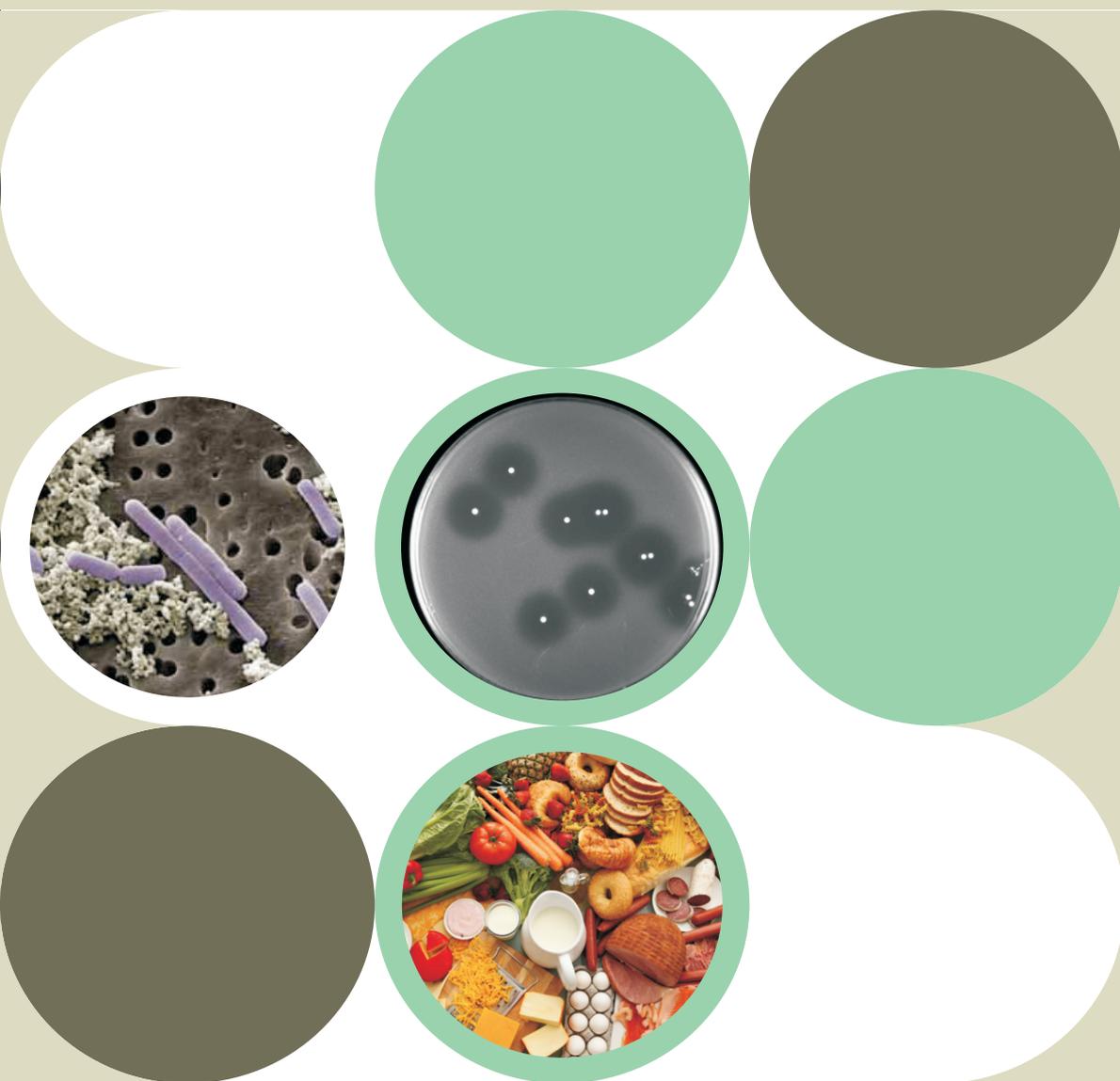


Búsqueda, caracterización y purificación de compuestos con actividad antimicrobiana producidos por bacterias ácido lácticas.

Paula Mussio Forteza



Directores

Carlos Balsalobre - Antonio Juárez Giménez



UNIVERSITAT DE BARCELONA





UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGÍA

Búsqueda, caracterización y purificación de compuestos con actividad antimicrobiana producidos por bacterias ácido lácticas.

PAULA MUSSIO FORTEZA

Barcelona, setiembre de 2010

Directores:

Carlos Balsalobre Parra

Antonio Juárez Giménez

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	1
1.2. BACTERIOCINAS.....	4
1.3. APLICACIÓN DE BACTERIOCINAS EN ALIMENTOS.....	8
1.4. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	10
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	13
3.1.1. CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO.....	13
3.1.2. DETECCIÓN ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	14
3.1.2.1. Metodología de la Estría.....	14
3.1.2.2. Metodología de la Gota.....	14
3.1.2.3. Metodología del Pocillo.....	15
3.1.3. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	15
3.1.4. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.....	14
3.1.5. TINCIÓN DE GELES DE PROTEÍNAS.....	17
3.1.5.1. Tinción de proteínas con Azul de Comassie.....	17
3.1.5.2. Tinción de proteínas con Nitrato de Plata.....	17
3.1.6. ESTIMACIÓN PESO MOLECULAR DE LOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	18
3.2. CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN Y MODO DE ACCIÓN DE LA SUSTANCIA ANTIMICROBIANA.....	18
3.2.1. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN.....	18
3.2.2. MODIFICACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....	18
3.2.3. MODO DE ACCIÓN.....	19
3.3. CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO CON ACTIVIDAD ANTI-LISTERIA.....	20
3.3.1. PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO Y DIÁLISIS.....	20
3.3.2. VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA.....	20
3.3.3. LIOFILIZACIÓN.....	21

3.3.4. ULTRAFILTRACIONES.....	21
3.3.5. TÉCNICAS DE CROMATOGRAFÍA.....	21
3.3.5.1. Gel Filtración.....	21
3.3.5.2. HPLC – Exclusión peso molecular.....	21
3.3.5.3. HPLC – Cromatografía de Intercambio Catiónico.....	22
3.4. DETECCIÓN DE GENES DE BACTERIOCINAS PREVIAMENTE DESCRITAS.....	23
3.5. BÚSQUEDA DE NUEVAS CEPAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	24
3.5.1 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE ADN RIBOSOMAL.....	25
3.5.1.1. Amplificación por PCR del 16S rADN.....	25
3.5.1.2. Visualización producto de PCR.....	25
3.5.1.3. Secuenciación producto de PCR.....	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-LISTERIA.....	27
4.1.1. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD.....	28
4.1.2. PRODUCCIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	29
4.1.3. MODO DE ACCIÓN DE LA BACTERIOCINA FRENTE A <i>Listeria monocytogenes</i>	32
4.1.4. ESPECTRO DE INHIBICIÓN DE LA CEPA V4-1.....	34
4.1.5. ESTIMACIÓN DEL PESO MOLECULAR DEL PRINCIPIO ACTIVO.....	36
4.2. PURIFICACIÓN DE LA BACTERIOCINA.....	41
4.3. DETECCIÓN DE GENES DE BACTERIOCINAS PRESENTES EN LA CEPA V4-1.....	45
4.4. PROSPECCIÓN DE NUEVAS CEPAS CON ACTIVIDAD ANTI-LISTERIA.....	46
5. CONCLUSIONES.....	50
6. BIBLIOGRAFÍA.....	52

1. INTRODUCCIÓN

A pesar de los continuos avances tecnológicos, la conservación de los alimentos sigue siendo un tema de sumo interés tanto para países en vías de desarrollo como para países desarrollados. Dentro de los retos más importantes para la industria de alimentos se encuentran: el control de las pérdidas económicas debido al deterioro de los productos, la disminución de los costos de producción y el evitar la transmisión de patógenos a través de la cadena alimentaria. Todos estos objetivos deben llevarse a cabo sin descuidar la creciente demanda de los consumidores de alimentos prontos para el consumo, frescos, nutritivos, ricos en vitaminas y mínimamente procesados. Esto último resulta un gran desafío, ya que el mercado exige cada vez alimentos más seguros y con una mayor vida útil, pero también expresa su preferencia por productos poco procesados y que no contengan conservantes químicos. Una opción más que atractiva que puede ser parte de la respuesta a estas exigencias es la bioconservación.

El concepto de bioconservación hace referencia al aumento de la vida útil y la mejora en la seguridad de los productos mediante el uso de microorganismos y/o sus metabolitos (Ross *et al.* 2002). El ejemplo más clásico y antiguo de bioconservación es la fermentación, en la cual la materia prima del alimento actúa como fuente de energía y carbono que permite el crecimiento, y como resultado del metabolismo se produce la formación de un amplio rango de metabolitos microbianos que contribuyen al aumento de la calidad y la vida útil del producto.

Tomando en consideración los productos alimentarios, existe un grupo de bacterias conocidas colectivamente como las bacterias del ácido láctico, que son las principales responsables de muchas de las transformaciones microbianas encontradas en los productos alimenticios fermentados más comunes.

1.1. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un grupo de bacterias gram positivas, no esporuladas, en forma de cocos o bacilos no respiradores que producen ácido láctico como producto mayoritario de la fermentación de carbohidratos (Axelsson 2004).

Los límites del grupo han estado sujetos a controversia, pero históricamente *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* constituyen los géneros principales. Revisiones taxonómicas y nuevas descripciones de géneros dan como resultado que el grupo de las BAL, en su definición

fisiológica más amplia, comprenda aproximadamente 20 géneros. Sin embargo, desde un punto de vista práctico las BAL asociadas a la tecnología de alimentos pueden resumirse en: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. Algunos ejemplos de la aplicación de BAL en la fermentación de alimentos se muestran en la Tabla 1, a continuación.

Producto	Microorganismos	Sustrato
Vino, cerveza	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , BAL	uva, grano, lúpulo
Pan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , BAL	trigo, centeno, granos
Queso cheddar	<i>Lactococcus (cremoris, lactis)</i> y <i>Leuconostoc</i>	leche
Queso suizo	<i>Lactobacillus (delbrückii, bulgaricus, helveticus)</i>	leche
Yogur	<i>St. thermophilus</i> y <i>Lb. bulgaricus</i>	leche
Kéfir	Lactococos, levaduras, <i>Lb. kéfir</i> (y otros)	leche
Carnes fermentadas	Pediococos, Staphylococos, varios BAL	cerdo, vacuno
Chucrut	<i>L. lactis</i> , <i>Leuc. mesent</i> , <i>Lactobacillus (brevis, plantarum, curvatus, sake)</i>	col
Salsa de soya	<i>Aspergillus oryzae/soyae</i> , lactobacilos y <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	granos de soya y trigo
Vegetales	<i>Enterococcus (mundtii, faecium)</i> , <i>Lactococcus (cremoris, lactis)</i> , <i>Lactobacillus (plantarum, casei)</i>	vegetales
Pescado	<i>Carnobacterium (piscicola, divergens)</i>	pescado

Tabla 1 – Bioconservación por bacterias lácticas (Ross *et al.* 2002).

Las BAL se pueden subdividir en dos grupos distintos en función de como llevan a cabo el metabolismo de los carbohidratos. El grupo homofermentativo compuesto por *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y algunos lactobacilos, utilizan la glicólisis (vía de Embden-Meyerhof-Parnas) para convertir un mol de glucosa en dos moles de piruvato que posteriormente son reducidos dando como resultado 2 moles de ácido láctico. En contraste, las bacterias heterofermentativas producen, a partir de glucosa, ácido láctico y cantidades significativas de otros compuestos como etanol, acetato y CO₂. Estas bacterias utilizan la vía de las hexosas monofosfato o vía de las pentosas y al hacerlo, generan sólo la mitad de energía que las bacterias del grupo homofermentativo. Entre los géneros que forman parte de este grupo se incluyen *Leuconostoc*, *Weissella* y algunos lactobacilos.

La acción conservante de las cepas usadas como inóculos en la fermentación (starters) en la industria de alimentos se atribuye a la acción combinada de una serie de metabolitos antimicrobianos producidos durante el proceso de fermentación. Entre estos metabolitos se incluyen a muchos ácidos orgánicos como el láctico, acético y propiónico, productos finales que

generan un ambiente ácido desfavorable para el crecimiento de muchos microorganismos patógenos y responsables del deterioro nutritivo y organoléptico del alimento. Se cree que generalmente los ácidos ejercen su efecto antimicrobiano al interferir con el potencial de la membrana celular, inhibir el transporte activo, reducir el pH intracelular e inhibir ciertas funciones metabólicas. Estos tienen un amplio potencial de acción e inhiben tanto bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, levaduras y hongos.

Además de los ácidos, las BAL pueden producir un amplio rango de compuestos antimicrobianos, como el etanol del metabolismo heterofermentativo, el peróxido de hidrógeno producido durante el crecimiento aeróbico y el diacétilo generado cuando existe un exceso de piruvato. En particular, el H_2O_2 puede tener un fuerte efecto oxidante de los lípidos de las membranas y las proteínas celulares. Otros ejemplos de metabolitos secundarios producidos por BAL que tienen actividad antagonista pueden ser la reuterina y el antibiótico recientemente descubierto, la reuterociclina, ambos generados por cepas de *Lactobacillus reuteri* (Ross *et al.* 2002).

Por último pero no menos importante, varias BAL tienen la capacidad de producir unos inhibidores del crecimiento microbiano de naturaleza proteica, llamadas bacteriocinas, que tienen un amplio interés en la industria (Fig. 1).

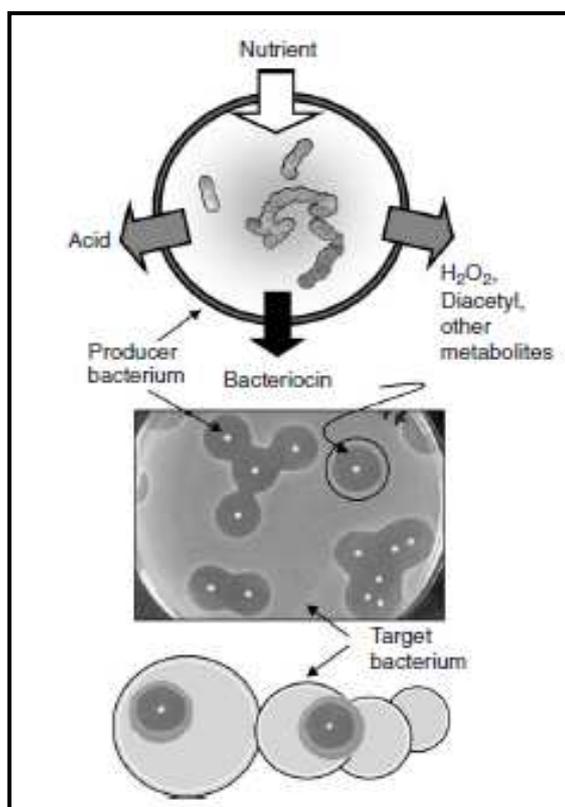


Figura 1 – Las BAL pueden producir un gran número de compuestos antimicrobianos, pero las bacteriocinas son sus inhibidores más potentes. La cepa productora de bacteriocinas (arriba) puede ser identificada por zonas de inhibición causadas en una capa de células sensibles.

1.2. BACTERIOCINAS

Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo de péptidos de síntesis ribosómica producidos por bacterias y que presentan actividad antimicrobiana. Las bacterias sensibles pueden ser de la misma especie que la productora (espectro reducido) o de géneros dispares (amplio espectro) (Cotter *et al.* 2005). Los microorganismos productores son inmunes a su propia bacteriocina, una propiedad que es mediada por proteínas específicas de inmunidad.

La primera descripción de una inhibición producida por la acción de una bacteriocina fue reportada hace 80 años, cuando se descubrieron cepas de *Escherichia coli* que presentaban antagonismo entre sí. Es así que antes de llamarse bacteriocinas, estos péptidos eran conocidos como “colicinas” haciendo referencia al microorganismo productor (Gratia *et al.* 1925).

En las bacterias Gram-positivas la producción de este tipo de compuestos antagonistas está muy extendida. En los últimos quince años las investigaciones se han centrado de forma prioritaria en el estudio de las bacteriocinas producidas por las BAL de interés alimentario, ya que ofrecen una posibilidad de manipular el ecosistema microbiano de los alimentos de forma intencional, y simultáneamente, presentan una mayor probabilidad de cumplir con las reglamentaciones requeridas para que un microorganismo pueda ser aplicado en productos alimenticios.

Las bacteriocinas producidas por las BAL pueden ser de espectro amplio o reducido, pero generalmente, la actividad antimicrobiana se presenta frente a especies Gram-positivas. Se han encontrado bacteriocinas activas frente a Gram-negativas, pero esta inhibición se da principalmente cuando la integridad de la membrana externa de la célula diana se ve comprometida (Cotter *et al.* 2005).

Existen varias clasificaciones que han intentado ordenar las bacteriocinas. Una de las últimas agrupaciones propuestas es la realizada por Cotter (2005) que las divide en tres grandes categorías (Tabla 2): los *Lantibióticos* (Clase I), las bacteriocinas que no contienen lantioninas (Clase II) y las *Bacteriolisinas*. A continuación se describen las principales características de las diferentes clases.

CLASE	SUBCLASE	EJEMPLO	REFERENCIA
Clase I: Lantibióticos	Ia: Péptidos lineales catiónicos	Nisina Epidermina	Rogers, 1928; Mattick y Hurst, 1944 Schnell et al., 1988
	Ib: Péptidos globulares sin carga o con carga neta negativa	Lacticina 3147 Mersacidina	Ryan et al., 1999 Sahl et al., 1995
Clase II: Bacteriocinas termoestables, no modificadas (<10 kDa)	IIa: Bacteriocinas anti-Listeria, similares a pediocina	Pediocina PA-1 Enterocina A	Henderson et al., 1992 Aymerich et al., 1996
	IIb: Bacteriocinas heterodiméricas	Lactacina F Lactococcina G	Allison et al., 1994 Nisson-Meyer et al., 1992
	IIc: Bacteriocinas sec-dependientes	Bacteriocina 31 Enterocina P	Tomita et al., 1996 Cintas et al., 1997
	II d: Bacteriocinas sin péptido líder	EJ97 Enterocina L50	Sánchez-Hidalgo et al., 2003 Cintas et al., 1998; Floriano et al., 1998
	IIe: Bacteriocinas cíclicas (propuesta como clase V)	AS-48 Circularina A Gassericina A	Galvez et al., 1986; Maqueda et al., 2004 Kemperman et al., 2003b Kawai et al., 1998
	II f: Bacteriocinas no agrupables	Lactococcina A Enterocina B	Holo et al., 1991 Casaus et al., 1997
Clase III: Grandes proteínas termolábiles (Bacteriolisinas)*		Helveticina J Enterolisina A	Joerger y Klaenhemmer, 1990 Nilsen et al., 2003

Tabla 2 - Clasificación de bacteriocinas basada en las clasificaciones propuestas por Cotter *et al.*, (2005).

La clase IV (bacteriocinas con motivos no proteicos) no se incluye ya que no se ha demostrado la existencia de miembros de esta clase.

* Se sugiere que esta clase no sea considerada como bacteriocinas.

- **Clase I: Lantibióticos**

Los lantibióticos son péptidos pequeños (19-38 aminoácidos) termoestables que contienen residuos lantionina o β -metil-lantionina (Fig. 2). Estos residuos inusuales, generados por modificación génica tras el paso de traducción, forman uniones covalentes entre los aminoácidos dando como resultado la formación de “anillos” internos, los cuales definen las características estructurales de estas bacteriocinas. Además, los lantibióticos pueden contener otros residuos poco frecuentes que resultan igualmente de modificaciones post-traduccionales, como por ejemplo la sustitución de D-alaninas por L-serinas.

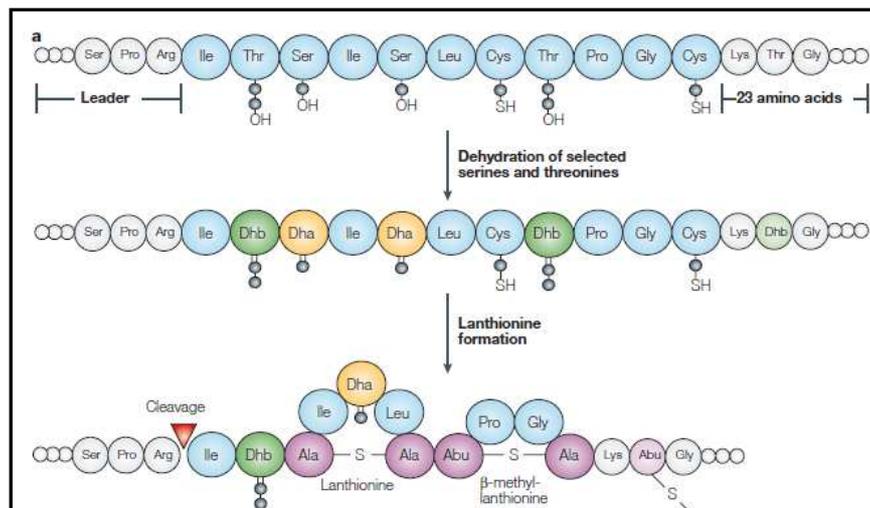


Figura 2 – Síntesis de lantioninas (Cotter *et al.* 2005).

Los lantibióticos pueden a su vez ser subdivididos en función de su estructura y su modo de acción (Tabla 2). Originalmente se distinguieron dos subgrupos: A y B (Jung *et al.* 1991, Sahl *et al.* 1998). Los lantibióticos del tipo A incluyen aquellas moléculas de forma elongada y flexible que tienen carga positiva y actúan causando la despolarización de la membrana de las células sensibles. Por otro lado, los del tipo B son moléculas globulares que interfieren con diferentes reacciones enzimáticas de las cepas diana. Aunque aún no se ha elucidado el mecanismo de acción antimicrobiano preciso para todos los lantibióticos, algunos miembros de este grupo, como la nisina, han demostrado tener un modo de acción doble. La nisina se puede unir a moléculas de Lípidos II - transportadores principales de subunidades de peptidoglicanos desde el citoplasma a la pared- evitando que se lleve a cabo la correcta síntesis de la pared celular y dando lugar a la muerte de la célula. Al mismo tiempo, pueden utilizar al Lípidos II como molécula de acoplamiento para iniciar la inserción a la membrana, con la consecuente formación de poros (Fig. 3).

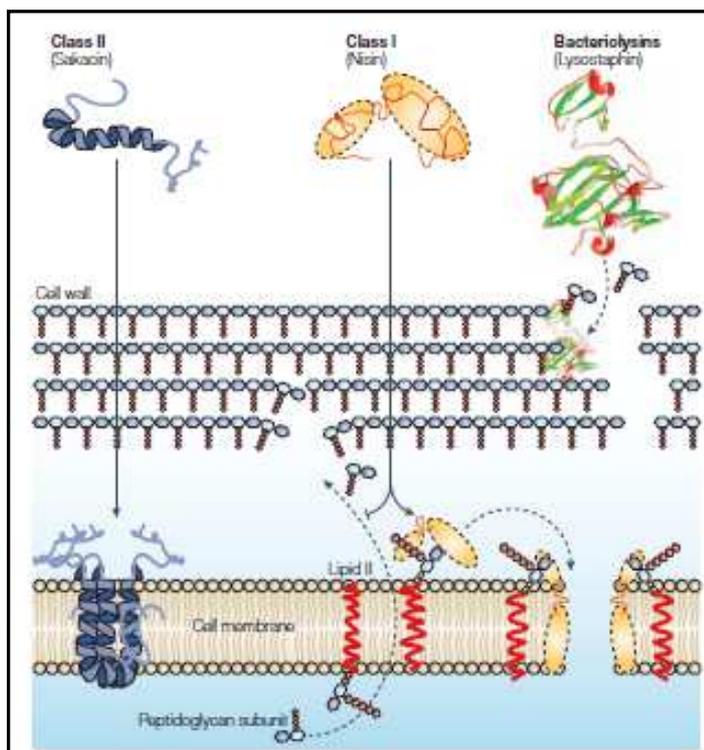


Figura 2 – Modo de acción de bacteriocinas de BAL
(Cotter *et al.* 2005).

- **Clase II: Bacteriocinas que no contienen lantioninas**

La gran parte las bacteriocinas de esta clase son pequeños péptidos (<10 kDa) estables a altas temperaturas, que a diferencia de los antibióticos no sufren extensas modificaciones post-traduccionales. La mayoría de las bacteriocinas de este grupo son activas al producir una permeabilización de la membrana con la consecuente fuga de moléculas del citoplasma de las células sensibles (Fig. 3). Dentro de esta clase, se han identificado 6 subdivisiones (a, b, c, d, e y f) las cuales se resumen en la Tabla 2, dependiendo de características estructurales o del sistema por el cual son secretados de la célula productora (Diep y Nes 2002, Cotter *et al.* 2005).

- **Bacteriolisinas**

Este grupo, antes consideradas como bacteriocinas de Clase III, comprende proteínas antimicrobianas grandes y termolábiles. Los diferentes dominios que forman parte de su estructura tienen funciones de transporte, de unión al receptor, y de actividad antimicrobiana. Su mecanismo de acción es distinto de la de otras bacteriocinas ya que actúan causando la lisis de las células sensibles al catalizar la hidrólisis de la pared (Fig. 3).

1.3. APLICACIÓN DE BACTERIOCINAS EN ALIMENTOS

Ciertas características de ciertas bacteriocinas producidas por BAL las hace que sean candidatas de amplio interés para su uso en la conservación de alimentos:

1. Son consideradas sustancias GRAS (“Generally recognised as safe”)
2. No son activas ni tóxicas frente a células eucariotas
3. Se vuelven inactivas por la acción de las proteasas del tracto digestivo, por lo que no ejercen influencia alguna en la microflora del intestino
4. Son generalmente estables al pH y al calentamiento
5. Tienen un relativo amplio espectro de acción frente a la mayoría de las bacterias patógenas y alterantes de los alimentos
6. Presentan un modo de acción bactericida ejerciendo su función a nivel de la membrana citoplasmática, por lo que no muestran resistencias cruzadas con antibióticos
7. Usualmente se encuentran codificadas en plásmidos, lo que facilitaría la manipulación genética.

Existen diferentes modos en los que las bacteriocinas pueden ser aplicadas. Los alimentos pueden ser adicionados con preparados de bacteriocinas producidas *ex situ* o pueden ser inoculados con la cepa productora de la bacteriocina en condiciones favorables para su producción *in situ*. En el primer caso, las preparaciones de bacteriocinas obtenidas por el cultivo de la bacteria productora en un fermentador de escala industrial, con la adecuada recuperación y purificación, pueden ser agregadas al alimento como concentrados puros o extractos parcialmente purificados que deben cumplir con las aprobaciones específicas de las reglamentaciones vigentes. La nisina es la única bacteriocina purificada cuya adición en alimentos ha sido aprobada. En 1969 un comité de expertos de la FAO (Food and Agriculture Organization) y la WHO (World Health Organization) aprobaron su uso como aditivo alimentario. En 1983, esta bacteriocina fue agregada a la lista europea de aditivos alimentarios con el número E234 y en 1988, fue aprobada por la FDA (US Food and Drug Agency) para su uso en quesos. La forma en que la nisina es más ampliamente conocida en la industria de alimentos es como “Nisaplin” (Danisco), que se trata de una preparación en forma de polvo que contiene un 2,5% de Nisina con NaCl (77,5%) y con leche descremada en polvo (12% proteínas y 6% de carbohidratos).

La inversión requerida para purificar bacteriocinas utilizando metodologías que permitan el uso del producto como aditivo alimentario, ha favorecido que muchas bacteriocinas

producidas *ex situ* se añadan a los alimentos como parte de extractos semipurificados de cultivos microbianos. Estos concentrados contendrían, además de las bacteriocinas, componentes propios del medio de cultivo y todos los metabolitos con actividad antimicrobiana producidos (por ejemplo, los ácidos orgánicos), ofreciendo así una función de bioprotección adicional. El uso de estos extractos está considerado por las autoridades como adición de suplementos nutritivos. La adición de estos extractos en alimentos para su posterior consumo por humanos, implica que los medios de cultivo utilizados para obtener los cultivos bacterianos deben formularse con componentes de alta calidad (food-grade), como suero láctico, etc. Un ejemplo de este tipo de aplicación es el preparado comercial ALTA™ 2341 (Quest), que se trata de los productos de fermentación de la cepa productora de la Pediocina PA1, *Pediococcus acidilacti*.

Un avance en el campo de las bacteriocinas producidas *ex situ* es su uso en forma inmovilizada, una aplicación novedosa de esta tecnología es el desarrollo de envases con propiedades antimicrobianas (Mauriello *et al.* 2004).

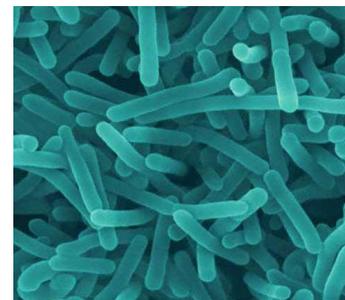
La producción de las bacteriocinas en los propios alimentos - producción *in situ* -, implica inocular el alimento con una cepa productora. Esta metodología ofrece grandes ventajas comparada con la producción *ex situ*, principalmente en los aspectos legales y en los costos. Por estas razones, cada día existen más estudios enfocados en la selección y el desarrollo de cepas bacteriocinogénicas para su aplicación en alimentos. Estas cepas podrían ser usadas directamente como cultivos starters, en combinación con otras cepas, o simplemente como cultivo de protección (especialmente en el caso de productos no fermentados). En algunos casos, la producción *in situ* de las bacteriocinas puede también ser útil para aumentar la capacidad de implantación, la competitividad y la estabilidad de un cultivo starter (Todorov *et al.* 1999).

A diferencia de otros métodos de conservación como el calentamiento o el bajo pH, que son indiscriminados a la hora de ejercer su efecto antimicrobiano, las bacteriocinas tienen la capacidad de influenciar de distinta manera en la flora presente en el alimento, permitiendo un buen desarrollo de las cepas deseadas y la eliminación de aquellas cepas patógenas o deteriorantes.

Resulta muy interesante, por ejemplo, la inclusión (*ex situ* o *in situ*) de bacteriocinas de espectro reducido con actividad anti-*Listeria*, que pueden específicamente inhibir el crecimiento de este patógeno, sin afectar a las BAL utilizadas para la producción.

1.4. *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Listeria monocytogenes es una bacteria ampliamente distribuida en la naturaleza. Su presencia en los alimentos está determinada por su extensa distribución en el ambiente (tierra, aguas, vegetación, ensilados) lo que confiere una importante oportunidad para contaminarlos. Se trata de un bacilo Gram-positivo, no esporulado y anaeróbico facultativo. Es catalasa positiva, oxidasa negativa y β -hemolítico en agar sangre.



Las características que hacen de esta bacteria un patógeno amenazante para la industria de los alimentos son las condiciones en las que puede crecer y desarrollarse. Con respecto a las temperaturas, *Listeria monocytogenes* puede crecer desde 0,4 a 45 °C, estando su temperatura óptima entre 30 y 37 °C, y además de poder crecer en temperatura de refrigeración, se ha demostrado que sobreviven a las condiciones de congelación. Al mismo tiempo, crece a un rango de pH de entre 4,5 y 7,0 y se ha demostrado que puede desarrollarse hasta en una concentración de 11,3% de NaCl (Shabala *et al.* 2008; Tienungoon *et al.* 2000).

Listeria monocytogenes es la responsable de aproximadamente el 25% de las muertes causadas anualmente por patógenos transmitidos por los alimentos en los EE.UU. y, como consecuencia de las normativas que aplican tolerancia cero en la presencia de este organismo en productos listos para el consumo, fue responsable de 71% de todos los retiros del mercado de productos alimenticios debido a la contaminación bacteriana en los EE.UU. entre 1993 y 1998 (Cotter *et al.* 2005).

Atendiendo a las importantes consecuencias económicas y sanitarias, existe un gran interés por parte de diferentes sectores de la industria de alimentos en disponer de metodología de aplicación de las bacteriocinas con actividad anti-*Listeria* en alimentos fermentados, en los cuales la contaminación con *Listeria monocytogenes* puede representar un serio problema.

A mediados de 2003, la FSIS (Food Safety and Inspection Service) anunció una resolución que exige a fabricantes de alimentos listos para el consumo a adoptar nuevas medidas para resolver el problema planteado por la presencia de *L. monocytogenes* en productos consumibles. Esta resolución alienta a la aplicación de nuevas tecnologías que puedan inhibir a esta cepa tras el embalaje del producto terminado. Las bacteriocinas de clase IIa (anti-*Listeria*) parecen ser una solución ideal para estas aplicaciones, especialmente en productos fermentados,

donde la contaminación de *L. monocytogenes* puede ser contenida sin tener un impacto negativo en el proceso de la fermentación.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Familiarización y puesta a punto de técnicas para trabajar con bacteriocinas producidas por bacterias del ácido láctico, comprendiendo todas las etapas que conllevan la búsqueda e identificación de estos compuestos con actividad antimicrobiana.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterización de la actividad antimicrobiana de compuestos generados por cepas de bacterias ácido lácticas aisladas previamente.
- Búsqueda de metodologías para la concentración y purificación de los compuestos con actividad antimicrobiana.
- Búsqueda de cepas con actividad anti-Listeria a baja temperatura (16 °C) con el objetivo de encontrar nuevas cepas para su potencial aplicación en la industria de alimentos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

3.1.1. CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO

En la primera instancia de la investigación se trabajó con tres diferentes cepas de bacterias lácticas aisladas por Jorge Fernández del Departamento de Microbiología de la Universitat de Barcelona. Las características previamente estudiadas de las cepas en cuestión se resumen en la Tabla 3:

Cepa	V4.1	HV-4	CL-19
Lugar de aislamiento	Excremento vaca pirineo	Excremento vaca interurbana	Leche de cabra
Identificación 16S	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
Presencia gen bacteriocina CTC492	-	-	+
Efecto sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	Bactericida	Bacteriostático	Bactericida

Tabla 3 – Cepas con actividad anti-*Listeria* aisladas previamente en el Departamento de microbiología de la Universitat de Barcelona.

Se utilizaron como cepas indicadoras de la capacidad inhibitoria de las distintas cepas lácticas: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella entérica* serovar. Thyphimurium, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*. Todas cepas pertenecientes a la colección del grupo de investigación de Biología Molecular Bacteriana del Departamento de Microbiología de la Universitat de Barcelona (www.ub.edu/molmicroub)

El crecimiento de las bacterias lácticas se realizó en el medio **MRS** (peptona 10 g/L, extracto de carne 8 g/L, extracto de levadura 4 g/L, glucosa 20 g/L, acetato de sodio 5 g/L, triamonio citrato 2 g/L, sulfato de Magnesio 0.2 g/L, sulfato de manganeso 0.05 g/L, fosfato dipotásico 2g/L, polisorbato 80 1 g/L) a 30 °C o 16 °C. Las cepas indicadoras fueron crecidas en **TSB** (triptona 17 g/L, peptona de soja 3 g/L, NaCl 5.0 g/L, Na₂HPO₄ 2.5 g/L, dextrosa 2.5 g/L), en **Luria Broth - LB** (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) o en **TSA** (triptona 15 g/L, peptona de soja 5 g/L, NaCl 5 g/L, agar 15 g/L).

La composición de los medios fue modificada en aquellos experimentos en los cuales se evaluaba la influencia de los nutrientes en la producción del agente antimicrobiano, por lo que la variación en la composición se indicará en cada caso.

Todos los medios anteriormente citados fueron esterilizados en autoclave, durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C.

3.1.2. DETECCIÓN ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Se probaron distintas técnicas y metodologías para optimizar la visualización de la actividad inhibitoria, resultando la metodología de estría, de la gota y del pocillo las elegidas para trabajar a lo largo del proyecto.

3.1.2.1. Metodología de la Estría

Se realiza una estría de la cepa a ensayar en una placa de MRS o TSA y se incuba a la temperatura escogida (30°C o 16°C) durante 24 horas. A continuación se agrega un overlay de TSB con 8 g/l de agar inoculado con una suspensión de la cepa indicadora (0.1 ml de cultivo overnight a 37°C en TSB para el caso de *L. monocytogenes*, en MRS para el caso de bacterias lácticas o en el LB para el resto de las cepas utilizadas como indicadoras). Se vuelven a incubar las placas a 30°C por 24 h.

3.1.2.2. Metodología de la Gota

A partir de un cultivo en MRS líquido de la cepa a ensayar (estático, 30°C por 18 h) se obtiene un sobrenadante libre de células – “SLC”, mediante centrifugación a 5000 rpm por 15 minutos, recuperación del sobrenadante y filtración del mismo por membrana de 0.22 µm. Se preparan placas de TSA con un overlay de TSB con 8g/l de agar inoculado con una suspensión de la cepa indicadora (0.1 ml de cultivo overnight a 37°C en TSB). Una vez solidificado el overlay se añade una gota de 3 µL de la SLC y se incuban las placas a 30°C por 24 horas.

A modo de cuantificar la actividad antimicrobiana se realizan diluciones sucesivas y se comprueba la presencia de halo de inhibición en cada una de estas. Basado en estudios realizados por otros autores (Ambalam *et al.* 2009), se define la actividad como:

$$\text{Actividad (UA/}\mu\text{l)} = \frac{\text{Mayor dilución en la que se detecta actividad}}{\text{Volumen utilizado en la determinación (}\mu\text{l)}}$$

3.1.2.3. Metodología del Pocillo:

Se preparan placas de TSA y se agregan aproximadamente 10 mL de TSB conteniendo 8 g/l de Agar inoculado con una suspensión de la cepa indicadora (0.1 ml de cultivo overnight a 37°C en TSB). A continuación se realizan pocillos en el overlay de aproximadamente 8 mm de diámetro en donde se depositan 50 µl de la SLC de la cepa a ensayar.

3.1.3. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La estabilidad térmica fue evaluada al detectar actividad anti-Listeria tras someter los SLC de las cepas en estudio a distintos tratamientos térmicos: 37 °C por 90 min; 60 °C por 30 y 60 min; 100 °C por 15, 30 y 60 min; y a un proceso de esterilización de 15 min a 121 °C. Para determinar el pH óptimo para la actividad, las SLC fueron ajustadas a valores de pH en un rango de 2,0 a 9,0 utilizando HCl y NaOH. Se realizaron controles utilizando tampones sin SLC de modo de descartar inhibiciones no debidas al principio antibacteriano producido por las bacterias estudiadas. En todos los casos, la actividad fue determinada utilizando la metodología de la gota.

Con el propósito de evidenciar la naturaleza proteica de las sustancias antibacterianas producidas por las cepas estudiadas, las SLC correspondientes fueron tratadas con Proteinasa K y Pepsina (Merck) a una concentración final de 1 mg/ml a 37 °C por 90 minutos. Tras el tratamiento, se ensayó la actividad antimicrobiana para las distintas soluciones utilizando la metodología de la gota anteriormente descrita. A modo de control, las SLC con y sin enzimas, así como soluciones de las enzimas fueron expuestas a las mismas condiciones.

3.1.4. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Las electroforesis en geles de poliacrilamida en Tris-Tricina-SDS fueron las más usadas a lo largo de este trabajo ya que estos geles permiten obtener una mayor resolución en la separación de proteínas de bajo peso molecular. Estos geles están formados por 3 fases: fase de compactación (4% de acrilamida y ocupa un 1/4 del largo del gel), fase de espaciamento (10% de acrilamida y 1/4 del largo del gel) y fase de separación (16% de acrilamida y ocupa la mitad del gel). A continuación, se especifican los componentes y cantidades utilizadas para la preparación del gel Tris-Tricina-SDS para un equipo Miniprotean II Biorad:

	F. Separación	F. espaciamento	F. compactación
Acrilamida/bis (49.5% T 3% C)*	1 ml	0.3 ml	0.15 ml
Tampón de gel **	1 ml	0.5 ml	0.45 ml
Glicerol 50%	0.8 ml	-	-
Agua bidestilada	0.2 ml	0.7 ml	1.26 ml
APS 10%	20 μ l	10 μ l	15 μ l
TEMED	4 μ l	2 μ l	3 μ l

* Acrilamida/bis 49.5% T 3% C: 48g de acrilamida y 1.5g de bisacrilamida en 100 ml de agua bidestilada (filtrar y conservar a 4°C)

** Tampón de gel: 3M Tris-HCl, 0.3% SDS, pH 8.45

La separación electroforética de proteínas se realiza utilizando tampones diferentes en el ánodo y en el cátodo, que se describen a continuación:

Tampón de recorrido	
Tampón ánodo	Tampón cátodo
0.2 M Tris-HCl pH 8.9	0.1 M Tris-HCl 0.1 M Tricina (Merck) pH 8.25

Previamente a la electroforesis, a las muestras se añadió un volumen igual de tampón de muestra x2 (10% Glicerol, 5% β -mercaptoetanol, 2.3% SDS, 62.5 mM Tris-HCl, 0,1% azul de bromofenol, pH 6.8) y se incubó por 5 minutos a 100°C. Tras ser cargadas las muestras, se aplicó un voltaje de 40 V hasta que el frente de corrida superó la fase de compactación, tras lo cual se incrementó el voltaje a 100 V.

Como marcador de peso molecular se utilizó el “Precision Plus Protein Standards” de BioRad, que está compuesto por una mezcla de proteínas recombinantes con los siguientes pesos moleculares (en kDa): 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 y 250.

3.1.5. TINCIÓN DE GELES DE PROTEÍNAS

3.1.5.1. Tinción de proteínas con Azul de Coomassie

La tinción se realizó incubando el gel en la solución de tinción durante un mínimo de 30 minutos y un máximo de 12 horas, en agitación y a temperatura ambiente. El posterior desteñido del gel se llevó a cabo realizando una serie de lavados con una solución de ácido acético al 10%, permitiendo de este modo visualizar las bandas correspondientes a proteínas.

Solución de Tinción	
Azul brillante de Coomassie® R-250 (Fluka)	0.5%
Ácido acético glacial (Panreac)	10%
Isopropanol (Merck)	25%
Filtrar	

3.1.5.2. Tinción de proteínas con Nitrato de Plata

Para la tinción con nitrato de plata se incubaron los geles durante 15 minutos en una solución 50% metanol y 10% ácido acético. Luego, una segunda incubación en 5% metanol y 7% ácido acético durante 30 minutos. Posteriormente se fijaron las proteínas mediante la incubación de los geles en glutaraldehído al 0.5% durante un período no inferior a 30 minutos. A continuación, se realizaron 3 lavados en agua bidestilada de 30 minutos cada uno, una incubación de 30 minutos en una solución acuosa de ditiotreitól al 0.0005% y una incubación en una solución de AgNO_3 al 0.1% durante 30 minutos. Para eliminar el exceso de AgNO_3 se realizaron 2-3 lavados cortos en agua bidestilada. El revelado se llevó a cabo incubando el gel en la solución de revelado (esta solución debe cambiarse cada vez que adquiere una tonalidad oscura). En el momento que se observaron las bandas con la tonalidad adecuada se detuvo el revelado con ácido acético al 10%.

Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente y con agitación suave.

Solución de Revelado	
Formaldehído (Panreac)	0.0185%
Na_2CO_3 (Panreac)	3%

3.1.6. ESTIMACIÓN PESO MOLECULAR DE LOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

El método utilizado para estimar el peso molecular de las posibles bacteriocinas consistió en una adaptación del método descrito por Bunhia (1992). En primer lugar, se obtuvo un SLC creciendo la cepa V4-1 en MRS modificado (MRS sin Tween). 15 µl de este sobrenadante parcialmente purificado con un 30% de sulfato de amonio y concentrado mediante liofilización fueron analizadas mediante electroforesis en gel de Tris-Tricina-SDS como se describió anteriormente. Tras la electroforesis, el gel fue teñido durante 30 min con Comassie R250 y desteñido aproximadamente por 1,5 h. A continuación, el gel fue equilibrado en agua desionizada por aproximadamente 3 horas y colocado sobre una superficie de medio TSA. Posteriormente, se añadió sobre el gel un overlay de TSB conteniendo 8 g/L de agar inoculado con *Listeria monocytogenes* (0.1 ml de cultivo overnight a 37°C por cada 1 ml de TSB) y se incubó a 30 °C durante 18-20 horas. La aparición de un halo de inhibición permitía estimar el peso molecular de la sustancia con capacidad antimicrobiana.

3.2. CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN Y MODO DE ACCIÓN DE LA SUSTANCIA ANTIMICROBIANA

3.2.1. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN

Se inoculó 1 ml de un cultivo crecido durante 18h de las respectivas cepas de estudio (CL-19 y V4-1) en un erlenmeyer conteniendo 50 ml de caldo MRS. Este fue incubado a 30 °C con agitación suave durante 10 h. Aproximadamente cada hora se recogieron muestras y se determinó la densidad óptica a 600nm y la actividad antibacteriana del SLC.

3.2.2. MODIFICACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Para estudiar la influencia de los nutrientes en el crecimiento y la producción de actividad antimicrobiana de las cepas V4-1 y CL-19, se realizaron curvas de crecimiento en los siguientes medios de cultivo:

- TSA sin agar (TSA líq.)
- TSA líq. + 2% de fructosa
- TSA líq. + 2% de glucosa

- TSA líq. + 4% de glicerol
- MRS

Previo a la incubación se adaptaron las cepas al medio TSA líq. mediante la realización de 2 cultivos sucesivos de 24h en dicho medio. Se inocularon 50 ml de los distintos medios con 1 ml de una suspensión bacteriana en proveniente de 1 ml de los cultivos adaptados en TSA líq. tras ser centrifugados y las células lavadas con solución salina. Tras la inoculación, los cultivos se incubaron a 30 °C con agitación suave (140 rpm). A intervalos regulares se tomaron muestras para la determinación de la densidad óptica (600 nm) y para la detección de actividad antimicrobiana utilizando la metodología de la gota.

3.2.3. MODO DE ACCIÓN

Para determinar si el modo de acción del principio activo producido por la cepa V4-1 era bactericida o bacteriostático se realizaron estudios *in Vitro*. El ensayo fue realizado agregando 0,5 ml del SLC concentrado (concentración por liofilización, 20 veces) en 20 ml de caldo TSB inoculado con 0,8 ml de un cultivo overnight de *Listeria monocytogenes*. La adición de los SLCs se realizaron a diferentes tiempos a lo largo de la curva de crecimiento: 0h (inoculación), 3h y 5h. La incubación se realizó a 30 °C, manteniendo una agitación suave (140 rpm) y el crecimiento fue seguido a través de medidas de densidad óptica (600 nm) cada una hora.

Se realizó un segundo ensayo para confirmar el efecto bactericida del SLC de V4-1. Para esto, aproximadamente 10^5 células/ml de *L. monocytogenes* provenientes de un cultivo en fase exponencial fueron inoculados en el SLC obtenido. El sobrenadante fue suplementado con una dilución 1/20 de TSB concentrado (10x) e incubado a 30 °C. A diferentes tiempos se realizó el recuento de viables para estudiar la evolución de la *Listeria* en presencia del SLC de la cepa V4-1. Se hicieron controles inoculando y realizando recuentos en el medio de cultivo y en el SLC de una cepa de *Lactobacillus curvatus*.

3.3. CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO CON ACTIVIDAD ANTI-LISTERIA

3.3.1. PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO Y DIÁLISIS

Con el propósito de concentrar y purificar el principio activo con actividad antimicrobiana, se realizaron precipitaciones con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido a distintas concentraciones (20%, 30%, 40%, 60% y 80%). Para esto, se agregaron las cantidades correspondientes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al SLC de la cepa a estudiar de forma muy lenta y en agitación continua. La muestra fue incubada a 4 °C durante al menos 1 hora con agitación continua. A continuación se realizó una centrifugación a 10000g por 30 minutos a 4 °C. Los precipitados obtenidos tras la centrifugación fueron disueltos en agua bidestilada.

Con el propósito de eliminar las trazas de sulfato de amonio, las soluciones recuperadas fueron dializadas. Para esto se utilizaron membranas de celulosas previamente preparadas, en las cuales se colocó aproximadamente 4 ml de la muestra y se incubaron toda la noche a 4 °C en aproximadamente 4 l de buffer de fosfato de sodio (20 mM, pH 5,5). El tampón de diálisis fue cambiado en una ocasión.

3.3.2. VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA

Para determinar la cantidad de proteína presente en una muestra se utilizó el método descrito por Bradford en 1976. Para esto se trabajó con el producto comercial “Protein Assay Dye Reagent Concentrates” (Biorad) según las indicaciones del fabricante.

A partir de una solución de BSA (Promega) concentrada a 10 mg/ml, se preparó un banco de diluciones a 25, 12,5, 6,25, 3,125 y 1,56 ($\mu\text{g}/\text{ml}$). La recta patrón se construyó a partir de 0,8 ml de estas diluciones más 0,2 ml del reactivo de Bradford, quedando así definida una recta de concentraciones de 20, 10, 5, 2,5, 1,25 ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Para valorar la concentración proteica de las muestras se añadieron entre 5 y 50 μl de éstas, más 0,2 ml del reactivo de Bradford y se completó con agua destilada hasta un volumen final de 1 ml.

A continuación, se realizó la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm de las muestras como de las soluciones patrones. Tras realizar la curva patrón, la concentración de proteína de las muestras se determinó por extrapolación de los valores de $\text{DO}_{595\text{nm}}$.

3.3.3. LIOFILIZACIÓN

Con el objetivo de concentrar las muestras de los SLC obtenidos se realizaron liofilizaciones. Para esto, se congelaron las muestras a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se procedió a su liofilización utilizando el equipo CRYODOS-80 (Telstar).

3.3.4. ULTRAFILTRACIONES

Las ultrafiltraciones de muestras con volúmenes inferiores a 15 ml fueron realizadas en los filtros “Amicon Ultra” de celulosa regenerada con tamaños de exclusión de 3,000, 10,000 y 50,000 Da (Millipore), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para volúmenes mayores se utilizaron filtros de tamaño de exclusión de 10,000 Da “Centricon Plus -70, Ultracel PL-70” (Millipore) según las especificaciones del producto.

Se realizaron filtraciones de los SLC, los SLC concentrados y de los SLC sometidos a tres tratamientos diferentes con el fin de favorecer la desagregación proteica: 8 M Urea, 1.5 M NaCl y por último, 0,1% SDS.

3.3.5. TÉCNICAS DE CROMATOGRAFÍA

3.3.5.1. Gel Filtración

Se utilizaron columnas de Sephadex G-25 (PD-10, Amersham Biosciences), siguiendo las indicaciones del fabricante (“Gravity protocol”). Como tampón de equilibrio y elución se utilizó acetato de amonio 30 mM (pH 5,0). Se recogieron 21 fracciones de aproximadamente 0,25 ml que fueron analizadas mediante una electroforesis de proteínas (Tris-Tricina-SDS) y mediante la metodología de la gota para comprobar su actividad antimicrobiana.

3.3.5.1. HPLC – Exclusión peso molecular

El SLC concentrado (500 μL) mediante precipitación con sulfato de amonio (30%) y liofilización, fue pasado a través de un filtro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ e inyectado en una columna Ultrahydrogel 120 ($6\text{ }\mu\text{m}$, $7.8 \times 300\text{ mm}$). La fase móvil utilizada fue una solución 97% NaH_2PO_4 (1%) + 3% Acetonitrilo, y se utilizó un flujo de elución de $0,4\text{ ml/min}$ cuya absorbancia a la salida fue monitorizada mediante determinación de la absorbancia a 210 nm . Se recogieron

fracciones cada 2 minutos, las cuales fueron concentradas por liofilización y posteriormente analizadas mediante la metodología de la gota para comprobar su actividad antimicrobiana.

3.3.5.1. HPLC – Cromatografía de Intercambio Catiónico

Para llevar a cabo la preparación del SLC para la cromatografía de intercambio catiónico se siguió el protocolo realizado por Ohmomo *et al.* (2000). El SLC de la cepa V4-1 crecida en MRS por 6 h a 37°C, fue concentrado aproximadamente 13 veces mediante ultrafiltración (Membrana 10,000 MWCO) y luego liofilizado. Finalmente, se restituyó la muestra utilizando un buffer de fosfato de sodio 30 mM (pH 6,0) y se determinó su concentración proteica utilizando el método de Bradford.

El SLC obtenido fue diluido e inyectado en una columna Mono STM HR 5/5 (1 ml, Amersham Biosciences) y se realizaron diferentes pruebas modificando el flujo, la fase móvil, y la concentración del SLC inyectado. Las distintas condiciones de operación se resumen en la tabla a continuación:

Prueba N°	Dilución SLC	Fase móvil	Flujo
1	1/2	Fosfato de sodio 50 mM, pH 6.7	1 ml/min
2	1/2	Fosfato de sodio 5 mM, pH 6.7	1 ml/min
3	1/10	Fosfato de sodio 50 mM, pH 8.5	0,5 ml/min
4	1/10	Formiato sódico 50 mM, pH 3.5	0,5 ml/min
5	1/10	Gradiente lineal de Formiato de sodio (0-50 mM) en H ₂ O con ácido fórmico (pH 3.5)	0,5 ml/min
6	1/2	Gradiente lineal de Formiato de sodio (0-50 mM) en H ₂ O con ácido fórmico (pH 3.5)	0,5 ml/min
7	1/10	Gradiente lineal de NaCl (0-0,5 M) en fosfato de sodio 30 mM (pH 6.0)	0,5 ml/min
8	2/3	Gradiente lineal de NaCl (0-0,5 M) en fosfato de sodio 30 mM (pH 6.0)	0,3 ml/min

Las proteínas en el efluente de la columna fueron monitorizadas mediante la determinación de absorbancia a 280 nm. Se recogieron fracciones de las pruebas N°6 y N°8 y fueron analizadas mediante la metodología de la gota para comprobar su actividad antimicrobiana. Finalmente, de las fracciones activas se realizó una electroforesis en Tris-Tricina-SDS.

3.4. DETECCIÓN DE GENES DE BACTERIOCINAS PREVIAMENTE DESCRITAS

Para la detección de los genes codificantes para las bacteriocinas: Enterocina B, Enterocina P y Bacteriocina T8, se realizaron ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando parejas de primers específicos para la amplificación de los genes que codifican para las bacteriocinas indicadas. Se realizaron para cada caso dos PCR, una que contenía únicamente los primers diseñados para estas bacteriocinas, y otra que contenía estos primers más los cebadores utilizados para la amplificación del ARNr 16S. Las secuencias de los primers utilizados se muestran a continuación:

Gen	Nombre Primer	Secuencia	Tamaño de fragmento esperado
Enterocina B	EntB_F	5'-GAAAATGATCACAGAATGCC-3'	119 pb
	EntB_R	5'-GCTAGTGGTCCTTTTGGGA-3'	
Enterocina P	EntP_F	5'-CTACGCGTTCATATGGTAATG-3'	131 pb
	EntP_R	5'- TCCCATACCTGCCAAACC-3'	
Bacteriocina T8	BactT8_F	5'- GGAACTTGTCTAGCTGGCATC-3'	177 pb
	BactT8_R	5'- CCTTCTAGGTGCCCATGGAC-3'	
16S rARN	27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	1500 pb
	1492R	5'-TACGCTTACCTTGTACGACTT-3'	

M = C:A, Y = C:T

La PCR se realizó utilizando reactivos suministrados por Fermenta siguiendo las indicaciones adjuntas.

Mezcla de reacción (Vol. Final 25 µl)
12,5 µl Master Mix 2x (Fermentas)
1 µl De cada primer (10 µM)
1 µl Muestra (Resuspensión colonia en H ₂ O _{bd})
Agua bidestilada hasta completar volumen final de 25 µl

Se utilizó el termociclador “Mastercycler personal” (Eppendorf) con el siguiente programa de amplificación:

Programa termociclador
5' 95°C x 1
30" 95°C / 1' 52°C / 1'30" 72°C x 30
7' 72°C
∞ 4°C

Para la visualización de los productos obtenidos se realizaron análisis electroforéticos en geles de agarosa al 2%. Para esto se cargaron las muestras con el volumen correspondiente de tampón de muestras x5 (1/5 volumen) en el gel y se llevó a cabo la electroforesis en una cubeta horizontal MUPID-2 de Cosmo Bio con tampón TBE x0,5. Se aplicó un voltaje de 100 V por aproximadamente 35 segundos.

Para determinar el tamaño y cuantificar el ADN presente, se cargó en los geles 3 μ l de los marcadores de peso molecular GeneRuler 50 pb y 1 kb DNA Ladder plus ready to use (Fermentas).

TBE (x 5)	
Tris (Roche)	450 Mm
Ácido Bórico (BioRad)	450 mM
EDTA (Merck)	10 mM

Tamaño fragmentos del marcador tamaño molecular (pb)
50 pb ladder (Fermentas): 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000
1 kb ladder (Fermentas): 75, 200, 300, 400, 500, 700, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 7000, 10000, 20000

Para la visualización de las bandas se realizó, tras la electroforesis, la tinción del ADN con bromuro de etidio (Merck). El gel se sumergió durante 15-30 minutos en una solución de bromuro de etidio preservada de la luz y preparada en tampón TBE x0.5 a una concentración de 0.5 μ g/ml. Una vez teñidos los geles se observaron con luz ultravioleta.

3.5. BÚSQUEDA DE NUEVAS CEPAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

A partir de muestras de plantas y abono orgánico extraídas de un jardín exterior, se realizaron diluciones seriadas en solución salina (Ringer ¼: NaCl 2.25g/l, KCl 0.105 g/l, CaCl 0.12 g/l, NaHCO₃ 0.05 g/l) y se sembraron en placas de MRS. Las placas fueron incubadas a 16°C por 5 días. De estas placas se seleccionaron numerosas colonias con distintas morfologías y se reaislaron en MRS. A las colonias aisladas se les realizó la prueba catalasa, se les determinó la morfología celular mediante observación microscópica y se les hizo la tinción gram. Todos los

aislamientos catalasa – y gram + fueron analizados para determinar su capacidad de inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* mediante la metodología de la estría anteriormente descrita.

3.5.1 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE ADN RIBOSOMAL

Para la identificación de las cepas se llevó a cabo la secuenciación de un fragmento de la secuencia codificante para el ARN16S y su posterior comparación en base de datos, lo que permitió la identificación a nivel de especies. Este proceso requiere de un primer paso de amplificación por PCR de la secuencia codificante para el ARN16S y a continuación la secuenciación del fragmento amplificado.

3.5.1.1. Amplificación por PCR del 16S rADN

Para la amplificación del 16S rADN se utilizaron dos primers universales que permiten la amplificación de secuencias codificantes para ARN16S en la mayoría de las eubacterias:

27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
1492R	5'-TACGCTACCTTGTACGACTT-3'

M = C:A, Y = C:T

La amplificación fue realizada utilizando el kit Illustra Pure Taq ready-to-go PCR beads (GE), según las indicaciones del fabricante y un termociclador “Mastercycler personal” (Eppendorf) con el siguiente programa de amplificación:

Programa termociclador
5' 94°C x 1
1' 94°C / 1' 55°C / 1'30" 72°C x 25
4' 72°C
∞ 4°C

Mezcla de reacción (Vol. Final 25 µl)
Perla con componentes de PCR liofilizados
22 µl Agua bidestilada
1 µl Primer 27F (10 µM)
1 µl Primer 1492R (10 µM)
1 µl Muestra (Resuspensión colonia en H ₂ O _{bd})

3.5.1.2. Visualización producto de PCR

Para comprobar la pureza del producto de PCR obtenido se realizaron análisis electroforéticos en geles de agarosa al 0.8%. Para esto se cargaron las muestras con el volumen correspondiente de tampón de muestras x5 (1/5 volumen) en el gel y se llevó a cabo la electroforesis en una cubeta horizontal MUPID-2 de Cosmo Bio con tampón TBE x0,5. Se aplicó un voltaje de 100 V por aproximadamente 30 segundos.

Para determinar el tamaño y para cuantificar el ADN presente, se cargó en los geles 3 μl del marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder plus ready to use (Fermentas).

Para la visualización de las bandas, tras la electroforesis se realizó la tinción del ADN con bromuro de etidio (Merck). Una vez teñidos los geles se observaron con luz ultravioleta.

3.5.1.3. Secuenciación producto de PCR

Si el producto de amplificación era mayoritario y no se detectaban bandas de amplificación inespecíficas, el producto de PCR fue purificado utilizando el kit QiaQuick PCR purification (QIAGEN). Cuando se detectaban varios productos de amplificación, el producto deseado atendiendo a su tamaño molecular fue purificado de un gel de agarosa utilizando el kit Qiaquick Gel Extraction (QIAGEN).

El ADN se secuenció por el método de Sanger (Sanger y Coulson, 1975) utilizando el kit de secuenciación BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems), que proporciona una mezcla de reacción que contiene la polimerasa termoestable, los dideoxinucleótidos marcados, nucleótidos y el tampón necesario para la reacción. Se realizaron dos reacciones para cada muestra, una con el primer 27F y otra con el 1492R. Se utilizó el termociclador “Mastercycler personal” (Eppendorf) con el siguiente programa de amplificación:

Programa termociclador
1' 96°C x 1
10'' 96°C / 5'' 50°C / 4' 60°C x 25
∞ 4°C

Mezcla de reacción (Vol. Final 10 μl)	
5 μl	Producto de amplificación por PCR
1 μl	Buffer
0.5 μl	Primer (10 μM)
1 μl	Ready premix BigDye 3.1
2.5 μl	Agua bidestilada

Finalmente, las muestras fueron enviadas para ser analizadas en el secuenciador de los Serveis Científico-Técnicos de la Universitat de Barcelona.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-LISTERIA

En esta primera instancia del trabajo se realizaron estudios sobre las cepas CL-19 (*Enterococcus faecium*), V4-1 (*Enterococcus faecium*) y HV-4 (*Streptococcus uberis*), todas ellas previamente aisladas y pertenecientes al grupo de Biología Molecular Bacteriana del Departamento de Microbiología de la Universitat de Barcelona. En estudios previos se había detectado que estas cepas presentaban una actividad inhibitoria de *Listeria monocytogenes*, por lo que se decidió determinar la naturaleza y características de este compuesto antimicrobiano.

Con el propósito de evaluar la actividad de estas cepas se utilizaron tres metodologías diferentes según el estudio a realizar: metodología de la estría, metodología del pocillo y metodología de la gota (Fig. 3).

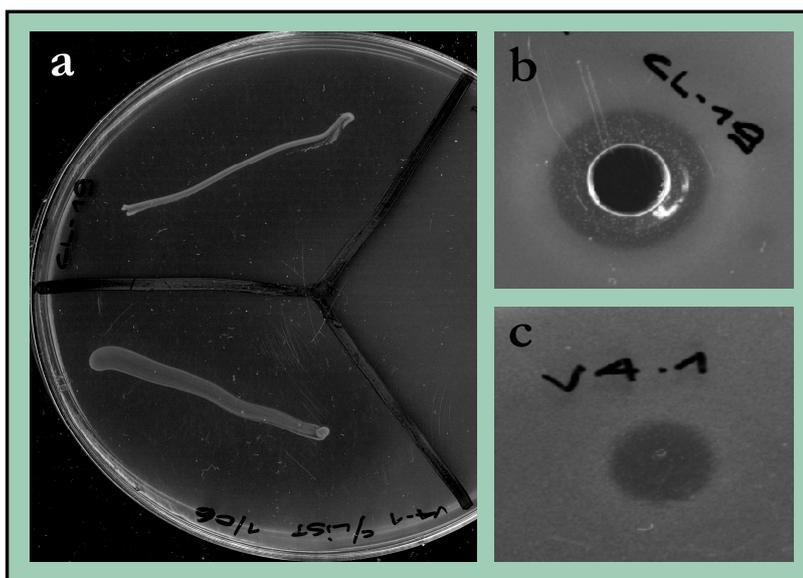


Figura 3 – Visualización actividad inhibitoria frente a *Listeria monocytogenes*.
a) Estría, b) Pocillo, c) Metodología de la gota

Como se puede ver en la Figura 3, la actividad antimicrobiana se observa como un halo de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes*. La metodología de la estría permite detectar rápidamente la capacidad de una cepa de inhibir el desarrollo del microorganismo indicador. Sin embargo, con las metodologías del pocillo y de la gota se debe trabajar con el sobrenadante libre de células – "SLC", por lo que requiere la realización de un cultivo en medio líquido previo a la realización del ensayo de determinación de la actividad antimicrobiana. En las tres cepas se detectó actividad en el SLC, indicando que el principio con actividad antimicrobiana producido por todas las cepas, es un compuesto extracelular que es liberado al medio.

Con el objetivo de cuantificar la actividad antimicrobiana de cada cepa frente a *Listeria monocytogenes* y de este modo realizar estudios comparativos, se utilizó la definición arbitraria de actividad que se muestra en la Figura 4, la cual está basada en la determinación de la actividad antimicrobiana de diluciones seriadas de los correspondientes SLC. Como se puede observar de los valores obtenidos, la cepa HV-4 presenta una actividad relativamente menor que las otras dos cepas. Esta cepa, HV-4, fue identificada como *Streptococcus uberis* es uno de los patógenos responsables de la mastitis bovina. Por lo tanto, no resulta una cepa muy atractiva para una posible aplicación biotecnológica en el área alimentaria atendiendo a su potencial patogénico. La cepa CL-19, es buena productora de agentes antimicrobianos. No obstante, un estudio previo en el grupo de investigación, se ha detectado que presenta el gen que codifica la Enterocina A, una bacteriocina ampliamente estudiada. Por estas razones, se decidió estudiar más exhaustivamente las propiedades de la cepa V4-1, que se trata de una cepa supuestamente desconocida (en ciertos ensayos se utilizó la cepa CL-19 a modo de control).

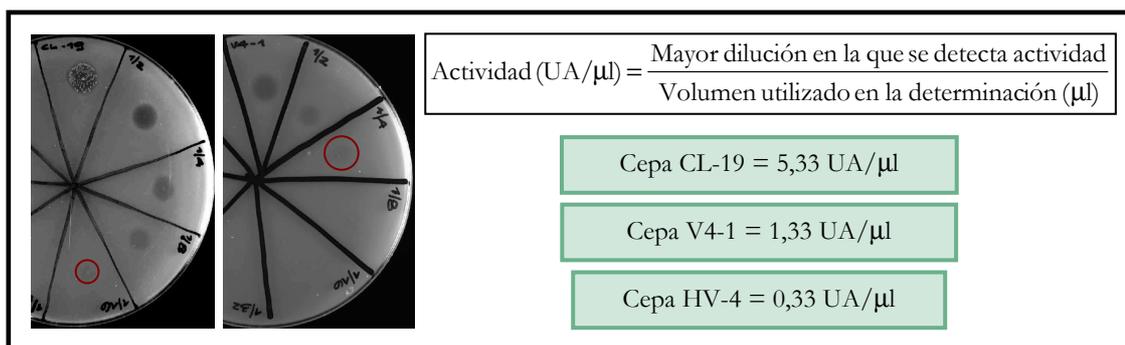


Figura 4 – Determinación semicuantitativa de la actividad frente a *Listeria monocytogenes*.

4.1.1. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD

La actividad antimicrobiana de los SLC fue totalmente eliminada al someterlos a tratamiento con Proteinasa K o con Pepsina, evidenciando de este modo la naturaleza proteica del compuesto con actividad antimicrobiana, y sugiriendo que se trata de una bacteriocina.

Por otro lado, se realizaron estudios de estabilidad de la actividad anti-*Listeria* en los SLC frente a diferentes temperaturas y distintos valores de pH, cuyos resultados se muestran en las Tablas 4 y 5.

Tratamiento	Actividad relativa (%)	
	CL-19	V4-1
37°C, 90 min	100%	100%
60 °C, 30 min	100%	100%
60 °C, 60 min	100%	100%
100 °C, 15 min	100%	100%
100 °C, 30 min	100%	100%
100 °C, 60 min	100%	75%
Esterilización (121°C, 20 min)	100%	25%

Tabla 4 – Sensibilidad del principio con actividad anti-Listeria a tratamientos con temperatura.

pH	Actividad relativa (%)	
	CL-19	V4-1
2,0	100%	100%
3,0	100%	100%
4,0	100%	100%
5,0	100%	100%
6,0	100%	100%
7,0	100%	100%
8,0	100%	100%
9,0	100%	100%

Tabla 5 – Sensibilidad del principio con actividad anti-Listeria a diferentes pH's

En la Tabla 4, se puede observar la gran estabilidad de la actividad anti-Listeria de ambas cepas a los tratamientos con temperatura. El SLC de la cepa CL-19 se mantuvo estable en todos los tratamientos realizados, mientras el SLC de la V4-1 mostró una disminución significativa de la actividad en el tratamiento más severo, el ciclo de esterilización en autoclave (121 °C, 20 min). Con respecto a la estabilidad a distintos valores de pH, se comprobó (Tabla 5) que la actividad antimicrobiana se mantenía en un rango de pH de 2,0 a 9,0.

La gran estabilidad presentada a los distintos tratamientos realizados concuerda con las características que presentan las bacteriocinas pertenecientes a la Clase II debido a su estructura química (Cotter *et al.* 2005). Se ha de resaltar que el hecho de que la actividad se mantenga tras tratamientos relativamente exigentes de temperatura y a distintos pH's, resulta muy interesante a la hora de pensar en una potencial aplicación industrial de dichos compuestos.

4.1.2. PRODUCCIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

En las Figura 5 se muestran las curvas de crecimiento y la cinética de producción de la actividad antimicrobiana de las cepas CL-19 y V4-1, en el medio MRS a 30 °C. Como se puede observar en los gráficos, la actividad de ambos SLC es dependiente de la fase de crecimiento, comenzándose a detectar actividad en la fase exponencial. La máxima actividad se detectó, para ambas cepas, al comienzo de la fase estacionaria. El hecho que la actividad se mantenga constante a lo largo de la fase estacionaria sugiere que la producción del mismo se da únicamente a lo largo de la fase exponencial ya que, atendiendo a la elevada estabilidad de esta molécula, si continuase expresándose en fase estacionaria se esperaría que se produjese un incremento paulatino de la cantidad del principio activo. Este resultado ha sido reportado por otros investigadores, por

ejemplo en el trabajo de Samelis *et al.* 1994 con Sakacin B o por Cintas *et al.* 1997 al trabajar con la Enterocina P.

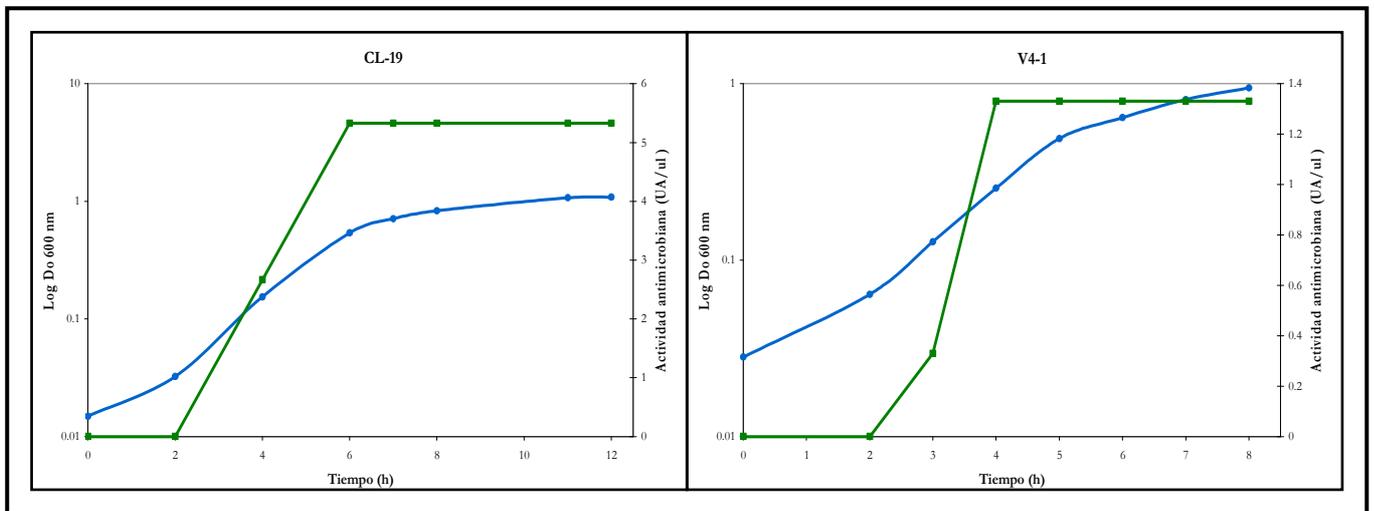


Figura 5 – Curvas de crecimiento y producción de compuesto con actividad anti-*Listeria* de las cepas V4-1 y CL-19. (●) Crecimiento bacteriano. (■) Actividad antibacteriana del SLC detectada utilizando la metodología de la gota.

Con el objetivo de poder estudiar el efecto del medio de cultivo en la producción de actividad antimicrobiana, se realizaron curvas de crecimiento de las cepas CL-19 en MRS y en TSA líq. (TSA sin agar) modificado con distintas fuentes de carbono y se determinó en que momento se detectaba la actividad antimicrobiana en el SLC (Figura 6 y 7).

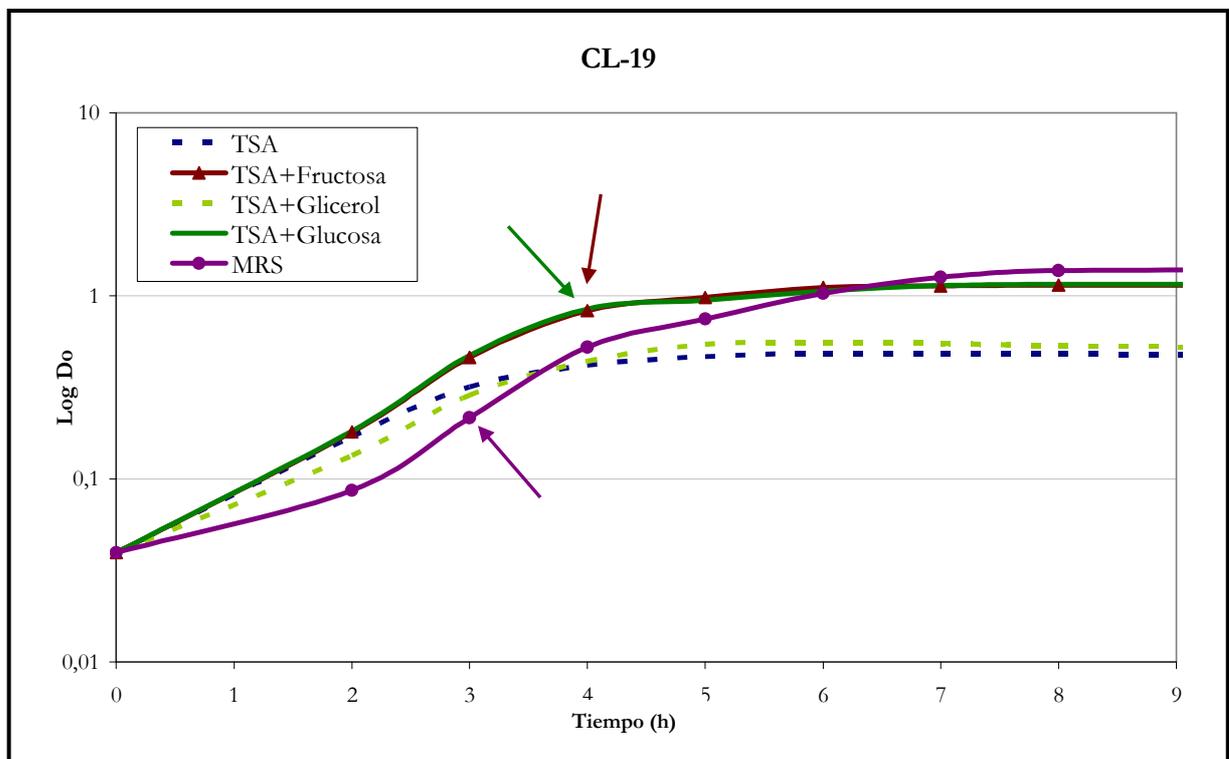


Figura 6 – Crecimiento de cepa CL-19 en medios con distintas composiciones y diferentes fuentes de carbono. Las flechas indican el momento en el cuál se comienza a detectar actividad antimicrobiana.

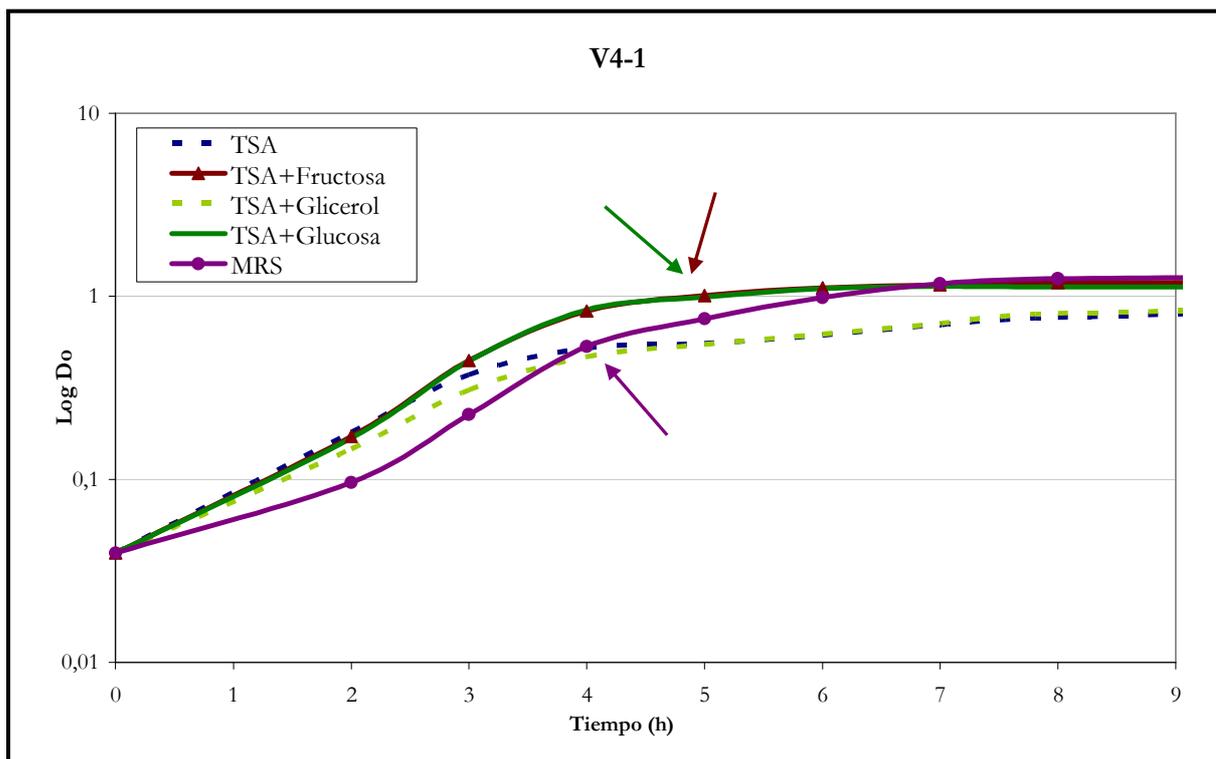


Figura 7 – Crecimiento de cepa V4-1 en medios con distintas composiciones y diferentes fuentes de carbono. Las flechas indican el momento en el cuál se comienza a detectar actividad antimicrobiana.

En primer lugar, se observó que ambas cepas crecen en todos los medios en los que se realizó el ensayo, sin embargo, el crecimiento en TSA_{líq} sin azúcar añadido y en TSA_{líq} con glicerol fue menor. A su vez, en estos medios no se detectó actividad antimicrobiana en ninguna de las fases. En los medios MRS, TSA_{líq} con Glucosa (TSA+G) y en TSA_{líq} con Fructosa (TSA+F), todos ellos con una concentración de azúcares de 2g/l, se observa un buen crecimiento y se detecta actividad antimicrobiana en los respectivos SLCs. Estos resultados sugieren que existe una dependencia de la capacidad inhibitoria a la presencia de una fuente de carbono y a la naturaleza de la misma, ya que con el medio que contenía glicerol (C₃H₈O₃) no se observó actividad antimicrobiana.

Al comparar el comportamiento en MRS, en (TSA+G) y (TSA+F), se observa que la actividad antimicrobiana se detectó antes en el medio MRS, aun cuando la biomasa bacteriana, para el mismo tiempo de incubación, era mayor en los otros medios. Así, a las 3 horas de crecimiento, se detectó actividad antimicrobiana del SLC de la cepa CL-19 en el medio MRS (DO 600 nm = 0.52), mientras que en TSA+G y TSA +F se detectó a las 4 horas (DO 600 nm = 0.84 y 0.85, respectivamente). Este resultado pone en evidencia la dependencia de la composición del medio en la actividad antimicrobiana. Si bien las fuentes de carbono y las fuentes de nitrógeno se encuentran aproximadamente equilibradas entre los tres medios, el MRS es un medio óptimo para el desarrollo de BAL que contiene gran cantidad de micronutrientes, entre los que resaltan la presencia de sales de Mg y de Mn, los cuales podrían ejercer un efecto en la presencia de

actividad en dichos cultivos. De todos modos, no es posible determinar si este efecto es sobre la producción del principio con actividad antimicrobiana o sobre la actividad del mismo, ya que el medio de cultivo podría estar afectando tanto a la cepa productora como interaccionando de algún modo con el compuesto antibacteriano haciéndolo más o menos eficiente contra las células sensibles.

Las interacciones entre sustancias químicas y bacteriocinas han sido ampliamente estudiadas (Gálvez *et al.*, 2007) demostrando que existe un gran número de posibles efectos, tanto antagónicos como favorables para la actividad antimicrobiana. Un ejemplo puede ser el efecto del NaCl (presente en TSA+G y en TSA+F pero no en el MRS), el cuál interfiere con la actividad antimicrobiana mediante interacciones iónicas con las moléculas de las bacteriocinas cambiando su conformación. Además, se cree que el NaCl podría actuar en los grupos cargados que están involucrados en la unión de la bacteriocina con la célula diana (Bhunja *et al.* 1992).

Si bien estudiar todas las variables que pueden de algún modo afectar la producción y la actividad de las bacteriocinas puede ser una tarea ardua, resultaría muy interesante conocer cuales son los factores que permiten obtener una mayor actividad a la hora de diseñar la posible aplicación en la industria alimentaria, donde las matrices presentan una composición muy compleja y variada.

4.1.3. MODO DE ACCIÓN DE LA BACTERIOCINA FRENTE A *Listeria monocytogenes*

Se realizó la adición de un concentrado del SLC de la cepa V4-1 en un cultivo de *Listeria monocytogenes* para estudiar si la acción antibacteriana se trataba de un efecto bactericida o de un efecto bacteriostático. La curva resultante se muestra en la Figura 8, donde se puede ver el efecto de la adición del SLC al comienzo del crecimiento (0h), a las 3h y a las 5h. Cuando se agregó el SLC al comienzo del crecimiento se observó una marcada disminución de la densidad óptica, indicando una lisis celular por un modo de acción bactericida. Sin embargo, cuando el agregado se realizó a las 3 y las 5h, el resultado no fue tan evidente. De todos modos, en todos los casos el crecimiento se detuvo.

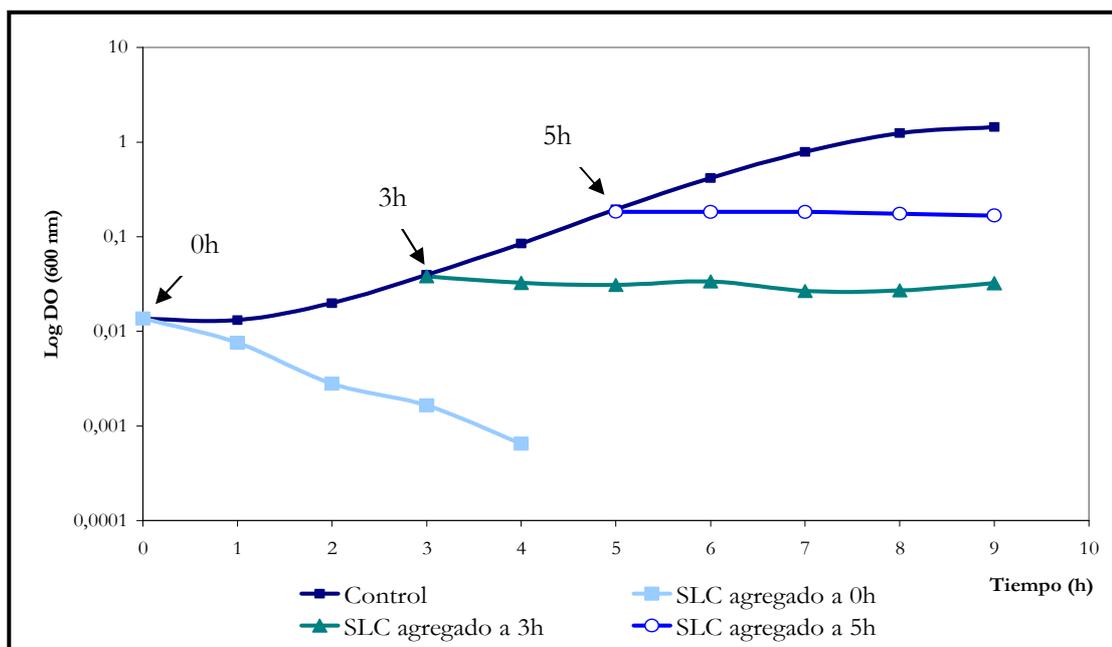


Figura 8 – Efecto del agregado de SLC en el desarrollo de *Listeria monocytogenes*.

Para confirmar el efecto bactericida de la cepa V4-1 se realizaron ensayos de determinación de células viables tras la inoculación de *L. monocytogenes* al sobrenadante libre de células (Fig. 9). Como controles negativos se utilizaron los medios de cultivo (control) y el SLC de una cepa de *Lactobacillus curvatus* (supuestamente no productora de compuestos anti-*Listeria*).

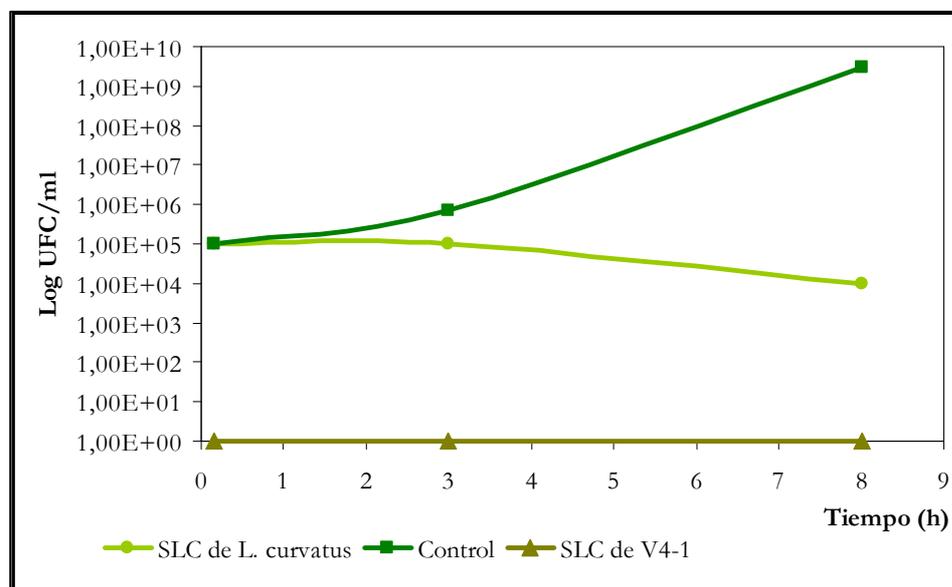


Figura 9 – Evolución de células viables de *Listeria monocytogenes* en el SLC de *L. curvatus* y de la cepa V4-1.

Los resultados obtenidos muestran que el SLC de la cepa V4-1 tiene un efecto bactericida en estas condiciones, ya que de forma inmediata a la inoculación se detecta una eliminación total de *L. monocytogenes*.

Como se comprueba en los datos obtenidos, el modo de acción de las bacteriocinas depende de la concentración y del estado fisiológico de las células sensibles. El efecto bactericida de las bacteriocinas generalmente involucra una unión a la membrana de las células diana con la consecuente formación de poros (Tomé et al, 2008). Finalmente, este proceso da lugar a la muerte celular que puede ocurrir con o sin lisis celular, dependiendo si existe una concomitante activación de las autolisinas celulares. Analizando los resultados, se observa que cuando las células se encuentran en estado estacionario (Fig. 8, t=0h) la adición del SLC concentrado produce muerte celular acompañada de una inmediata lisis de las células, mientras que en células en fase estacionaria no se detecta lisis celular. Esto puede ser debido a que la presencia de autolisinas celulares en la fase estacionaria es mayor, lo que promovería una mayor tasa de lisis celular. Al mismo tiempo, las células en fase estacionaria, a diferencia de las células en crecimiento exponencial, se encuentran más estresadas y la integridad de su membrana se halla comprometida lo que podría potenciar el efecto de las bacteriocinas (Gálvez *et al.* 2007).

4.1.4. ESPECTRO DE INHIBICIÓN DE LA CEPA V4-1

Se realizaron ensayos de inhibición del SLC de la cepa V4-1 frente a otras cepas con el propósito de poder determinar el espectro de acción. Como se puede apreciar en la Tabla 6, las pruebas fueron realizadas utilizando la metodología de la estría y la metodología de la gota.

Cepa indicadora	Cepa V4-1	
	Metodología estría	Metodología de la gota
<i>Listeria monocytogenes</i>		
<i>Salmonella</i> spp.		 *
<i>E. coli</i> O157:H7		 *
<i>Bacillus cereus</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Pediococcus pentosaceus</i>		 *
<i>Lactobacillus curvatus</i>		 *
<i>Lactobacillus sakei</i>		 *

Tabla 6 – Estudio del espectro de actividad antimicrobiana de la cepa V4-1, utilizando la metodología de la gota y de la estría.

(*) Ensayo realizado con el SLC concentrado 30 veces

En primer lugar, cabe destacar la diferencia de los resultados obtenidos por las distintas metodologías. Con todas las cepas Gram-negativas probadas se observó una muy marcada inhibición cuando se trabajó con la metodología de la estría, mientras que el SLC (concentrado por liofilización hasta 30 veces) no mostró actividad. Es muy difícil poder determinar a que se debe esta diferencia, ya que el crecimiento en medio sólido presenta características muy distintas al crecimiento en medio líquido. En el primero, la acidificación por parte del crecimiento colonial puede ser mayor, provocando una inhibición por los ácidos orgánicos producidos o quizás un posible aumento en la sensibilidad de las células al principio activo secretado por la cepa V4-1. Los ácidos orgánicos y sus sales pueden potenciar enormemente la actividad de las bacteriocinas, mientras que el aumento de acidez mejora la actividad antimicrobiana tanto de éstas como de los ácidos (Gálvez *et al.*, 2007). Estos efectos se deben principalmente a que a bajos valores de pH se produce un aumento en la carga neta de las bacteriocinas que facilita su translocación a través de la pared celular y que a su vez aumenta su solubilidad facilitando la difusión. Al mismo tiempo, la competencia por los nutrientes y la densidad celular alcanzada es mucho mayor, lo que podría dar lugar a señalizaciones por el mecanismo de “Quórum Sensing” que de algún modo podrían estar ligadas a la actividad antibacteriana.

Por otro lado, cabe resaltar que tanto los ácidos como los posibles principios activos pueden tener una acción diferente si se trata de bacterias Gram-negativas o bacterias Gram-positivas, ya que la sensibilidad de las distintas cepas suele ser dependiente de la naturaleza de las mismas. Es de pensar que la inhibición observada sea una combinación de varios factores, que pueden estar actuando en forma independiente inhibiendo el crecimiento o generando un efecto sinérgico entre sí, potenciando de este modo la capacidad inhibitoria de la cepa V4-1.

En segundo lugar, es importante resaltar la inhibición que presentó el SLC de la cepa V4-1 frente a los patógenos Gram-positivos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*. El hecho de que una cepa sea capaz de producir un principio activo que inhiba gran parte de los patógenos asociados a los alimentos, resulta prometedor para su posible aplicación como método de bioconservación. Además, como se ha comentado anteriormente el crecimiento de V4-1 también inhibe el desarrollo de patógenos Gram-negativos, por lo que hace de la cepa V4-1 una opción muy atractiva para su posible uso como método de bioconservación.

Con el objetivo de poder profundizar un poco más en la inhibición frente a Gram-negativos observada con la metodología de la estría, se realizaron pruebas frente a *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 en diferentes medios de cultivo: TSA, TSA + 2% Glucosa y MRS (Fig.10).

En la figura se pueden observar la diferencia de los halos obtenidos en los diferentes medios, siendo la inhibición producida en MRS significativamente mayor. En TSA prácticamente no se detectó actividad inhibitoria, mientras que en TSA conteniendo 2% de glucosa se observa un halo, si bien en menor medida que en MRS. El hecho que en TSA+ 2% glucosa el halo no sea tan importante sugiere que los ácidos orgánicos no serían los principales responsables de la inhibición observada, ya que estos son dependientes de la concentración de azúcares en el medio, la cual se encuentra igualada en los dos medios. Además se comprobó que la acidez alcanzada tras el crecimiento de la cepa V4-1 en los distintos medios era prácticamente idéntica (resultados no mostrados). Sin duda, se vuelve a corroborar que los componentes del medio MRS tienen influencia muy importante en la actividad antimicrobiana de la cepa V4-1.

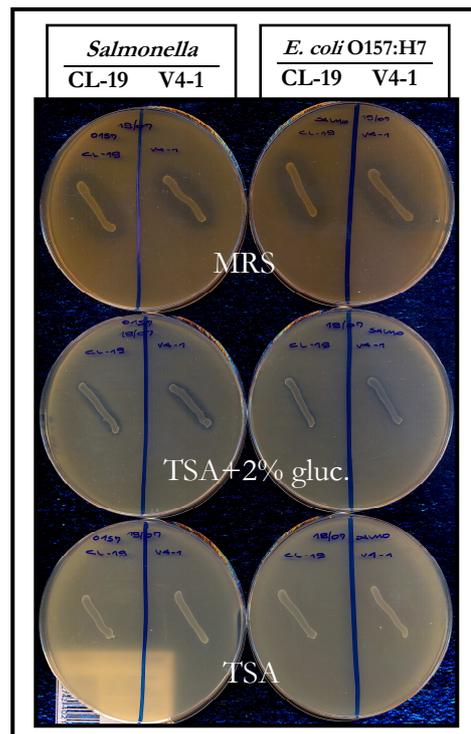


Figura 10 – Capacidad inhibitoria de las cepas CL-19 y V4-1 frente a *Salmonella enterica* serovar. thypimurium y *E.coli* O157:H7 en TSA, TSA+2%glucosa y MRS.

4.1.4. ESTIMACIÓN DEL PESO MOLECULAR DEL PRINCIPIO ACTIVO

Previamente a la determinación del peso molecular del principio activo, era necesario realizar una purificación parcial del mismo. Para esto, se realizó un fraccionamiento de las proteínas presentes en los SLC mediante precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a diferentes concentraciones: 30%, 40%, 60% y 80%, para seleccionar la fracción en que el principio activo se encontraba presente. Se realizaron geles de Tris-Tricina-SDS de las diferentes fracciones para poder evaluar la distribución y la carga de proteínas de cada una (Fig. 11).

Como se puede observar en la Figura 11 B y D, la precipitación con sulfato de amonio permitió una buena separación de proteínas, sobretodo al comparar la presencia de proteínas entre las fracciones 30/40% y 60/80%. Al determinar la capacidad inhibitoria anti-*Listeria*, se detectó actividad en todas las fracciones, especialmente en las fracciones 30 y 40% (Fig. 11 A y B).

Atendiendo a estos resultados se decidió centrarse en las fracciones obtenidas con precipitación al 30% ya que presenta una importante actividad anti-*Listeria* y una menor concentración de proteínas en comparación con el resto de fracciones. Es importante destacar también la presencia de una especie de "mancha" en la fracción del 30%, que a lo largo de los diferentes geles de Tris-Tricina-SDS realizados durante el trabajo siempre aparecía en la fracción con mayor actividad antibacteriana (resultados no mostrados).

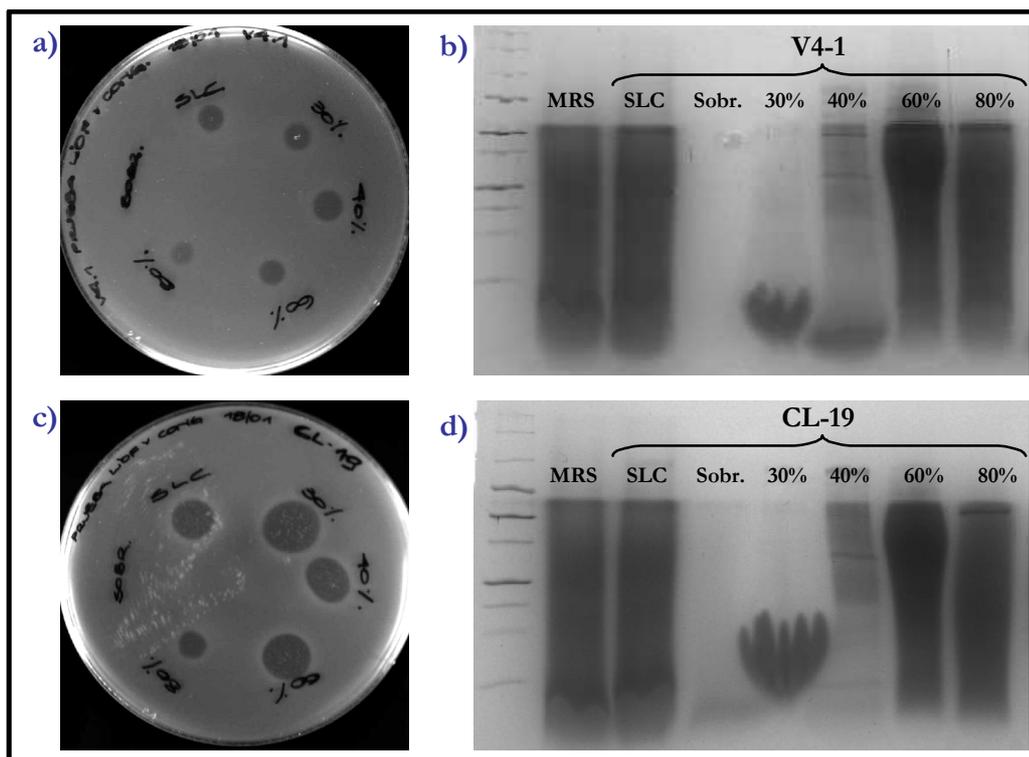


Figura 11 – Fraccionamiento proteico de los SLC mediante precipitación con sulfato de amonio.

A y C) Actividad de las distintas fracciones obtenidas tras la precipitación, diálisis y liofilización de los SLC de las cepas CL-19 y V4-1, respectivamente. **B y D)** Geles de electroforesis en Tris-Tricina-SDS teñidos con Comassie de las distintas fracciones obtenidas luego de la precipitación, diálisis y liofilización de los SLC de las cepas CL-19 y V4-1, respectivamente. También se observan los perfiles del medio de cultivo sin precipitar (MRS) y el SLC sin tratamiento. “Sobr.” Corresponde al sobrenadante obtenido tras la precipitación con un 80% de sulfato de amonio.

Para la determinación del peso molecular del principio activo se utilizó una modificación del método descrito por Buhnia (1992), que consiste en incubar el gel tras la electroforesis en un agar inoculado con *Listeria* y detectar halos de inhibición tras una incubación de 24 h a 30°C. El halo indicador de la actividad antimicrobiana se producía sobre la "mancha" (Fig. 12). Esto podría sugerir que esta banda tan importante podía corresponder al agente con actividad antimicrobiana. Esto resultaba sorprendente atendiendo a que los datos obtenidos por otros muchos grupos de investigación sugieren que las cantidades de bacteriocina producidas son muy bajas, por lo que difícilmente pueden ser detectadas mediante tinción de Comassie.

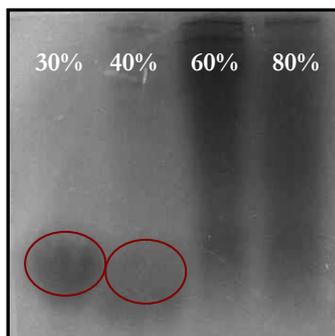


Figura 12 – Inhibición de *L.monocytogenes* presente en una sobrecapa de agar sobre un gel de Tris-Tricina-SDS que contiene el SLC de V4-1 previamente precipitado con sulfato de amonio, dializado y liofilizado.

La inhibición se divisa como un halo que está marcado con un círculo rojo. Se observa que la inhibición se produce en la zona del gel donde se encuentra la “mancha”.

Para intentar esclarecer el origen de esta banda mayoritaria en los precipitados al 30% (la “mancha”), se realizaron ensayos de precipitación con el medio MRS sin crecimiento, comprobando que la mancha se debía a algún componente del medio de cultivo (Fig. 13).

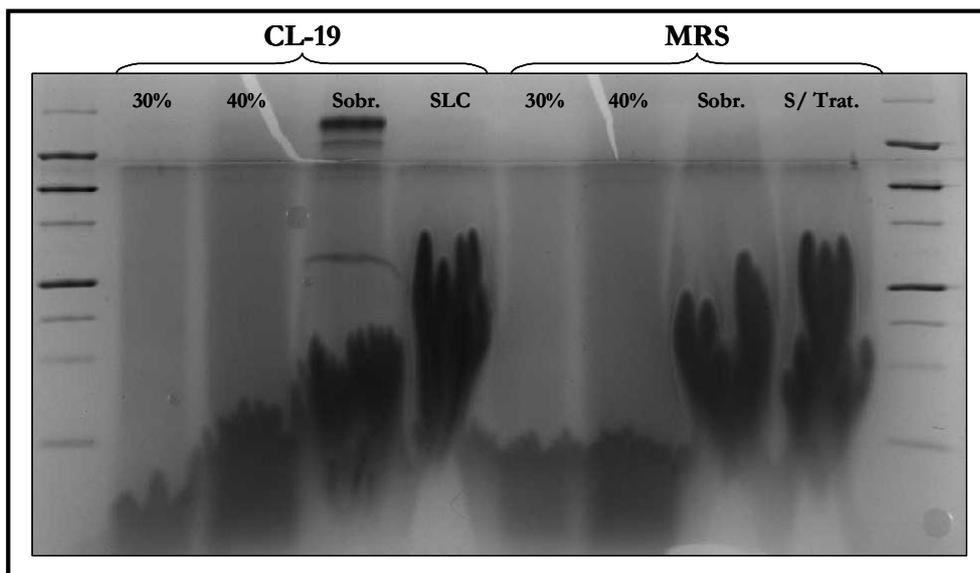


Figura 13 – Gel de electroforesis obtenido a partir de la precipitación con diferentes concentraciones de sulfato de amonio del SLC de CL-19 y del medio MRS sin crecimiento. Previo a la corrida del gel, las muestras fueron dializadas y concentradas por liofilización. Se observa la formación de manchas tanto en el SLC como en el medio de cultivo.

Por tanto, el hecho de que la actividad inhibitoria coincidiese con esta banda impedía poder asignar con certeza una masa molecular al principio con actividad anti-*Listeria*. Además, la existencia de una posible interacción entre dicho principio y este componente del MRS podría distorsionar su movilidad electroforética complicando la determinación del peso molecular.

Se hicieron ensayos modificando el medio de cultivo MRS, para intentar determinar el componente que estaba causando esta “mancha” en el gel de poliacrilamida. En primer lugar, se

probó la precipitación de MRS sin peptona (Fig. 14A), de MRS sin extracto de carne (Fig. 14B) y de MRS sin extracto de levadura (Fig. 14C); sin obtener el resultado esperado ya que en todos los casos se continuaba detectando la presencia de la mancha.

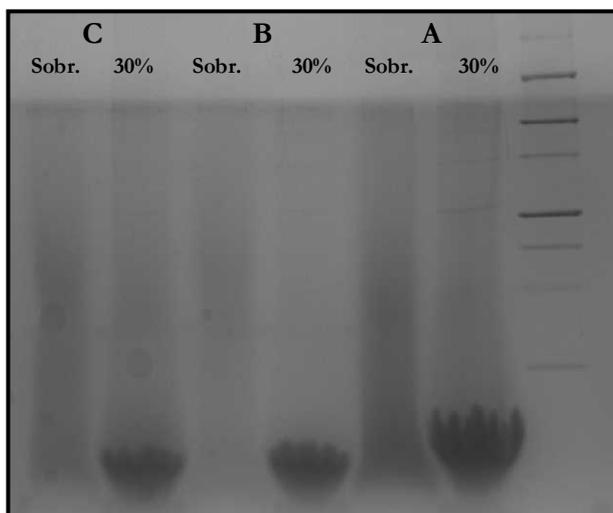


Figura 14 – Gel de electroforesis obtenido a partir de la precipitación con sulfato de amonio (30%) del SLC de la cepa V4-1 obtenido en MRS sin peptona (**A**), MRS sin extracto de carne (**B**) y en MRS sin extracto de levadura (**C**).

Finalmente se probó la precipitación del MRS sin Tween o polisorbato 80, y al realizar la electroforesis se observó que la "mancha" no aparecía, por lo que se concluyó que ésta era consecuencia de la presencia de polisorbato 80 (Fig. 15).

En la Figura 15 se pueden apreciar los halos de inhibición correspondientes al principio activo producido en MRS sin Tween y de MRS con Tween. Como se puede observar, cuando se produce la "mancha" es muy difícil poder estimar el peso molecular ya que la presencia del polisorbato 80 distorsiona el patrón de proteínas durante la electroforesis. Sin embargo, evaluando el perfil obtenido con el MRS sin Tween podemos decir que el peso molecular del principio activo es de aproximadamente 5000 Da. Este resultado confirma también la hipótesis de que el principio activo anti-*Listeria* producido por V4-1 es una bacteriocina.

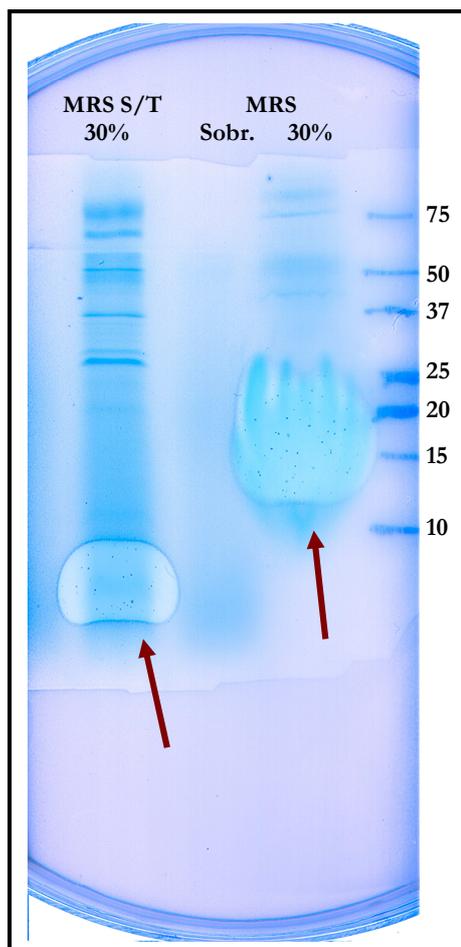


Figura 15 – Halos de inhibición (flechas) producidos al colocar el gel que contiene el SLC purificado y concentrado (precipitación y liofilización) de la cepa V4-1 en una placa con un overlay de *L. monocytogenes*. Se observan los perfiles de las fracciones obtenidas a partir del SLC de la cepa V4-1 crecida en el medio MRS y en MRS sin tween (MRS S/T).

4.2. PURIFICACIÓN DE LA BACTERIOCINA

En esta etapa del trabajo se realizaron ensayos con el propósito de purificar la bacteriocina producida por la cepa V4-1. Generalmente, la purificación de estos péptidos pequeños resulta muy compleja e involucra varios pasos de separación que incluyen etapas de cromatografía de afinidad, intercambio iónico y de fase reversa. La elección de los métodos fue basada en bibliografía donde se purificaban bacteriocinas con características similares y con el apoyo técnico de la Unitat de Tècniques Separatives d'Anàlisi de los Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona

En la Figura 16 se expone un resumen de las técnicas utilizadas y los resultados obtenidos. Como primer paso, se realizó una primera separación de las proteínas mediante

ultrafiltraciones (Fig. 16A) con membranas de 10,000 y 3,000 MWCO (“Molecular Weight Cut-Off”). Sabiendo que el peso molecular de nuestra molécula de interés rondaba los 5 kDa, se esperaba que la ultracentrifugación a través de la membrana de 10 kDa retuviese las proteínas de mayor tamaño dejando pasar al principio anti-Listeria. Sin embargo, mediante estudios de actividad se pudo ver que el compuesto de interés quedaba retenido por la membrana. Esto podía deberse bien a una colmatación de la membrana, o a una agregación del principio activo, bien consigo mismo o con otros componentes del SLC. Con el objetivo de minimizar la colmatación fueron realizados ensayos con distintas concentraciones de proteínas y se trabajó con la mínima en la cuál la actividad era detectable. Por otro lado, para favorecer la disgregación de las proteínas agregadas, se sometió a la muestra a tratamientos con 8 M urea, con 1,5 M NaCl y 0,1% SDS (se comprobó anteriormente que ninguno de estos tratamientos afectaban la actividad antibacteriana), sin obtener los resultados esperados.

En segundo lugar, se realizó una prueba utilizando unas columnas de Shepadex G-25 (PD-10), con el fin de poder separar las proteínas en función a su peso molecular (Fig. 16B). Se utilizó acetato de amonio 30 mM (pH 5,0) como buffer de elución y se recogieron 21 fracciones. Cuando se analizaron las fracciones, se detectó actividad antimicrobiana en todas ellas y el perfil de proteínas analizado mediante electroforesis en un gel de Tris-Tricina-SDS era prácticamente idéntico para todas ellas, lo que demostraba que no había existido ningún tipo de separación.

Con el propósito de seguir avanzando en las pruebas de separación, se decidió trabajar con una HPLC de exclusión de peso molecular (Columna Ultrahydrogel 120). El cromatograma obtenido mostraba un solo pico de gran tamaño (Fig. 16C), indicando que la separación no había sido muy buena. De todos modos, se recogieron 25 fracciones y se analizó la actividad de cada una, no resultando ninguna de ellas activa frente a *Listeria monocytogenes*.

Para descartar que la actividad hubiera sido inhibida de algún modo por la fase móvil (97% NaH_2PO_4 + 3% Acetonitrilo), se realizaron ensayos de actividad sometiendo a la bacteriocina a las mismas condiciones que en la columna, emulando también las diluciones sufridas por la muestra durante la corrida. En todos estos casos el resultado fue positivo indicando que la bacteriocina no se veía inhibida por la fase móvil, por lo sugería que o bien quedaba retenida en la columna, o que interactuaba de alguna manera con la fase estacionaria perdiendo su actividad. Para comprobar el correcto funcionamiento de la columna, las fracciones obtenidas fueron analizadas a través de un gel de tres fases (Fig. 16C), comprobándose que efectivamente se producía una separación por pesos moleculares.

Finalmente, se optó por probar con una columna de intercambio iónico siguiendo la metodología utilizada por Ohmomo (2000), tras la cual consigue la purificación de una

bacteriocina producida por una cepa de *Enterococcus faecium* mediante ultrafiltración, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio catiónico. Se trabajó con un HPLC con una columna Mono STM HR 5/5 (GE), la cual tiene una resina con grupos $-\text{CH}_2\text{-SO}_3$ que da lugar a un intercambio catiónico fuerte. Se realizaron pruebas con distintas fases móviles, a distintos valores de pH y con distintos gradientes de fuerza iónica. En función de los cromatogramas obtenidos, se optó por recoger fracciones de la elución realizada con un gradiente lineal de NaCl (0 - 0,5 M) en buffer fosfato 30 mM (pH 6,0) y con un flujo de 0,3 ml/min. Se recogieron 40 fracciones (cada 30 segundos), y se detectó actividad antimicrobiana de la fracción 7 a la 11. Para poder evaluar la separación de las proteínas en estas fracciones se corrió un gel de Tris-Tricina-SDS, observándose que en las fracciones con actividad la separación no había resultado muy eficiente (Fig. 16C).

De todas las pruebas realizadas parece ser que la cromatografía de intercambio catiónico es la más eficiente. No obstante, se requeriría llevar a cabo una optimización del protocolo para mejorar la separación y conseguir una mejor semipurificación del principio anti-*Listeria* producido por la cepa V4-1. Una opción podría ser el uso de agentes desnaturizantes (por ejemplo, SDS) previo a la cromatografía que no afectan la actividad y que podrían evitar que las proteínas del SLC interaccionaran, favoreciendo de este modo la separación por la metodología a utilizar. Si bien cada vez existen más estudios sobre purificación de bacteriocinas (Parada *et al.* 2007), no existe un protocolo único y es una tarea que comprende varias etapas, haciendo que la separación de estos pequeños péptidos no sea nada sencilla y que requiera un tiempo considerable. De todos modos, las pruebas realizadas fueron el impulso inicial para encontrar las técnicas a utilizar con el objetivo de aislar este compuesto con actividad antimicrobiana.

A ULTRAFILTRACIÓN

Partiendo de cultivo de V4-1 en MRS, concentrado mediante precipitación con 30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



Membranas de 10,000 y 3,000 WMCO



Actividad siempre retenida en el filtro de 10,000 WMCO

Tratamiento con: - 1,5 M NaCl
- 8 M Urea
- 0,1% SDS

Principio activo retenido en membrana de 10,000 WMCO



B GEL FILTRACIÓN

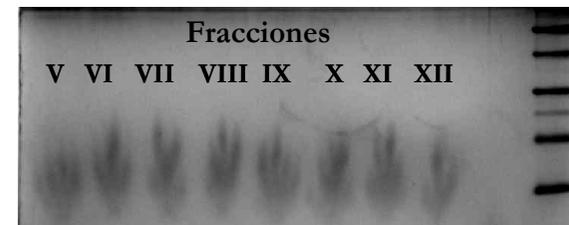
Partiendo de cultivo de V4-1 en MRS, concentrado mediante precipitación con 30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



Columna PD-10, Shepadex G-25

Fase móvil: acetato de amonio 30 mM (pH 5,0)

Actividad en todas las fracciones recogidas



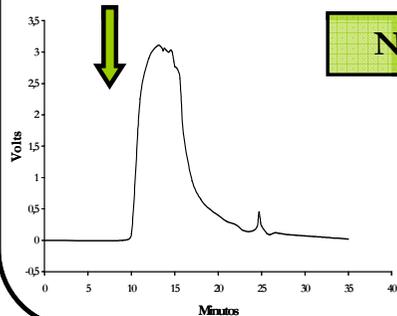
C CROMATOGRAFÍA EXCLUSIÓN PESO MOLECULAR

Partiendo de cultivo de V4-1 en MRS s/Tween, concentrado mediante precipitación con 30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y liofilización

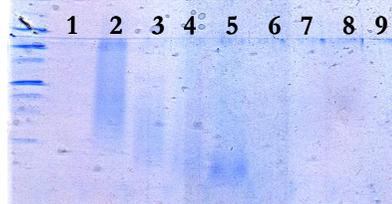


F. móvil: 97% NaH_2PO_4 (1%) + 3% ACN

Columna Ultrahydrogel 120



Ninguna fracción con actividad



D CROMATOGRAFÍA INTERCAMBIO CATIÓNICO

Partiendo de muestra según protocolo Ohmomo *et al.* (2000)

Pruebas con distintas condiciones de flujo, pH y fuerza iónica



Mono STMHR 5/5



Gradiente lineal de NaCl (0-0,5M) en buffer fosfato 30 mM (pH 6)

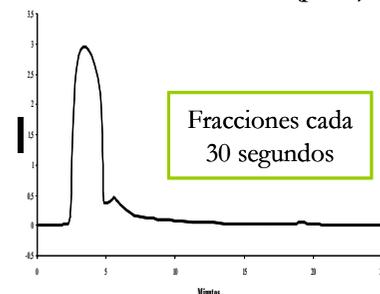
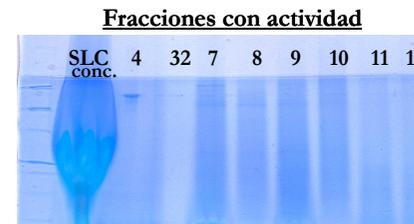


Figura 16 – Esquema de las distintas técnicas de separación utilizadas con el objetivo de purificar la bacteriocina producida por la cepa V4-1.

4.3. DETECCIÓN DE GENES DE BACTERIOCINAS PRESENTES EN LA CEPA V4-1

En función de los resultados de caracterización obtenidos a lo largo del proyecto para la bacteriocina producida por la cepa V4-1: tamaño aproximado 5000 Da, termoestable y a tratamientos a distintos pH's, fuerte actividad frente a *Listeria monocytogenes* y activa frente a otras Gram-positivas; se seleccionaron 3 bacteriocinas anteriormente descritas que presentaban características similares. Para esta selección se utilizó una base de datos denominada **Bactibase** (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org/main.php>), que consiste en una recopilación de las diferentes bacteriocinas descritas con información sobre su espectro de acción, su estructura y su secuencia. Las bacteriocinas que presentaban una mayor cantidad de similitudes con la generada por la cepa V4-1 fueron la Enterocina B, la Enterocina P y la Bacteriocina T8. Todas ellas son producidas por cepas de *Enterococcus faecium* y forman parte de la Clase II. Se diseñaron cebadores para la identificación de los genes de las bacteriocinas seleccionadas y se llevaron a cabo dos reacciones de PCR en paralelo. Una de estas reacciones contenía únicamente cebadores específicos para el gen de la bacteriocina, mientras que la otra PCR era llevada a cabo utilizando la técnica de Multiplex con cebadores para el gen de la bacteriocina y a modo de control contenía también cebadores que amplifican el gen RNA16S. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la Figura 17.

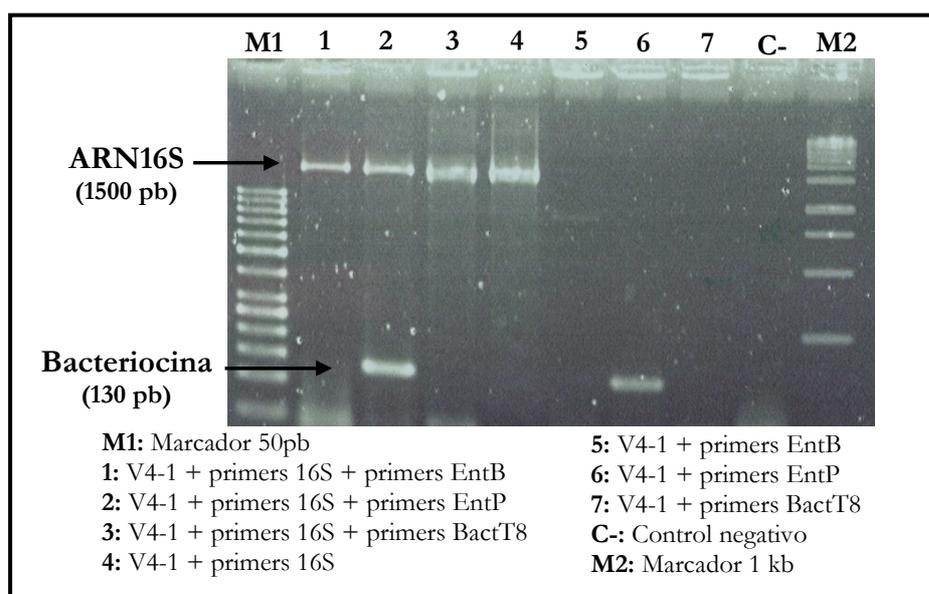


Figura 17 – Productos de PCR obtenidos utilizando los primers de los genes de las Enterocina B (119 pb), Enterocina P (131 pb), Bacteriocina T8 (177 pb) y ARN16S (1,5 kb) con la cepa V4-1.

En las muestras con los cebadores correspondientes al 16S, se observó la amplificación de una banda con el tamaño esperado (1500 pb), indicando el correcto funcionamiento de la reacción de amplificación. Al mismo tiempo, se observó amplificación en las muestras que contenían los cebadores correspondientes al gen de la Enterocina P (tanto en la reacción multiplex como en la PCR), presentando una banda con un tamaño aproximado de 130 pb, que corresponde al esperado. No se detectó la presencia de los genes que codifican para la Enterocina B y la Bacteriocina T8, que deberían haber generados fragmentos de amplificación de 119 y 177 pb, respectivamente.

Estos resultados sugieren que la cepa V4-1 contiene un gen similar al gen que codifica para la Enterocina P en la cepa *Enterococcus faecium* P13 aislada por Cintas *et al.* en 1997. Sin embargo, para poder asegurar que la actividad antimicrobiana de la cepa V4-1 era debido a la producción de la Enterocina P se deberían hacer más pruebas. Una opción podría ser una mutación dirigida al gen que codifica a la bacteriocina y comprobar que los mutantes no sean activos frente a *L. monocytogenes*.

4.5. PROSPECCIÓN DE NUEVAS CEPAS CON ACTIVIDAD ANTI-LISTERIA

Las actividades realizadas en esta etapa del proyecto tienen como objetivo la búsqueda de nuevas cepas de BAL con actividad anti-Listeria. Uno de los propósitos de este screening era encontrar cepas que se desarrollaran y produjeran una buena actividad antimicrobiana a bajas temperaturas, por esto la selección se desarrolló a 16 °C.

La gran parte de los numerosos estudios de búsqueda de cepas lácticas realizados por otros investigadores han sido basados en la temperatura de crecimiento óptima para la mayoría de los géneros de este grupo, 30°C. Sin embargo, existen cepas lácticas que tienen buen crecimiento a temperaturas bajas que podrían tener una gran aplicación en la industria de alimentos donde a menudo los procesos de fermentación tienen lugar a temperaturas bajas. El hecho de encontrar una cepa que creciese a bajas temperaturas y que a su vez produjese un principio activo contra *Listeria monocytogenes*, podría ser de mucha utilidad a la hora de su aplicación en alimentos fermentados para la producción de la bacteriocina *in situ*.

Con la finalidad de aislar las cepas de BAL se realizó un muestreo de vegetación externa y abono orgánico durante el invierno. Del screening realizado se seleccionaron un total de 40 colonias que crecían a 16°C en MRS, eran catalasa negativas y Gram-positivas. Utilizando el

método de la estría para detectar su actividad anti-*Listeria*, se seleccionaron los 2 clones que presentaban una mayor inhibición y se llevó a cabo su identificación mediante secuenciación del 16S. Los dos clones identificados correspondían a las especies: *Lactococcus piscium* y *Weissella koreensis*, respectivamente (Fig. 18).



Figura 18 – Características de las cepas con actividad anti-*Listeria* aisladas a 16 °C. **A)** Identificación y lugar de aislamientos las dos cepas con mayor actividad. **B)** Halos de actividad frente a *L. monocytogenes* de las cepas aisladas: i. PI5, ii. Clon PI5, iii. Clon C11 y iv. C11

Si bien la cepa de *Lactococcus piscium* PI5 presentaba un crecimiento relativamente pobre en MRS, el halo de inhibición producido frente a *Listeria monocytogenes* era mayor que cualquiera de los detectados previamente con otras cepas. Por otro lado, la cepa *Weissella koreensis* C11 mostraba también una evidente actividad inhibitoria. Sorprendentemente, ni en la cepa de *Lactococcus piscium* ni la cepa de *Weissella koreensis* se detectó actividad en los correspondientes SLC. Este resultado es concordante con los estudios de Matamoros *et al.* (2009) en el cuál aíslan cepas psicotróficas inhibitoras de patógenos a partir de salmón, una de las cuáles fue identificada como *L. piscium*. Estos autores también observaron que la inhibición causada por *L. piscium* está asociada al crecimiento en colonia, tal vez por la fuerte acidificación o la competencia nutricional. Sin embargo, cabe destacar que esta cepa de *Lactococcus piscium* es una cepa homofermentativa por lo que su metabolito principal sería el ácido láctico, un ácido orgánico que si bien es inhibidor del crecimiento bacteriano no resulta tan letal como puede ser el ácido acético o el propiónico (Östling *et al.* 1993). Ello sugiere que este comportamiento no sea solo explicable por la producción de ácidos como inicialmente sugerían los autores, sino que también podría deberse a algún principio activo únicamente producido y/o secretado cuando la bacteria crece sobre medio sólido.

Se realizaron curvas de crecimiento de la cepa *Lactococcus piscium* PI5 a distintas temperaturas que se muestran en la Figura 19.

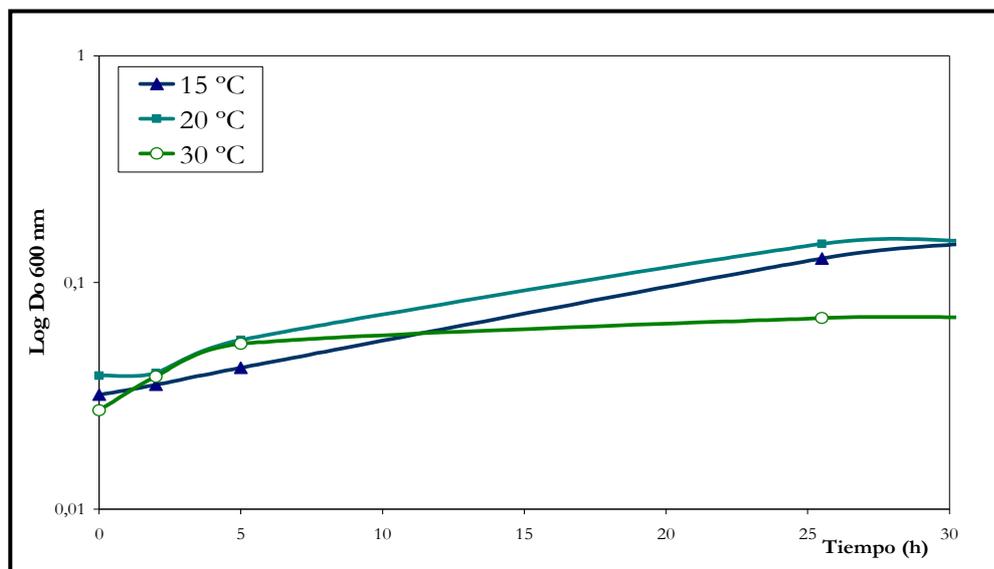


Figura 18 – Crecimiento de la cepa PI5 a diferentes temperaturas.

Como se aprecia en la Fig. 19, el crecimiento de la cepa PI5 en medio líquido es prácticamente nulo, lo que podría explicar que no se hubiera detectado actividad en el SLC. Sin embargo, las curvas obtenidas sugieren que el crecimiento a 15 y 20 °C es notablemente mejor que a 30 °C, corroborando el carácter psicrótrofo del aislamiento PI5.

Se realizaron pruebas de inhibición, utilizando la metodología de la estría, frente a otras cepas patógenas tanto Gram-positivas como Gram-negativas (Fig. 20), observándose un amplio espectro de inhibición frente a estas cepas. Cabe destacar que la inhibición frente a Gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) es mayor que frente a Gram-negativas.

Cepa indicadora	Cepa PI5
<i>Listeria monocytogenes</i>	
<i>Salmonella</i> spp.	
<i>E. coli</i> O157:H7	
<i>Staphylococcus aureus</i>	

Figura 20 – Pruebas de inhibición de la cepa PI5 utilizando la metodología de la estría frente a cepas patógenas Gram-positivas y Gram-negativas.

Se realizaron pruebas de la capacidad anti-*Listeria* de la cepa PI5 en diferentes medios de cultivo. Para poder comparar los halos producidos por las colonias, en lugar de una estría se realizó la deposición de una gota de cultivo y se dejó crecer antes de agregar el overlay inoculado con *L. monocytogenes*.

Se comparó la inhibición producida en **TSA**; **TSA + 2% glucosa**; **TSA*** (TSA + 5g/L acetato de sodio + 2 g/L triamonio citrato + 0,2 g/L sulfato de magnesio + 0,05 g/L sulfato de manganeso + 2 g/L fosfato dipotásico + 1 g/L polisorbato 80); **mTSA** (TSA* + 2% glucosa); **MRS** y **MRS s/Mg** (MRS sin sulfato de magnesio).

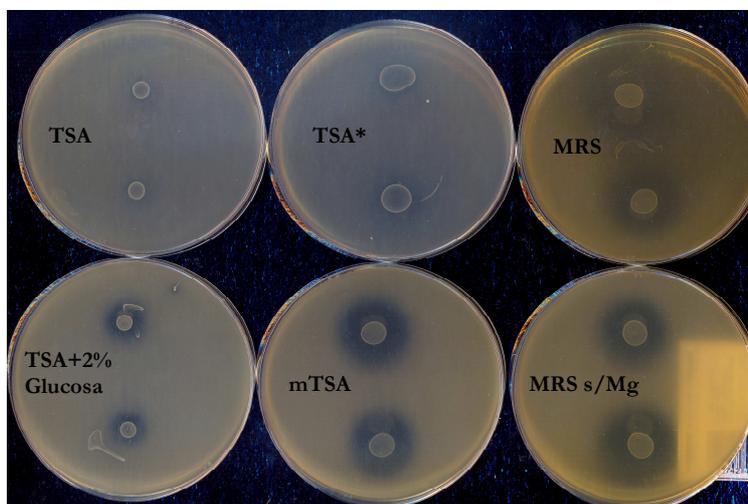


Figura 21 – Halo producido por la cepa PI5 frente a *L. monocytogenes* en diferentes medios de cultivo.

TSA*: TSA + 5g/L acetato de sodio + 2 g/L triamonio citrato + 0,2 g/L sulfato de magnesio + 0,05 g/L sulfato de manganeso + 2 g/L fosfato dipotásico + 1 g/L polisorbato 80. **mTSA**: TSA* + 2% glucosa

Como se puede observar en la Figura 21, la mayor inhibición se presentó en mTSA, en MRS s/Mg y en MRS. Estos resultados muestran la relevancia de los micronutrientes y de la fuente de carbono en la actividad antimicrobiana. Al comparar los halos de inhibición obtenidos en TSA y TSA + 2% de glucosa, se puede ver como la capacidad inhibitoria de la cepa PI5 es dependiente de la presencia de carbohidratos. Esta diferencia podría deberse a que en el medio con glucosa, la acidificación producida por el crecimiento de la cepa PI5 es mayor, lo que podría ser importante para promover la expresión y/o la actividad del principio con actividad anti-*Listeria*. Por otro lado, se observó que la adición de otros componentes propios del MRS (mTSA vs. TSA + 2% glucosa) producían un incremento en el halo de inhibición observado. Este resultado reafirma que algunos de los componentes del MRS influyen de manera notable en la capacidad inhibitoria de la cepa PI5. Igualmente, de la misma manera que con la producción de ácidos, no se puede afirmar si la presencia de estos componentes está afectando la producción o

la actividad del principio activo. Uno de los compuestos presentes en el MRS que se ha mostrado que tiene influencia en la capacidad inhibitoria de las cepas lácticas, es el citrato. Esta sal es el precursora de la producción de diacetilo por algunas cepas lácticas, siendo éste un compuesto con actividad antimicrobiana. Al mismo tiempo, el citrato puede actuar como un agente quelante produciendo una desestabilización de la membrana externa de las células al extraer cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} . Esta desestabilización permite que las bacteriocinas puedan difundir más eficientemente para alcanzar la membrana citoplasmática donde ejercerán su acción, incrementando de este modo su actividad antimicrobiana (Cotter *et al.* 2005).

Al estudiar la influencia del magnesio, la adición de éste en las concentraciones presentes en el MRS (0,2 g/l) resultó no condicionante de la actividad. No obstante, no podemos descartar que las trazas de Mg presentes en otros componentes del medio (extracto de levadura, extracto de carne) sean suficientes para la apropiada expresión y/o actividad de las propiedades inhibitorias de la cepa PI5.

Cabe destacar que el estudio de los componentes que favorecen tanto la actividad como la producción de la misma, pueden ser de mucha utilidad pensando en una futura aplicación industrial, ya que nos permitiría entender cuales son los factores que estimulan y regulan la utilidad de esta y otras cepas como estrategia de bioconservación.

5. CONCLUSIONES

A lo largo de esta investigación se ha trabajado en varias de las etapas que involucran la búsqueda, caracterización y purificación de bacteriocinas con actividad anti-*Listeria*.

En una primera instancia se trabajó con cepas de *Enterococcus faecium* aisladas de leche de cabra (CL-19) y de heces de vacas (V4-1) que presentaban una fuerte actividad anti-*Listeria*. Se pudo comprobar que estas cepas producían un compuesto extracelular de naturaleza peptídica, de bajo peso molecular y muy estable a tratamientos de temperatura y pH. Al mismo tiempo, se caracterizó su actividad y su producción, las cuales se mostraron muy dependientes de la composición del medio de cultivo. Se comprobó que la cepa V4-1 presentaba un espectro de inhibición muy interesante al mostrar actividad antimicrobiana frente a otras cepas de bacterias patógenas, como *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. Este espectro de acción así como sus propiedades (pH de acción y estabilidad térmica) sugieren que estas cepas podrían ser de gran interés para potenciales aplicaciones tecnológicas como bioconservantes, con el propósito de prevenir el desarrollo de patógenos así como de microorganismos alterantes en determinados productos alimenticios.

Mediante estudios con cebadores específicos se logró identificar que la cepa V4-1 contenía el gen que codifica para la Enterocina P, una bacteriocina de clase IIa descrita anteriormente (Cintas *et al.* 1997). Este resultado abre una posible nueva etapa de investigación, y al mismo tiempo, el conocer la secuencia de la bacteriocina producida podría facilitar de manera importante las etapas de purificación de la misma.

En el segundo bloque del trabajo se buscaron nuevas cepas con propiedades anti-*Listeria*. Para la búsqueda se estableció una temperatura de crecimiento y producción de actividad de 16 °C. Esta restricción permitiría encontrar cepas que habían sido pasadas por alto por otros investigadores ya que la mayor parte de los estudios se han realizado a 30°C, y a su vez, poder trabajar con bacterias que creciesen mejor a las temperaturas de conservación de los alimentos, pensando en una futura aplicación. En esta búsqueda se aislaron dos cepas: *Lactococcus piscium* y *Weissella koreensis*. Estas dos cepas, principalmente *L. piscium*, presentaban una actividad anti-*Listeria* muy importante al crecer en medio sólido. Los resultados obtenidos en esta etapa plantean la posibilidad de realizar futuros experimentos con el propósito de indagar más a fondo cuales son exactamente los factores que regulan la producción de esta principio antibacteriano, pudiendo finalmente definir las condiciones óptimas para su aplicación biotecnológica.

A modo de reflexión final, considero que es de gran interés para la industria alimentaria continuar con este tipo de estudios, dadas las exigentes demandas de alimentos seguros y naturales impuestas por los consumidores. Esto permitirá finalmente, aplicar y hacer uso del enorme arsenal de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas para desarrollar alimentos con una “inmunidad innata”, que permitirían influir y controlar las poblaciones microbianas de una forma previsible y beneficiosa.

6. BILIOGRAFÍA

- Ambalam, P.S., Prajapati, J.B., Dave, J.M., Nair, M., Ljungh, A., Vyas, B.R.B. 2009. Isolation and characterization of antimicrobial proteins produced by a potential probiotic strain of human *Lactobacillus rhamnosus* 231 and its effect on selected human pathogens and food spoilage organisms. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 21:211-220.
- Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M., 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.
- Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A. 2004. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. Marcel Dekker, Inc. New York USA. Pp: 1-66.
- Barefoot, S.F., Klaenhammer, T.R. 1984. Purification and Characterization of the *Lactobacillus acidophilus* Bacteriocin Lactacin B. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* 26:328-334.
- Cintas, L.M., Casaus, P. Havarstein, L.S., Hernández, P.E., Nes, I.F. 1997. Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin P, a Novel *sec*-Dependent Bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a Broad Antimicrobial Spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4321-4330.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews* 3:777-788.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* 16:1058-1071.
- Farber, J.M., Peterkin, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiol. Rev.* 55: 476-511.
- Franz, C., Holzapfel, W. 2004. The Genus *Enterococcus*: Biotechnological and Safety Issues. En: Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A. 2004. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. Marcel Dekker, Inc. New York USA. Pp: 1-66.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Lucas López, R., Ben Omar, N. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 120:51-70.
- Matamoros S., Pilet, M.F., Gigout, F., Prévost, H., Leroi, F. 2009. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology* 26:638-644.
- Motta, A.S., Brandelli, A. 2003. Influence of growth conditions on bacteriocin production of *Brevibacterium linens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62:163-167.
- Müller, D.M., Carrasco, M.S., Tonarelli, G.G., Simonetta, A.C. 2009. Characterization and purification of a new bacteriocina with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* lp 31 strain isolated from dry-fermented sausage. *Journal of Applied Microbiology* 106:2031-2040.
- Ohmomo, S., Murata, S., Katayama, N., Nitisinprasart, S., Kobayashi, M., Nakajima, T., Yajima, M., Nakanishi, K. 2000. Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocina produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. *Journal of Applied Microbiology* 88:81-89.

- Östling, C.E., Lindgreen, S.E. 1993. Inhibition of enterobacteria and *Listeria* growth by lactic, acetic and fomic acid. *Journal of Applied Bacteriology* 75:18-24.
- Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P., Soccol, C.R. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Braz. Arch. Boil. Technol.* 50.
- Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* 79:3-16.
- Samelis, J., Roller, S., Metaxopoulos, J. 1994. Sakacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* isolated from Greek dry fermented sausages. *Journal of Applied Bacteriology* 76:475-486.
- Tienungoon, S., Ratkowsky, D.A., McMeekin T.A., Ross T. 2000. Growth Limits of *Listeria monocytogenes* as a Function of Temperature, pH, NaCl, and Lactic Acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4979–4987.
- Tomé, E., Gibbs, P.A., Teixeira, P.C. 2008. Growth control of *Listeria innocua* 2030c on vacuum-packaged cold-smoked salmon by acid lactic bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 121:285-294.
- Valdés-Stauber, N., Scherer, S. 1994. Isolation and Characterization of Linocin M18, a Bacteriocin Produced by *Brevibacterium linens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3809-3814.