo	Morfología microscópica	Catalasa	Crecimiento a 45°C	Crecimiento a 10°C	Crecimiento a 15°C
1-2	Cocos en cadena Gram +	-	+	+	-
5	Cocos en tétradas Gram +	-	+	+	-
6	Cocos Gram + aislados	-	+	+	-
13-14	Cocos en cadena Gram +	-	+	+	-
23	Cocos en tétradas Gram +	-	+	+	-
24-25	Cocos aislados	-	-	+	-
46	Bastones en cadena Gram +	-	+	-	+
47-49	Bastones en cadena Gram +	-	+	-	+
50	Bastones en cadena Gram +, forma de espiral	-	+	-	+
51	Bastones aislados	-	-	-	+
60 y 62	Cocos aislados Gram +	-	+	+	-
79-82	Cocos en cadena Gram+	-	+	+	-
85 y 86	Cocos aislados	-	-	+	-
105-109	Bastones en cadena Gram +	-	+	-	+
112-120	Bastones aislados	-	+	-	+

En la Figura 1 se observan diferentes morfologías de bastones Gram positivos, en (a) las cadenas de bastones son típicas de las BAL, en (b) las cadenas de los bastones son pleomórficas con predominancia de bacilos enrollados en cultivos jóvenes provenientes de caldo MRS.

a



b

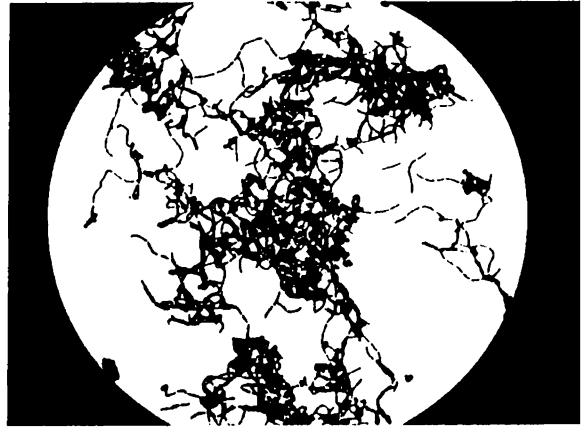


Figura 1. Tinción de Gram. (a) cadenas de bastones. (b) cadenas de bastones, pleomórficos en espiral. (x 1000x)

Crecimiento de cocos en bilis esculina agar

La interpretación de los resultados se realizó a las 24 y 48 horas de incubación, se determinó que 40 cepas pertenecían al género *Enterococcus*, luego de confirmarse por pruebas bioquímicas comerciales.



Figura 2. Prueba en medio de cultivo agar bilis esculina, reacción positiva (hidrólisis de la esculina). Esta prueba permitió determinar la facultad de un organismo de hidrolizar el glucósido esculina en esculetina y glucosa, en presencia de bilis (10 a 40%). Los

resultados permitieron realizar una identificación presuntiva de los estreptococos del grupo D, junto a éstos la tolerancia a la sal en concentraciones del 6.5%.

⌘ **Identificación de la cepa 50** *subtílica *qué el fin de cepa.*

Se seleccionó la cepa 50 por sus características morfológicas en la tinción de Gram, en donde predominan pleoformas de bacilos; y por su rapidez en la acidificación del medio de cultivo.

En la tabla 4 se detallan algunas de las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de este *Lactobacillus*.

Tabla 4. Prueba de catalasa, crecimiento a diferentes temperaturas y fermentación de azúcares para la identificación primaria de la cepa 50.

PRUEBA	Cepa 50
Catalasa	-
Crecimiento a 45 °C	+
Crecimiento a 15 °C	+
Gas a partir de glucosa	+
Fermenta Glucosa	+
Fermenta Maltosa	+
Fermenta Lactosa	+
Fermenta Fructosa	+
Fermenta Inositol	-
Fermenta Sacarosa	-
Fermenta Rafinosa	-
Gram	Bastones largos en espiral
Concentración de sal	2 g

La identificación por las pruebas bioquímicas primarias, secundarias y el crecimiento característico en medios de cultivo selectivos se confirmó por API 50CH, y el resultado fue *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, de acuerdo a los resultados obtenidos por la fermentación de los 49 azúcares presentes en este kit comercial.

En la Figura 3 se observan las reacciones positivas y negativas en las galerías correspondientes a los diferentes azúcares de esta prueba. La interpretación de los

resultados se realizó a las 24 y 48 horas de incubación, considerando positivas aquellas que viraron su tonalidad hacia el amarillo.

Filogenéticamente *L. paracasei subsp. paracasei* se encuentra cercano a *L. rhamnosus*, se diferencia de éste por la incapacidad de fermentar a la rhamnosa.



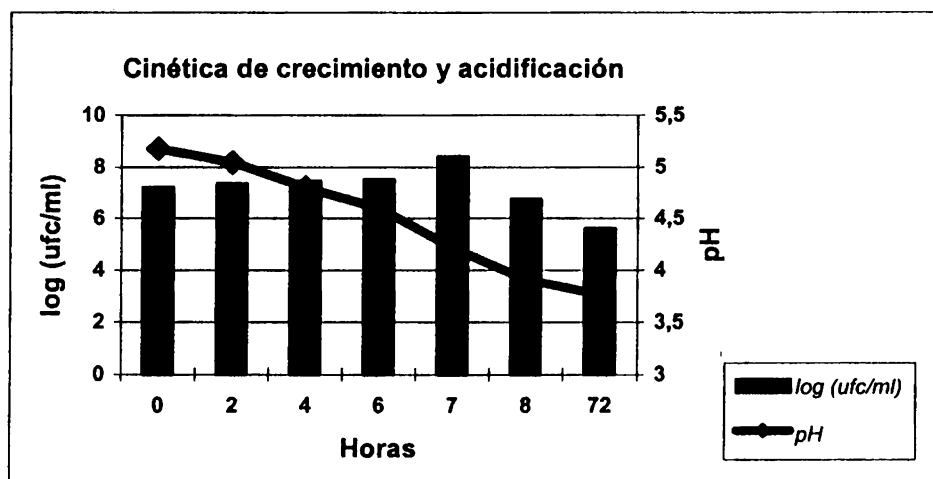
Figura 3. Resultado API 50 CH

Cinética de crecimiento, acidificación y producción de sustancias antimicrobianas

Las variaciones de pH indican que a las 7 horas de incubación los máximos recuentos de bacterias viables 2.5×10^8 u.f.c/mL de *L. paracasei subsp. paracasei* se obtuvieron a pH= 4.21. El tiempo de duplicación de esta bacteria es 1.43h. La máxima acidez desarrollada fue a las 72 h de incubación con un pH=3.76 y con recuentos de 4×10^5 u.f.c/mL. Estos resultados permitieron establecer información del proceso de acidificación en relación al crecimiento en medio MRS de la cepa nativa de *L. paracasei subsp. paracasei*.

El crecimiento y acidificación de la cepa *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* se detallan en el gráfico 1.

Gráfico 1. Cinética de crecimiento y acidificación de *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* incubado a 42°C.



En el Gráfico 1 se observa que a las 8 horas del cultivo el número de células viables se reduce 1 ciclo log y el pH a 3.9, estas condiciones limitan la velocidad de crecimiento en esta cepa. El medio de cultivo que se utilizó está clasificado dentro de los medios enriquecidos permitiendo un rápido desarrollo de la cepa sin existir una fase lag larga, y la fase exponencial duró 5 horas de crecimiento con recuentos de 2.5×10^8 u.f.c/mL.

fig 2.

Al comparar éstos resultados con otros estudios en leche donde también se evaluaron características de interés tecnológico de cepas del género *Lactobacillus* (Sanjurjo, 2002), *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* fue la que obtuvo un mayor crecimiento con respecto al inóculo, a la hora 0 el recuento fue 9.9×10^5 u.f.c/mL y a la hora 8, 3.2×10^8 u.f.c/mL, con una velocidad de crecimiento de 38 minutos. Esta misma acidificó la leche hasta un pH de 4.73 y 3.75 a las 8 y 24 horas respectivamente. La especie *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* es comúnmente empleada en la elaboración de yogur. Esta se utiliza como cultivo iniciador junto con *Streptococcus thermophilus*, cuya simbiosis permite el desarrollo de las propiedades organolépticas buscadas en el yogur. El crecimiento de estos microorganismos está directamente relacionado con la producción de ácido láctico y por lo tanto cuanto mayores son los conteos, más ácido se produce.

Caracterización biológica de la actividad antimicrobiana

La técnica de difusión no permitió establecer halos de inhibición translúcidos en el medio y posiblemente sea debido al efecto dilución del medio de cultivo con sustancias antimicrobianas presentes en los sobrenadantes provenientes de los muestreos de la cinética de crecimiento. ??

Como se expresó anteriormente no se evidenció claramente actividad antimicrobiana aunque aparecen halos de inhibición, éstos son de mayor tamaño luego de 7 horas de incubación. En relación a este punto, la inoculación de los pozos con el sobrenadante obtenido de las muestras de la cinética se realizó en el mismo momento del sembrado de las bacterias indicadoras en PCA. Este medio de cultivo permitió el crecimiento rápido de las cepas indicadoras y una difusión lenta del sobrenadante evaluado.

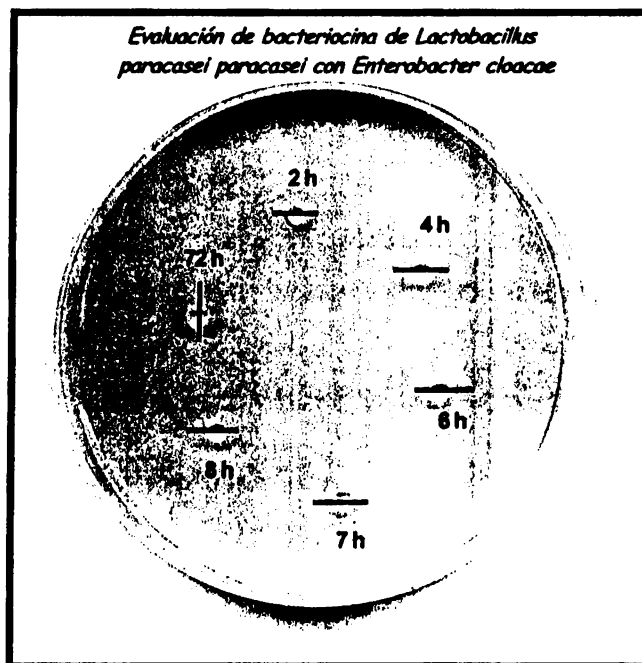


Figura 4. Caracterización biológica por la técnica de difusión en placa. Efecto inhibitorio desarrollado por los sobrenadantes de las muestras de la cinética de crecimiento de *L. paracasei subsp. paracasei* sobre una cepa de *Enterobacter cloacae*.

γ La técnica de la doble capa permitió establecer en cepas indicadoras con condiciones mínimas nutritivas una de las propiedades de interés tecnológico en el

control de microorganismos patógenos o que deterioran alimentos, el mismo puede deberse a bacteriocinas o a la presencia de diferentes ácidos producidos por las BAL.

En este caso el efecto de la concentración de ácidos producidos por las BAL en la cinética de crecimiento se neutralizó para discriminar la actividad antimicrobiana desarrollada por éstos.

En la Figura 5 se observa la actividad desarrollada por *L. paracasei subsp. paracasei* contra *Pseudomonas aeruginosa* y en la figura 6 se observa la inhibición producida contra *Escherichia coli* K12.



Figura 5. Caracterización biológica por la técnica de la doble capa. Efecto inhibitorio desarrollado por las colonias de *L. paracasei subsp. paracasei* sobre una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

Conclusión

- X Los estudios realizados nos permitieron determinar que una cepa que puede ser utilizada en la fabricación de productos lácteos, también puede utilizarse para inhibir

microorganismos contaminantes en el proceso de elaboración. Además, en el campo de la conservación de alimentos, resulta interesante analizar el uso de las bacteriocinas de las BAL como una alternativa para sustituir, al menos parcialmente, a los agentes químicos.

Los estudios realizados permitieron ampliar información y el número de cepas nativas a la colección perteneciente al laboratorio relacionadas a las BAL de interés en la industria. Aunque no se haya determinado en *L. paracasei subsp. paracasei* la producción de bacteriocinas, se caracterizó la producción de sustancias antimicrobianas.

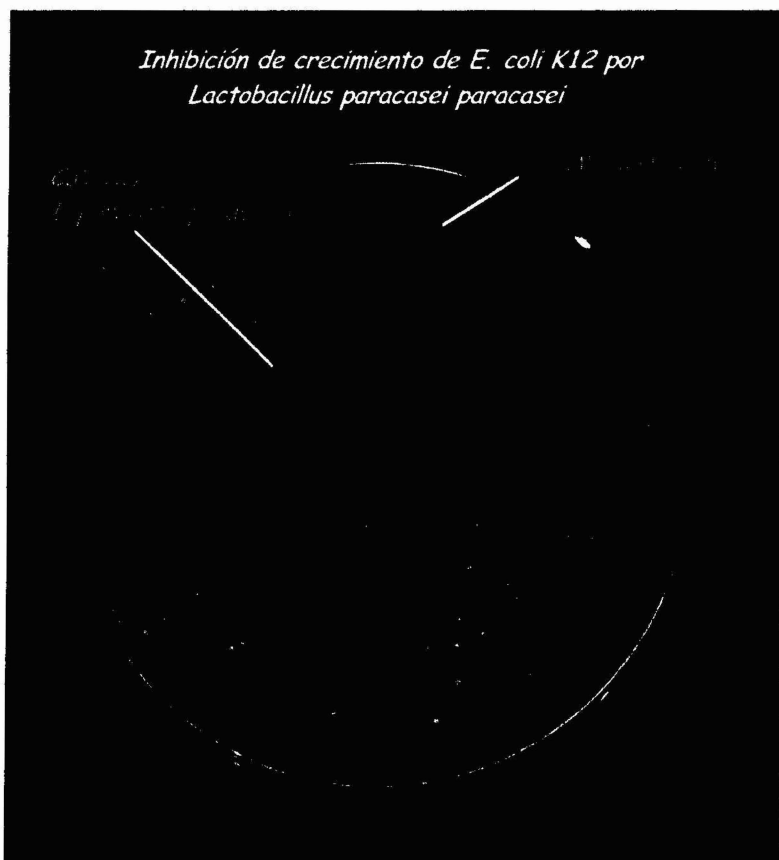


Figura 6. Caracterización biológica por la técnica de la doble capa. Efecto inhibitorio desarrollado por las colonias de *L. paracasei subsp. paracasei* sobre una cepa de *E. coli* K12.

La producción de ácidos por este microorganismo indicada en la cinética de crecimiento, es una causa posible del desarrollo de la actividad antimicrobiana, sin descartar la producción de bacteriocinas.

En el presente trabajo, no se purificó la bacteriocina, y por ello no se rechaza su presencia.

Mientras que contra *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* no demostró efecto inhibitorio, como se observa en la Figura 7. *Refiere a la pag. 35.*

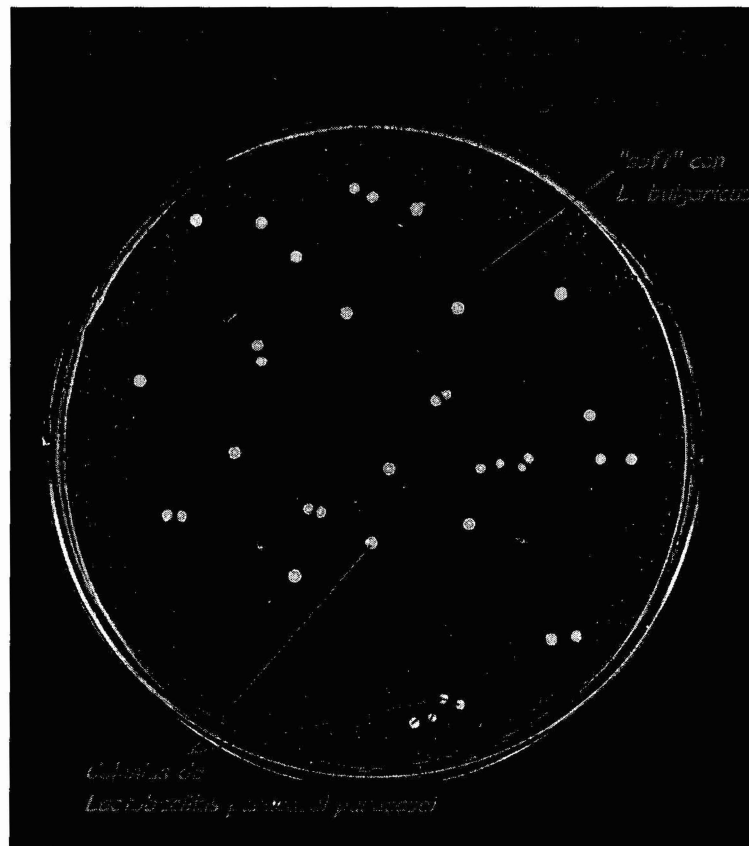


Figura 7 Caracterización biológica por la técnica de la doble capa. Sin efecto inhibitorio por las colonias de *L. paracasei subsp. paracasei* sobre una cepa de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*.

CONCLUSIONES

Las bacterias ácido lácticas (BAL) producen una variedad de compuestos, los cuales imparten a los productos fermentados características propias de sabor y color, y también mejoran la seguridad de los alimentos. En este estudio se identificaron por sus características fenotípicas varios géneros de BAL provenientes de suero de queserías y se determinó en una cepa la caracterización biológica y producción de compuestos antimicrobianos con el fin de hallar cepas BAL con aplicación potencial en alimentos.

Se aislaron e identificaron 120 cepas BAL nativas, y se seleccionó *L. paracasei subsp. paracasei* por su rapidez en el desarrollo de la acidificación en leche. Los estudios de cinética de crecimiento revelaron que el tiempo de duplicación en medio MRS fue de 1.43 horas y con una fase Lag corta, mientras que la fase log fue de 5 horas alcanzó recuentos de 2.8×10^8 u.f.c/mL.

Los compuestos antimicrobianos obtenidos de los sobrenadantes de las muestras de la cinética de crecimiento y evaluadas por la técnica de difusión en placa, demostraron halos parcialmente claros de inhibición en el medio de cultivo PCA utilizado con las cepas indicadoras. En estudios futuros esta técnica debería considerarse con medios mínimos o de estrés para las cepas indicadoras, como también sugerir el uso de medios de cultivos con mayor diámetro de poros en la malla del gel para facilitar la difusión de los compuestos.

La evaluación de la producción de sustancias antimicrobianas utilizando cepas indicadoras de la actividad como: *Escherichia coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* y *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* determinados por la técnica de la doble capa utilizando un medio "soft" mínimo (agar + agua) en la sobrecapa, permitió detectar el efecto inhibitorio desarrollado por las colonias previamente crecidas de *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* sobre las cepas indicadoras.

Futuros estudios sobre la conservación de productos alimenticios, permitirán ampliar la información en relación a las alternativas biológicas en el control de la microflora patógena y del deterioro en alimentos con inóculos de *L. paracasei subsp. paracasei aislada* en este trabajo.

Los resultados obtenidos demuestran que la cepa BAL identificada produce compuestos inhibitorios del crecimiento microbiano, las técnicas utilizadas para su evaluación no permitieron discriminar si el efecto es debido a la producción de ácidos o de bacteriocinas.



BIBLIOGRAFÍA

- Atlas, RM, 1993. Handbook of Microbiological Media pp 1079. Ed. L.C. Parks. CRC. Press. E.E.U.U.
- Aymerich, T.; Holo, H; Havarstein, L.S.; Hugas, M; Garriga, M. y Nes. I. F. (1996): "Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins". *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1676-1682.
- Balows, A; Truper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W.; and Schloifer, K.H. (eds). 1992. The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification and applications. Springer-Verlag, New York, USA. Pp 1536-1594.
- Bentin, S., y Villadsen, J. 1995. Different inhibition of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* by D- and L-Lactic acid: effects on lag phase, growth rate and cell yield. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 647-654.
- Blom, H.; Katla, T.; Hagen, B. F., y Axelsson. L. (1997): "A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins", *Int. J. Food Microbiol.*, 38. 103-109.
- Chikindas ML, MJ García-Garcera, AJM Driesessen, AM Ledebøer, J Nissen-Mejer, IF Nes, T Abee, WN Konings and G Venema. 1993. PediocinPA-1, a Bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 Forms Hydrophilic Pores in the Cytoplasmic Membrane of Target Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3577-3584.
- Chrezenmeir, J. and M. Vrese. 2001. Probiotics, prebiotics, and symbiotic-approaching a definition. *Am. J. Clin. Nut.* 73 (suppl) 361-364.
- Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substances from Lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology* 1,164-167
- Fragoso, S.L., y Fernández, R.M. (2000). Las bacterias lácticas como probióticos y biopreservantes. *Alimentaria*. Abril. 89-98. *pedio*
- Gasser, F. (1994): "Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections", *Bull. Inst. Pasteur.* 92. 45-67.
- Gratia, A. (1925): "Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille". *C. R. Soc. Biol. Paris.* 93. 1040-1041.

- Helander, Y., Von Wright, A. Mattila, T. (1997) Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. Trends in Food Science and Tech. Vol.8. 146-150.
- Holzapfel, W.H., Geinsen, R., Schillinger, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food grade enzymes. Int. J. Food Microbiol. (24):343-362.
- Huang L., Forsberg, C.W., y Gibbins, L.N. 1986. Influence of external pH and fermentation products on *Clostridium acetobutyricum* intracellular pH and cellular distribution of fermented products. Appl. Environ. Microbiol. 51, 1230-1234.
- Hugas, M.; Garrida, M.; Aymerich, T y Monfort, J. (1998). Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. J. Appl. Bacteriol. (79) 322-330.
- Juven, B.J; Barefoot, S.I; Pierson M.D.; McCaskill, L.H.; Smith, B. (1998) Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in vacuum packaged ground beef inoculated with *Lactobacillus alimentarius* Floracarn L-2. J. Food. Protec. 61 (5) 551-556.
- Lactic Acid Bacteria as Food Preservatives, 2003. "<http://www.galeon.com/lactobacilo/indexing.html>."
- Las Bacterias Ácido-Lácticas y su Uso en la Alimentación, 2003. "<http://www.eufic.org/sp/food/pag/food18/food184.htm>".
- Las bacterias probióticas. "<http://www.trends-online.biz/inde1539.htm>", 2003. *Revisar
- Lindgren, S.E., y Dobrogosz, W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbial. Rev. 87, 149-164.
- Lucke, F. (1996) indigenous lactic acid bacteria of various food commodities and factors affecting their growth and survival lactic acid bacteria: Current advances in Metabolism, Genetics and Applications. NATO ASI Series. (98). Pp. 253-265. Editorial Springer-Verlag, Berlín.
- Madigan, M.T; Martinko, J.M; Parker, J. 1999. ed. Prentice Hall Iberia. Brock. Biología de los microorganismos. Octava edición.

- Marteau P, M. Vrese, CJ Cellier and J. Schrezenmeir 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics Am J Clin Nut 73 (suppl.) 430-436.
- Martinez Magro, M.I.; Martinez Corbacho, J.M.; Herranz Sorribes, C.; Suárez Gea, A.M.; y Rodríguez Gómez, J.M. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas. Revista Alimentaria. Julio-Agosto 2000. pp 59-64.
- Montville, T.J. y Chen, Y., 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 511-519.
- Palou A. y F. Serra 2000. Perspectivas europeas sobre los alimentos funcionales. Alimentación Nutrición y Salud 7 (3) 76-90.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., y Klein, D.A. (1999). Microbiología en Bacterias: Grampositivas con bajo contenido en G+C. Cuarta Edición. McGraw Hill Interamericana. España. 515-521.
- Ralph W. Jack, Jhon R. Tagg, and Bibek Ray. Bacteriocines of Gram Positive Bacteria. Microbiological Reviews, June 1995, p. 171-200
- Requena, T., Peláez, C. 1995. Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. Revista Española de Ciencia y tecnología de Alimentos. 35(1): 19-44.
- Richards, R.M.E., Xing D.K.L., and King, T.P. 1995. Activity of p-aminobenzoic acid compared with other organic acids against selected bacteria. J. Appl. Bacteriol. 78, 209-215.
- Sanders ME. 2000. Considerations for Use of probiotic bacteria to modulate human health J. Nut 130 384S-390S.
- Sanjurjo, L. Aislamiento, identificación y estudio de características de interés tecnológico de cepas nativas de leche pertenecientes al género *Lactobacillus*. Informe de pasantía. Licenciatura en Ciencias Biológicas. Profundización Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Uruguay. 2002. 51 p.
- Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E.; and Holt, H.G. ed. Williams. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. pp 1208 – 1235.

- Victoria, L. T.; Pérez Chabela. M.L., Guerrero. L.I. (2003). Bacterias lácticas, resistencia al calor y aplicación en productos cárnicos. Revista La Industria Cárnica. Argentina. Nº 128, 33-39.
- Wong, H.C., and Chen Y.L. 1998. Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. 54, 2179-2184.
- Woolford, M.K. 1975. Microbiological screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potencial silage aditives. J. Sci. Food Agric. 26, 229-237.