UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICO QUÍMICAS Y NATURALES

UNRC

CREER.. CREAR.. CRECER

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIOCINAS DE CEPAS SELECCIONADAS DE BACTERIAS LÁCTICAS REGIONALES

Por
LIC. MIRTA C. LASAGNO

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO
MAGISTER EN BIOTECNOLOGÍA
RÍO CUARTO, 2000.

ESTE TRABAJO HA SIDO REALIZADO EN LA ORIENTACIÓN MICROBIOLOGÍA GENERAL. DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA.

Directora de Tesis

Dra Graciela Font de Valdez

Codirector

Dr. Alberto J. Eraso

Asesor

Dr. Fernando Sesma

TRIBUNAL EVALUADOR

Dr. Raúl Raya

Dra. Rosa Nagel

Dra. Cristina Bogni

MFN:

Classif.:

A César
A María José, Diego y Gabriel

Gracias a Dios al concluir este trabajo puedo gozar con alegría de la satisfacción de la meta lograda.

Son muchas las personas que colaboraron con la realización de esta tesis.
A todos ellos mi reconocimiento y gratitud.

A mi Directora la Dra. Graciela Font de Valdéz por sus consejos y la calidez con que supo trasmitirme su amplia experiencia, tanto científica como humana.

Al Dr. Alberto Eraso por el apoyo constante de sus críticas, consejos y estímulo.

Al Dr. Fernando Sesma por su paciente asesoramiento y desinteresada colaboración.

A las Licenciadas Susana Bettera y Cecilia Frigerio por facilitarme las cepas de *S. aureus* y *B. cereus* para realizar este trabajo.

A las autoridades y personal del CERELA, especialmente a Gladys Martos por el aporte de las cepas *L. plantarum* CRL 691, *E. faecium* CRL 35, además del asesoramiento técnico y a Nelly Taljuk por facilitarme material bibliográfico.

A Norberto Reich y su familia por la amabilidad con que atendieron mis requerimientos de muestras.

A Mónica, Mirta, Viviana, Claudia, Graciela y Marina por su alegría y apoyo en los momentos lindos y en los difíciles, a lo largo de estos años de trabajo compartido.

A mi hermano Guillermo por su ayuda incondicional con las ilustraciones fotográficas y con la informática.

A mi esposo y mis hijos que con una comprensión y paciencia sin límites aceptaron mi completa dedicación a esta tesis y me ayudaron a comprender que la formación profesional no es incompatible con una familia.

¡A TODOS ELLOS GRACIAS!

PARTE DE LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS FUERON PRESENTADOS EN:

Lasagno, M.; Eraso, A.; Font de Valdez, G.; y Sesma, F..
VII Congreso Argentino de Farmacia y Bioquímica Industrial. Sextas Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial. Jor F y BI '99.
Presentación del trabajo: " Bacterias lácticas y/o sus metabolitos potencialmente útiles en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia".
Buenos Aires 14 al 19 de junio de 1999.

Lasagno, M.; Eraso, A.; Font de Valdez, G.; Sesma, F . y Beoletto, V..
Cubra V. Congreso Nacional de Bioquímicos.
Presentación del trabajo : " Caracterización de una bacteriocina útil, para la industria alimenticia y cosmética"
Huerta Grande, Sierras de Córdoba, 6 al 9 de octubre de 1999.
Trabajo con Mención Especial, otorgado por el Comité Científico.

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIOCINAS DE CEPAS SELECCIONADAS DE BACTERIAS LÁCTICAS REGIONALES

RESUMEN

De un total de 206 bacterias ácido lácticas aisladas a partir de muestras de leche, lactosuero, suero-fermento, y quesos artesanales de la región Sur de la Provincia de Córdoba, se seleccionaron 3 bacterias con propiedades antagónicas, las que fueron detectadas por el método de difusión en placa, 2 cepas de *Enterococcus durans, S2 y S6* y otra de *Enterococcus hirae, S3.*

La acción inhibitoria se adjudicó a sustancias tipo bacteriocinas, después de descartar el efecto de la acidez y/o peróxido de hidrógeno, además de comprobar su naturaleza proteica, a partir de su sensibilidad a proteasa tipo IV, tipo XXV, papaína, tripsina , pepsina y proteinasa K.

Las 3 enterocinas mostraron grandes similitudes entre ellas, son termorresistentes, (toleran el autoclavado), estables en un rango de pH 2 al 11, mostrando mayor actividad a pH ácido.

Estas bacteriocinas inhibieron el crecimiento de *Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, Clostridium perfringens* y 2 cepas de *Staphylococcus aureus,* una productora de enterotoxina A, y otra de enterotoxina B, patógenos que frecuentemente están asociados a enfermedades de transmisión alimentaria.

Se concentró la bacteriocina producida por la cepa de *E. durans S6*, por medio de una precipitación fraccionada, con 35 y 50% de saturación de sulfato de amonio y pudo comprobarse que se libera al medio mayoritariamente con un peso molecular mayor a 12000, por su retención en bolsa de diálisis.

Las características que reúnen éstas bacterias, las convierten en posibles candidatos para la preservación de alimentos y particularmente útiles para la industria láctea regional.

CHARACTERIZATION OF BACTERIOCINS PRODUCED BY REGIONAL STRAINS OF LACTIC ACID BACTERIA

SUMMARY

Three strains showing antagonic properties were selected from a total of 206 lactic acid bacteria isolated in Southern Córdoba, from samples of milk, milk serum, whey and home-made cheeses.

These bacteria were detected by means of the Petri dish diffusion method. The strains denominated S2 and S6 were identificated as *Enterococcus durans* and S3 strain belongs to *Enterococcus hirae.*

The inhibitory activity was attributed to bacteriocin-like sustances once the possible effect of acidity and/or hidrogen peroxide was eliminated.

The bacteriocins were degradated by type IV and XXV proteases, papain, trypsine and proteinase K.

The three enterocins presented similarities among them. They were thermo-resistant, tolerant to autoclaving and stable at pH values ranging from 2 to 11, showing a higher activity at acid pH values.

These bacteriocins inhibited the growth of *Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, Clostridium perfringens* and two strains of *Staphylococcus aureus*, one an A-enterotoxin and the other a B-enterotoxin producer. All of these bacteria are common pathogens usually associated with food borne diseases.

The bacteriocin produced by *Enterococcus durans* S6 strain was concentrated by means of fractionated precipitation with 35 and 50% saturation on ammonium sulfate. The bacteriocin was shown to be released to the medium having a molecular weight of over 12000 since its activity was retained in a dyalisis bag.

The characteristic of all these bacteria make them suitable candidates to be used for food preservation and specially useful in our regional dairy industry.

ÍNDICE

TABLAS

FIGURAS

FOTOGRAFÍAS

INTRODUCCIÓN

A.1- BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO

Las bacterias del ácido láctico (BAL) como grupo de microorganismos han sido estudiadas desde comienzos de 1900. Las interacciones de BAL en los alimentos atrajo la atención de los científicos, lo que resultó en el significativo aporte de Pasteur con la fermentación ácido láctica en 1857, seguida por el primer aislamiento de un cultivo bacteriano puro: *Bacterium lactis*.

El uso de un cultivo iniciador (starter) para la producción de queso y leche agria fue introducido en 1890 por Weigman en Copenhagen. Esto abrió el camino para la industrialización de alimentos fermentados. Las BAL están involucradas en un gran número de fermentaciones espontáneas de alimentos.

En una breve revisión de la historia de la humanidad se puede comprobar que el hombre desde tiempo inmemorial, ha hecho uso de los procesos fermentativos, en forma empírica, usando bacterias lácticas, como lo demuestran los datos revelados por las excavaciones en Suiza, que ponen de manifiesto que el pan con masa amarga era parte de la dieta típica, hace 5000 años atrás, y el fermento para el pan ázimo está citado en la Biblia.

Hay referencias de productos lácteos fermentados, queso, yogur y manteca, en textos arcaicos de Iraq, que datan de 3000 años A. de C.

La cerveza que se elaboraba en Babilonia y exportaba a Egipto, era producto de la fermentación alcohólica y láctica.

En el presente, algunas comunidades en Africa, elaboran cerveza de maíz, sorgo y mijo en base a la fermentación láctica, la que garantiza la seguridad y aceptabilidad de estos productos en climas tropicales.

Desde tiempos prehistóricos las personas han tratado de preservar a los alimentos, mediante procesos fermentativos, garantizando una prolongada vida segura de los alimentos (Stiles y Holzapfel 1997). Varios de aquellos procesos biotecnológicos empíricos están todavía en uso, pero aplicados bajo condiciones bien controladas a escala industrial, por ejemplo, la fermentación de pepinos. Algunos manufacturadores todavía se basan

en tecnologías tradicionales para el procesamiento de quesos y productos cárnicos fermentados sin el uso de cultivos starters.

También las BAL están muy relacionadas con el ambiente humano. Se encuentran presentes formando parte de la flora normal en la cavidad oral, intestino, colon, vagina, donde previenen la colonización por microorganismos peligrosos, por lo que son considerados organismos probióticos.

Las BAL ocupan el mayor grupo microbiano de importancia económica en la industria alimenticia. Con un ambiente apropiado dominan la microflora natural en leches, carnes, vegetales y productos con cereales. Los nuevos procesos tecnológicos de conservación en frío de los alimentos y empacado bajo una atmósfera modificada han influenciado dramáticamente la dominación de BAL en carnes y productos cárnicos (Stiles y Holzapfel 1997).

Las BAL usadas extensivamente por la industria alimenticia contribuyen al aroma y al sabor del producto final y tienen también un importante rol higiénico debido a la síntesis de una variedad de compuestos inhibitorios los que previenen el desarrollo de microorganismos indeseables o bacterias patogénicas.

Se clasifican dentro del grupo de bacterias ácido lácticas los microorganismos que comparten las siguientes características: cocos o bacilos Gram positivos, catalasa (-), oxidasa (-), nitrato reductasa (-), obtención de energía por fosforilación a nivel de sustrato, poliauxotróficas, anaerobias facultativas y productoras de ácido láctico. Están representadas por los siguientes grupos:

Cocos: *Streptococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Enterococcus, Aerococcus, Tetragenococcus y Vagococcus.*

Bacilos: *Lactobacillus y Carnobacterium.*

A las bacterias del ácido láctico se les adjudica una naturaleza competitiva por la producción de diversas sustancias antimicrobianas. Como su nombre lo indica, son productoras de grandes cantidades de ácido láctico, y el bajo pH resultante es el factor primario de la actividad antimicrobiana. También producen ácido acético, propiónico, fórmico, etanol, peróxido de

hidrógeno, diacetilo y aldehidos(Lejeune y col. 1998); (Mc Mullen y Stiles 1996).

El efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos está relacionado con el pH y la forma no disociada del ácido. Al ácido propiónico se le atribuye la inhibición de enzimas metabólicas.

La propiedad antibacteriana del peróxido de hidrógeno se debe a su poder oxidante, el que causa cambios irreversibles en el sistema enzimático celular.

La disminución del potencial de oxido-reducción del ambiente, por algunas BAL, es otro factor adicional útil en la inhibición del crecimiento de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos. La competición por nutrientes esenciales también está involucrado en la actividad antimicrobiana de las BAL (Raccach y col. 1979).

Recientemente se ha identificado un inhibidor producido por *Lactobacillus reuteri* denominado reuterina, cuya naturaleza química consiste en β-hidroxipropionaldehído, un derivado deshidratado del glicerol, el que ejerce su acción bloqueando la enzima ribonucleótido reductasa, lo que explica su amplio espectro de acción(Piard y Desmazeaud 1992).

Entre los diferentes tipos de compuestos antagónicos producidos por BAL, las bacteriocinas han atraido mayor interés.

A. 2 - BACTERIOCINAS

Tagg y col. (Klaenhammer, 1993) han definido a las bacteriocinas como: compuestos proteicos bactericidas contra bacterias taxonómicamente relacionadas a la productora; aunque ahora es evidente que algunas pueden mostrar una actividad bactericida frente a especies no relacionadas, o confinadas en un mismo nicho ecológico.

Las bacteriocinas no responden a un criterio bien definido, más bién representan una clase heterogénea de antagonistas bacterianos, que varían considerablemente en cuanto al peso molecular, propiedades bioquímicas,

rango de húespedes sensibles, modo de acción y localización de sus determinantes genéticos (Klaenhammer 1988).

El estudio de las bacteriocinas producidas por BAL ha sido activamente desarrollado en los últimos años. El término bacteriocina fue originalmente aplicado a las colicinas, producidas por *Escherichia coli.*

La nomenclatura adoptada, implica el agregado del sufijo "cina" al nombre del género o la especie para denotar la antibiosis de éstas sustancias.

Las bacteriocinas en general fueron clasificadas en 3 clases distintas por Klaenhammer 1993, basándose en una caracterización bioquímica y genética de muchos de éstos compuestos.

I) Lantibióticos. Pequeños péptidos activos de membrana (x < 5kDa) conteniendo los aminoácidos inusuales lantionina , beta-metil lantionina y residuos deshidratados. Ej.: nisina, lactacina 481, carnocina U1499, lactocina S .

II) Pequeños péptidos activos de membrana (x < 10 kDa) que no contienen lantionina, de moderada (100°C) a alta (121°C) estabilidad al calor. Dentro de esta clase se pueden definir 3 subgrupos.

IIa)- Bacteriocinas tipo pediocina con fuerte actividad antilisteria. Ej.: pediocina PA-1.

IIb)- Complejos proteicos integrados por 2 péptidos. Ej: lactacina F.

IIc)- Bacteriocinas secretadas por la vía secretoria general "sec dependiente". Ej.: lactococcina B.

III) Grandes proteinas, lábiles al calor (x > 30 kDa). Ej.: helveticina J y acidophilucina A.

Una cuarta clase ha sido definida, la que involucra bacteriocinas compuestas por moléculas complejas de proteínas unidas a carbohidratos o lípidos. En posteriores experimentos, con una adecuada purificación, se encontró que los componentes activos de éstos complejos, son péptidos pequeños (Nes y col. 1996).

Las bacteriocinas de la clase I y II son las más estudiadas y mejores candidatos para la aplicación a escala industrial (Nes y col. 1996).

En la actualidad los consumidores son cada vez más reticentes en adquirir alimentos con preservativos químicos, y las BAL con sus bacteriocinas permiten una significativa reducción en el nivel de aditivos químicos.

Por otra parte los consumidores prefieren alimentos de origen vegetal que mantengan su característica de " frescos", la aplicación de bacteriocinas como conservantes, permite disminuir la intensidad de los tratamientos físicos y químicos empleados en el procesamiento, obteniéndose de ésta forma alimentos denominados : " listos para su consumo" Por lo tanto ayudan a proveer productos alimenticios más sanos (Martinez y col. 1995).

Es por esto que, aunque las bacteriocinas se conocen desde hace ya muchos años, han adquirido un incrementado interés por su potencial aplicación como preservativo natural en alimentos (Dykes 1995).

Las bacteriocinas, en general, representan sólo una parte, dentro de un gran mosaico de posibles mecanismos de protección contra microorganismos patógenos y bacterias responsables del deterioro, en los complejos sistemas alimenticios, ya que nunca reemplazan las buenas prácticas de manufactura, primordiales para la producción de alimentos seguros.

Por lo tanto bacterias con actividad antagónica, usadas apropiadamente, pueden representar una herramienta adicional para prevenir la contaminación de los alimentos.

A. 2 .1- NISINA

Nisina, es una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*, inicialmente se la conoció por su habilidad de prevenir la germinación de esporas de especies de *Clostridium* y *Bacillus*, siendo estas bacterias responsables del deterioro de productos enlatados.

Además nisina previene el fenómeno de hinchamiento causado por la producción de gas clostridial en quesos prensados (Scott y Taylor 1981).

Recientemente mayor atención ha sido puesta en nisina por su actividad antibacteriana contra *Listeria monocytogenes,* patógeno responsable de una severa enfermedad de trasmisión alimentaria (ETA) : la listeriosis. Esta enfermedad compromete a mujeres embarazadas, recién nacidos, ancianos e inmunocomprometidos, con una taza de fatalidad, en este último grupo de afectados, entre un 27 a 34%.

Listeria se aísla en carnes frescas de pollo, de vaca, carnes procesadas, leche, productos lácteos, y en ensaladas mixtas de vegetales empacadas en bolsas de polietileno (Nielsen y col. 1990).

Por su habilidad de crecer a temperaturas de refrigeración el Servicio de Inspección en Estados Unidos ha establecido un límite de tolerancia de cero para este microorganismo, en alimentos listos para el consumo (Lewus y Montville 1991).

Estas diferentes observaciones han permitido la autorización para el uso de nisina como aditivo de alimentos por la Comunidad Europea en 1983 y posteriormente por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos en 1987, otorgándole la categoría de GRAS (generalmente reconocido como seguro) (Aymerich y col. 1998).

En la actualidad está siendo utilizada como aditivo alimenticio en más de 57 países en el mundo, ya que se ha probado que es una sustancia no tóxica y no antigénica para humanos, pudiendo ser ingerida en cantidades de más de $3,3 \times 10^7$ UI / kg. de peso corporal sin efectos adversos; además es inactivada por enzimas proteolíticas en el tracto digestivo.

A. 2. 2 -ENTEROCINAS

Bacteriocinas producidas por *Enterococcus* se conocen desde hace muchos años, pero el interés por estas sustancias ha sido renovado recientemente tras el reconocimiento de que los enterococos comunmente producen bacteriocinas activas contra *Listeria* (Klaenhammer 1993).

Por lo tanto la habilidad inhibitoria de estos microorganismos puede ser de gran importancia para controlar la contaminación microbiana, ya que los enterococos se presentan en el mismo nicho ecológico que las especies de *Listeria.*

Las enterocinas se caracterizan por ser estables al calor, a un amplio rango de valores de pH, y amplio espectro de acción sobre bacterias Gram positivas patógenas, siendo éstos algunos de los requerimientos necesarios que debe reunir una sustancia para ser considerada un antimicrobiano ideal para aplicarse en alimentos. Las enterocinas pueden complementar la acción de la nisina por su estabilidad a pH neutro (Giraffa 1995).

La consideración de enterococos como microorganismos GRAS requiere mayores estudios, aunque hay una larga historia de consumo de alimentos que contienen enterococos, sin riesgos para la salud (Giraffa y col. 1997).

A. 3 - CRITERIOS DE SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS Y/O SUS BACTERIOCINAS

Los requerimientos que debe reunir la bacteria productora y/o la sustancia antimicrobiana para ser incorporados durante el procesamiento, con el objeto de preservar productos lácteos son:

a) Deben ser microorganismos generalmente seguros.

b) Las bacteriocinas, deben resistir al tratamiento térmico y cambios de pH, que ocurren frecuentemente en el procesamiento industrial de los alimentos.

c) Su espectro de actividad debe estar dirigido hacia la flora patógena (Piard y Desmazeaud. 1992).

d) Las bacterias del cultivo iniciador deben ser compatibles con las bacteriocinas.

e) Las cepas seleccionadas deben ser escogidas del ambiente, naturalmente mejor adaptadas a las características del producto alimenticio y más competitivas (Aymerich y col. 1998).

Por las características de nuestro país, la industria lechera ocupa un lugar destacado en la economía argentina. Considerando la relevancia de la Provincia de Córdoba, como cuenca lechera en el país, ésta constituye un nicho ecológico y reserva genética importante, donde sería posible encontrar una gran variedad de biotipos de cepas lácticas silvestres productoras de sustancias antibacterianas.

Lo antedicho plantea la siguiente hipótesis: En nuestra cuenca lechera existen cepas silvestres de bacterias lácticas potencialmente útiles para la industria alimenticia en general y lacteocasearia en particular.

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes citados se plantearon los siguientes objetivos.

B.1 - OBJETIVO GENERAL

- Seleccionar cepas lácticas regionales en base a la producción de bacteriocinas activas contra microorganismos contaminantes, causantes de enfermedades al consumidor.

B. 2 -OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar bacterias lácticas de leche cruda, lactosuero, suero-fermento, y quesos, del Sur de la Provincia de Córdoba.
- Seleccionar cepas productoras de sustancias antimicrobianas.
- Estudiar la capacidad inhibitoria de las bacteriocinas frente a microorganismos patógenos.
- Realizar la caracterización primaria de éstas sustancias.

MATERIALES Y MÉTODOS

C. 1-MEDIOS DE CULTIVO

MRS (Man y col. 1960)

Peptona 10 g, Extracto de carne 5 g, Extracto de levadura 5 g, D Glucosa 20 g, Tween 80 1 ml, Citrato de amonio dibásico 2 g, Acetato de sodio 5 g, SO_4Mg anhidro 0,1 g, SO_4Mn 0,05 g, PO_4HK_2 2 g, H_2O destilada c.s.p. 1000 ml. pH 6,5± 0,1.(BIOKAR)

LAPTg (Raibaud y col. 1961)

Peptona de carne 1,5 g,Triptona 1,5 g, Extracto de levadura 1 g, Glucosa 1 g, Tween 80 0,1 ml. H_2O destilada c.s.p. 1000 ml. pH 6,0

ELLIKER (Elliker y col,1956)

Triptosa 3 g, Extracto de levadura 0,75 g, Gelatina 0,37 g, D Glucosa 1 g, Lactosa 1 g, Sacarosa 1 g, NaCl 0,3 g, Acetato de sodio 0,1 g, Ácido ascórbico 0,1 g, H_2O destilada c.s.p. 100 ml. pH 6,8

ÁCIDO SÓRBICO (Reuter, 1968)

Peptona de caseina 10 g, Extracto de carne 10 g, Extracto de levadura 5 g, D (+) glucosa 20 g, Acetato sódico 5 g, Citrato sódico 3 g, Tween 80 1 ml, SO_4Mg 0,2 g, SO_4Mn 0,05 g, Sorbato de potasio 0,54 g, H_2O destilada c.s.p. 1000 ml. pH 5 ±0,1

M17 (Terzaghi y Sandine,1975)

Triptona 2,5 g, Peptona de carne 2,5 g, Peptona de harina de soja 5 g, Extracto de Levadura 2,5 g, Extracto de carne 5 g, Lactosa 5 g, Glicerofosfato de sodio 19 g, SO_4Mg 0,25 g, Acido ascórbico 0,5 g, H_2O destilada c.s.p. 1000 ml. pH 7,1 ± 0,2 (BIOKAR).

TRIPTICASA SOYA

Peptona de caseina 17 g, peptona de soja 3 g, D glucosa 2,5 g, NaCl 5 g, PO_4HK_2 2,5 g, H_2O destilada csp 1000 ml. pH 7,3± 0,2.

MEDIO DE CONSERVACIÓN

Leche Descremada 10 g, Extracto de Levadura 0,5 g, Glucosa 1 g, H_2O destilada c.s.p. 1000 ml, Glicerol 10% (Comunicación personal, Gladys Martos; Cepario CERELA).

C. 2 -CEPAS

1-Lactobacillus plantarum CRL 691, cedida por CERELA
2-Enterococcus faecium CRL 35, " "
3-Clostridium perfringens OMS 4/94-1. Inst. Nac. Dr. Malbrán.
4-Staphylococcus aureus (Enterotoxina A)cedida por Bettera,S. y Frigerio,C.
5-Staphylococcus aureus (Enterotoxina B) " " "
6-Bacillus cereus " " "
7-Listeria monocytogenes . cedida por CERELA

1, 2, 5, 6 y 7: bacterias aisladas de alimentos.

Las bacterias lácticas se guardaron a – 20°C en el Medio de Conservación. Para el trabajo de rutina, las cepas fueron mantenidas mediante dos transferencias semanales en caldo LAPTg.

Las cepas de *Cl. perfringens, B. cereus, S. aureus y L. monocytogenes* 00se conservaron a – 20°C en Caldo Tripticase Soya (CTS), con 25 % de glicerol. Para *L. monocytogenes*, el CTS fue suplementado con 0,6 % de extracto de levadura.

C.3- AISLAMIENTO DE BACTERIAS LÁCTICAS

Se procesaron muestras de lactosuero y quesos artesanales elaborados en la región, además de muestras de leche cruda y suero-fermento utilizados en la elaboración de los mismos.

Las muestras se recolectaron en recipientes de plástico, con tapa a rosca, estériles y se trasladaron refrigeradas al laboratorio para su inmediato procesamiento.

Los quesos se procesaron de la siguiente manera: Se insertó el sacabocados, en forma oblicua, hacia el centro del queso (la técnica depende del tamaño y la forma). Se tomaron 5 porciones de distintas partes del mismo queso, cada una no menor de 5 grs, descartándose la porción de los 2 cm superficiales. Se trituró y mezcló.

A partir de esta muestra representativa se mezcló 11 gr con 99 ml. de citrato de sodio al 2 % precalentado a 40°C en una licuadora previamente esterilizada. Se homogeneizó para lograr la emulsificación de la muestra.

Diluciones decimales se realizaron inmediatamente, tomando cuidado de excluir la espuma de la pipeta (Marth 1984).

En el caso de muestras de Leche, Lactosuero y Suero fermento: se homogeneizaron 10 ml de muestra en 90 ml. de citrato de sodio precalentado; a continuación se realizaron diluciones decimales y se prosiguió como en el caso anterior.

De cada muestra se sembraron 3 diluciones por duplicado en los siguientes medios: LAPTg, Elliker, M17, Acido sórbico, y MRS, depositándose 0,1 ml en superficie y diseminándose con espátula de Drigalsky. Se eligieron diferentes diluciones, según fuera el queso de pasta blanda o dura.

En el primer caso la temperatura de incubación fue 30 ° C y en el segundo caso, 37 °C. Se incubó durante 72 a 96 hrs. En anaerobiosis por combustión de oxígeno.

Se eligieron placas de cada muestra con aproximadamente 100 colonias, y un número representativo de las mismas, macroscópicamente diferentes fueron elegidas al azar. Se seleccionaron aquellas que respondían a las siguientes características: cocos o bacilos, Gram positivos, catalasa negativa, no esporulados e inmóviles.

Fue necesario reaislar 3 veces consecutivas en medio sólido estriado por agotamiento, para tener la certeza de que la colonia provenía de un clon.

C.4 -DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Para poner en evidencia la presencia de cepas inhibidoras se utilizaron sucesivamente 2 protocolos.

Protocolo 1

Se llevó a cabo mediante el ensayo de difusión en pocillos (well diffusion agar: WDA). Se inocularon 10 μl. de un cultivo de las cepas indicadoras con una absorbancia a 650 ηm de: 0,2 en 3ml de ATS (0,75 % de agar), sobre una placa (100 mm de diámetro) que contenía 20 ml. de ATS (1,5% agar). Una vez seco se practicaron pocillos con una pajita de gaseosa estériles de 5 mm de diámetro (Fricourt y col. 1994).

Cultivos de 18 h en caldo LAPTg (de cada aislamiento) fueron centrifugados a 10000 rpm durante 20 min y los sobrenadantes se esterilizaron por filtración (Millipore, poro de 0,22 μm), depositándose 50 μl en cada pocillo. Se incubó durante toda la noche a 30 °C en microaerofilia. Se midieron los diámetros de la zona de inhibición con calibre, considerándose positivos halos ≥ 9 mm de diámetro (se incluye 5 mm del pocillo).

Se emplearon los siguientes patógenos alimentarios, como cepas indicadoras:

a)-*Clostridium perfringens.*

b)-*Staphylococcus aureus.* Una cepa productora de enterotoxina "A" y otra de Enterotoxina " B" .

c)-*Bacillus cereus.*

d)-*Listeria monocytogenes.*

Las cepas se cultivaron en CTS a 37°C en aerobiosis; en el caso de *L. monocytogenes* el CTS se suplementó con extracto de levadura, y *Cl. perfringens* requirió una atmósfera de 20 % de CO_2.

Protocolo 2

Se utilizó la misma técnica, pero como cepa indicadora se utilizó un cultivo de *L. plantarum* CRL 691, del cual se mezclaron 70 μl con 3 ml de medio MRS semiblando (0,75% de agar), preparado con concentración reducida de D Glucosa 0,2 %, evitando así una excesiva producción de ácido.

Se colocó 50 μl del sobrenadante en los pocillos, y se dejó a 4 °C durante 2-4 h para permitir la difusión del mismo; posteriormente se llevó a 30°C. Al cabo de 18 h se midieron con calibre los diámetros de la zona de inhibición. Se consideró positivo un halo mayor o igual a 9 mm de diámetro (incluyendo 5 mm del pocillo) (Farias y col.1994); (Murinda y col.1995);(Lewus y Montville 1991).

C.5 -DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS

Para adjudicar la propiedad antagónica a sustancias tipo bacteriocinas fue necesario descartar el efecto de la acidez y del peróxido de hidrógeno como posibles inhibidores del crecimiento.

Para aquellos aislamientos con actividad antimicrobiana detectados siguiendo el *Protocolo 1* se utilizó la misma técnica, sembrándose como césped los patógenos alimentarios que resultaron inhibidos en una primera instancia, en un volumen de 10 μl con una absorbancia a 650 ηm de: 0,2 en 3 ml. de ATS semiblando.

El cultivo de las posibles cepas productoras se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 25 min, el sobrenandante se llevó a pH 7 con NaHO 0,1 N y se lo trató con catalasa (65 U/ml) durante 4 h a 25 °C.

Se esterilizó por filtración con filtro Millipore de 0,22 μm. de poro y de este sobrenadante libre de células se inoculó 50 μl en cada pocillo. (Martinez y col. 1995).

Ensayos realizados: a) Sobrenadante sin neutralizar y b) Sobrenadante neutralizado y tratado con catalasa.

Los controles usados se detallan a continuación.

a)- caldo MRS.

b)- Sobrenadante de cepa productora de Enterocina 35 (*E. faecium* CRL 35)

c)- H_2O_2 en agua destilada.

d)- H_2O_2 más catalasa.

e)- Catalasa en agua destilada

En el caso de las cepas detectadas con el *Protocolo 2*. Se les repitió la experiencia, usándose la misma cepa indicadora, *L. plantarum*. Sembrándose en los pocillos el sobrenadante del cultivo, de las posibles cepas productoras, neutralizado y tratado con catalasa, como se describió anteriormente. Se realizaron los mismos ensayos y controles citados en *Protocolo 1.*

C. 6 -ESPECTRO DE ACCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

Para conocer el espectro de acción de los aislamientos que dieron positiva la prueba de producción de bacteriocinas, se siguió el esquema propuesto en el *Protocolo 1* sembrándose como césped 10 μl de los patógenos alimentarios. Se llenaron los pocillos con 50 μl. del sobrenadante libre de células de las cepas productoras de bacteriocinas, el cual fue neutralizado y tratado con catalasa. Los ensayos se realizaron por duplicado (Fricourt y col. 1994).

C.7-PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS

Se realizó un ensayo de producción de bacteriocinas, semicuantitativo, a los efectos de conocer la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las bacteriocinas.

A tal efecto, se realizaron diluciones seriadas con factor 2, del extracto crudo en agua destilada y se probó actividad biológica frente a *L. plantarum* por el método de WDA.

El título del extracto se expresó en Unidades Arbitrarias / ml. (U.A./ml), calculado por la fórmula (1000/50) x (1/D). Donde "D", es la mayor dilución que inhibe el crecimiento en 18 h de la cepa indicadora y 50 μl el volumen usado (Daba y col. 1991);(Farias y col.1994).

C.8-PRUEBAS TAXONÓMICAS

Preparación del inóculo, tiempo y temperatura de incubación:

Se centrifugó 5 ml de un cultivo activo en MRS a 3000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se lavó con solución fisiológica. Las células se resuspendieron en el volumen inicial de medio estéril, y se sembró un inóculo al 2% para las siguientes pruebas: desde C8 c hasta C8 l. Se incubó 5 días a 30 °C, en microaerofilia, salvo indicación contraria.

C.8 a- Prueba de la catalasa

Procedimiento

Se depositó una gota de agua oxigenada al 30% sobre un portaobjetos y sobre ella se colocó una colonia aislada de un cultivo de 24 h. crecido en MRS agarizado.

Resultado

positivo: formación inmediata de burbujas

negativo: no hay formación de burbujas.

C. 8 b- Movilidad

Procedimiento

Un cultivo joven de 18 h. se examinó en fresco, usando iluminación reducida.

C.8 c-Crecimiento a distintas temperaturas

Se sembró un inóculo al 2 % en tubos con 5 ml de caldo MRS, colocándose en baños termostatizados a las siguientes temperaturas: 10°, 45° y 50 °C. Se observó el desarrollo hasta los 5 días.

Resultado

Crecimiento: desarrollo de turbidez

No crecimiento: ausencia de turbidez.

C.8 d- Tolerancia a 4% de NaCl

Medio de Facklam and Wilkinson (extraído de Tesis Doctoral de G. Savoy de Giori).

Caldo infusión cerebro corazón 25 g; NaCl 39,92 g; glucosa 1 g; H_2O destilada 1000 ml. pH 7-7,2.

Se sembró el inóculo al 2 %, y se incubó 5 días a 30 °C.

Resultado

Reacción Positiva: turbidez

Reacción negativa: ausencia de turbidez.

C.8 e-Tolerancia a 6,5 % de NaCl

Se determinó como en el caso anterior, cambiando la concentración final de NaCl, que en este medio alcanza 6,5 %.

C.8 f- Crecimiento a pH 9,6

Medio de Shattock y Hirsch (extraído de la Tesis Doctoral de la Dra. G. Savoy de Giori).

A) Caldo glucosa Lemco pH 9,60: D glucosa 10,0 g; extracto de carne 10 g; peptona 10,0 g; NaCl 5,0 g, H_2O destilada 1 litro.

B) Solución buffer: glicerina 7,50 g; NaCl 5,85g; H_2O destilada, 1 litro.

Procedimiento

A 900 ml. de caldo glucosa Lemco, se le agregaron 100 ml. de Solución buffer. Se ajustó el pH a 9,8 con NaHO 1 N. Se dejó toda la noche en frío para completar la precipitación y se esterilizó por filtración. (Se distribuyó en tubos ocupando la totalidad de su capacidad para evitar la presencia de aire.)

Resultado

Reacción positiva: turbidez

Reacción negativa: ausencia de turbidez.

C.8 g- Crecimiento a pH 9,2

Se preparó como en C.8f, en éste medio el pH se llevó a 9,2.

C.8 h -Test de Voges Proskauer

Procedimiento

Medio de Clark y Lubs: peptona 5,0 g; D glucosa 5,0g; PO_4HK_2, 5,0 g; H_2O destilada 1000 ml. pH 7,5.

Reactivo A: alfa naftol al 5% en etanol absoluto.

Reactivo B: KHO al 40 % en agua destilada.

A un cultivo desarrollado en este medio se le agregó 0,6 ml. del Reactivo A y 0,2 ml del reactivo B por ml. de cultivo, agitándose bien luego de agregar cada reactivo. Se leyó entre los 15 min. y 60 min.

Resultado

Positivo: desarrollo de color rosa

Negativo: sin cambio de color

C. 8 i- Agar leche -citrato

Procedimiento

A) Citrato de sodio al 10 %

B) Leche al 10 % (10,5 ml)

C) Agar al 2 % (4 ml)

Se agregó 0,5 ml. de citrato de sodio a cada tubo de leche. Se agitó y dejó reposar 30 min. Se inoculó 0,1 ml. del cultivo y se agregó el cultivo en leche citratada sobre los 4 ml. de agar fundido y enfriado a 45 °C. Se mezcló por inversión e incubó a 30 °C por 3 días.

Resultado

Reacción positiva: se producen grietas en el agar por la producción de CO_2.

(Comunicación personal de Gladys Martos, responsable del Cepario de CERELA).

C .8 j- Supervivencia a 60 °C

Se cultivó a la cepa en caldo nutritivo durante 24 h y a continuación se la colocó en Baño de Maria a 60°C durante 30 min. Se enfrió bajo agua corriente y se subcultivó en una placa de agar nutritivo, sembrándose 0,1 ml. y diseminándose con espátula de Drigalsky. Se incubó a 30 °C, durante 24 h.

Resultado

Supervivencia a 60 °C: crecimiento

C. 8 k - Producción de CO_2 de glucosa

Medio de Gibson (extraído de tesis doctoral de G. S . de Giori).

Extracto de levadura, 2,5 g; glucosa 50 g.; leche descremada reconstituida 800ml; agar nutritivo 200 ml y Solución de SO_4Mg 0,4 %, 10ml. pH a 6,5.

Procedimiento

Se fundió el medio por calentamiento a 100°C, cuando alcanzó los 45°C se inoculó con 0,5 ml. de un cultivo joven. Mezclándose por rotación, y se dejó coagular. Período de incubación hasta 7 días.

Resultado

Positivo: Producción de CO_2, si hay ruptura del agar o por presencia de burbujas de gas en el medio

C. 8 I-Tolerancia a bilis

Medio Agar Bilis (Norris y Ribbons 1970)

Extracto de carne 3 g.; bacto peptona, 5 g.; NaCl 5 g. oxgall deshidratada 40 g, agar , 9 g; H_2O destilada 1000 ml.

Se sembró un cultivo joven, se lo incubó durante 48 h.

Resultado

Positivo: crecimiento

Negativo: ausencia de crecimiento

Nota: 1% de oxgall deshidratado equivale a 10% de bilis (Vol/Vol).Para preparar 40 % de Agar Bilis es necesario usar 4 % de oxgall deshidratado.

C.8 II- Fermentación de carbohidratos API 50 CHL

Se utilizó la galería API 50 CHL-bioMérieux, que contiene 49 azúcares. Se procedió de la siguiente manera: Un cultivo en caldo MRS de toda la noche se centrifugó 10 min a 5000 rpm. Las células fueron lavadas con sol. fisiológica estéril, resuspendiéndose en 2 ml.

Se agregaron gotas de esta suspensión a un tubo conteniendo 10 ml. de agua destilada. Se leyó la absorbancia a 550 ηm. La lectura realizada frente a un blanco de agua destilada estuvo entre 0,5 y 0,75. Luego se agregó igual inóculo al medio API 50 CHL y se sembró en la galería de pruebas.

Se cubrió cada microcápsula con vaselina estéril para crear un ambiente de microaerofilia. Se incubó a 30 °C y los resultados se observaron a las 24 y 48 h (comunicación personal de Gladys Martos, Cepario CERELA).

Resultado

Positivo: viraje de púrpura al amarillo

Negativo: sin viraje del indicador.

En el caso del test de hidrólisis de la esculina (prueba N° 25) el cambio de color es de rojo a negro.

C.9-CARACTERIZACIÓN PRIMARIA DE LAS SUSTANCIAS ANTIBACTERIANAS

C.9 a - SENSIBILIDAD A PROTEASAS

La molécula funcional de una bacteriocina es por definición una proteína, cuya destrucción inequívocamente elimina su efecto antibacteriano y es el criterio clave de identificación.

Las enzimas usadas fueron las siguientes: proteasa tipo IV(P 0384) 0,7 U/ml, proteasa tipo XXV (P 6911) 5 U/ ml, proteinasa K (P 2308)11,7 U/ml, tripsina (4799) , papaína (P 4762) 15 U / ml y pepsina (P 6887) 4,15 U/ ml (Sigma) . Las enzimas se disolvieron en buffer Fosfato de Sorensen (PO_4H_2K / PO_4HNa_2)0,06 M.

Las cuatro primeras a pH 7,4; papaína a pH 6,2 y pepsina a pH 6. Se mezcló 50 μl de 2 veces la CIM del sobrenadante del cultivo libre de células más 50 μl de la solución de enzima a ensayar. La concentración final de proteasas fue de 1mg/ml.

Tripsina y papaína se incubaron a 25° C, proteinasa K a 30°C y las demás enzimas a 37°C, durante 4 hs.

Luego se probó actividad biológica usando *L. plantarum* como cepa sensible. (Ali y col. 1995);(Daba y col.1991).

Controles Negativos: - Buffer
- Soluciones de enzimas en buffer

Control Positivo: - Sobrenadante más buffer

C.9 b- EFECTO DE LA TEMPERATURA

Se probó la resistencia al calor de los sobrenadantes de las cepas productoras a las siguientes temperaturas: 65, 100° y 121° C durante 15 y 30 minutos, y autoclavado (121 atm, 15 min).

Después del calentamiento se enfrió hasta temperatura ambiente y se ensayó actividad (Lyon y col. 1995).

El sobrenadante de las cepas productoras sin tratamiento térmico fue usado como control.

C. 9 c-ESTABILIDAD FRENTE AL pH

Se evaluaron pH: 2,0; 4,0; 7,0; 9,0 y 11,0 utilizando buffer Citrato I de Sorensen para llevar a pH 2,0 y 4,0. Buffer Fosfato de Sorensen para pH 7,0 y 8,0. Buffer Glicina II de Sorensen para pH 9,0 y 11,0.

Se mezcló sobrenadante y buffer doble concentración en una relación 1:1. Se incubó a 30°C durante 5 hrs (Valdez Stauber y Scherer 1994).

A continuación se expuso una fracción a 100° C durante 10 min para determinar si la termoestabilidad se mantiene a pH extremos (Farias y col. 1994);(Casla y col.1996).

C.10- DOSAJE DE PROTEINAS TOTALES

Se cuantificó por espectrofotometría al UV , absorbancia a 280 ηm en EspectronicGENESYS™5(Rammelsberg,col,1990).

A partir de una solución patrón: proti-2, Suero Patrón, (PT 5,5 g/dl) (Wiener Lab.) se realizaron diluciones y se leyó la absorbancia a 280 ηm, usando cubetas de cuarzo. Como blanco se usó agua destilada.

Con esos valores se confeccionó una curva de calibración: Abs 280 ηm versus Concentración de Proteínas totales (mg/ ml) .

Con los valores de DO de las soluciones de concentración desconocida, por extrapolación en la curva, se conocieron las concentraciones de las mismas.

C.11- PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA BACTERIOCINA

C .11 a -PRECIPITACIÓN con $SO_4(NH_4)_2$

C.11 a1-) Precipitación fraccionada a 35 - 75 % de saturación de $SO_4(NH_4)_2$. Determinación de la actividad biológica

Para ello se hizo crecer a la bacteria productora de bacteriocina en caldo MRS durante 24 h .Se centrifugó a 33000 rpm durante 20 min, en una ultracentrífuga Beckman L7, refrigerada y se recuperó el sobrenadante.

1° paso: Primeramente se le agregó, en forma lenta, hasta un 35 %(P/V) de saturación, en agitador magnético. La cantidad de sal a agregar a la solución para alcanzar la saturación deseada a 0°C se conoció a partir de una tabla de concentración (Curso CABBIO, 1998: Biotec. y Biol. Molec. de bacterias lácticas).

Al cabo de 2 h, se centrifugó a 33000 rpm a 0°C, durante 30 min y se separó el sobrenadante. El precipitado se disolvió en agua estéril.

2° paso: Al sobrenadante separado anteriormente se le agregó sal hasta un 50 % de saturación, y al cabo de las 2 h se procedió como en el 1° paso, se centrifugó, separándose el precipitado del sobrenadante.

3° paso: Se saturó el sobrenadante del paso 2°, hasta un 60 % y se repitió el proceso.

4° paso: se alcanzó un 75 % de saturación con $SO_4(NH_4)_2$ para el sobrenadante del paso anterior y se continuó igual que antes.

En cada paso se determinó la actividad biológica por difusión en agar, tanto del precipitado como del sobrenadante, depositándose 50 ul en los pocillos de cada fracción sin realizar diluciones.

C .11 a2-) Precipitación fraccionada a 35 - 50 % de saturación. Determinación de actividad biológica y lecturas espectrofotométricas.

Conociendo el porcentaje de saturación que precipita la mayor parte de la proteína de interés, se repitieron el 1° y el 2° paso estudiándose no sólo actividad biológica, sino dosando también proteínas totales por espectrofotometría a 280 ηm.

El cultivo de la bacteria productora de bacteriocina crecido en caldo MRS se centrifugó a 33000 rpm 20 min, a 4°C.

1° paso: a) Al sobrenadante obtenido se le agregó $SO_4(NH_4)_2$ hasta un 35% de saturación y se lo llevó a 0°C, durante 2 h en agitación.

b) Paralelamente se procesó el blanco de reactivo para corregir las lecturas de Absorbancia a 280 ηm (Abs_{280}); para ello se usó caldo MRS estéril, se procedió como en a).

A continuación se centrifugaron a) y b) a 33000 rpm, 30 min. Se separaron los sobrenadantes de los precipitados. Estos últimos se solubilizaron en agua estéril.

Se los denominó

I) "precipitado 35 % ", II) "blanco 35%".

2° paso: Los sobrenadantes separados en el paso anterior fueron llevados a 50% de saturación y se procedió igual que en el caso anterior. Después de 2 h. se centrifugaron y a los precipitados disueltos se los llamó:

III)" precipitado 50% ", IV) " blanco 50%".

Se realizaron las siguientes determinaciones:

* Proteínas totales Se determinó Abs_{280} a las muestras I, II, III y IV. Con esos valores **se** conoció: concentración de Prot. Totales, por extrapolación en la curva antes citada en C.10.

* Se cuantificó UA /ml. Se siguió la técnica de difusión en agar, realizando diluciones en factor 2x a las muestras: I y III. Así se conoció la cantidad de bacteriocina.

C. 11 b- DIÁLISIS

Se hizo una estimación de la masa molecular por retención de los péptidos bioactivos en membrana de diálisis.

Para ello las proteínas precipitadas con 35% y 50% de sal, fueron sometidas a un proceso de diálisis en saco de celulosa con poro de exclusión de 12000 Da, con 4 recambios de agua destilada estéril durante 24 h.

Este procedimiento se siguió para las muestras: I, II, III y IV(obtenidos C.11 a 2) (1° y 2° paso).

Se analizaron:

1)proteínas retenidas (PM >12000)

2) proteínas dializadas.(PM < 12000)

En ambos casos se realizaron las 2 determinaciones antes mencionadas:

* absorbancia a 280 ηm. y * actividad biológica (UA/ml)

1) proteínas retenidas Se obtuvieron 4 muestras directamente a partir del contenido de la bolsa de diálisis, al cabo de 24 h:

a) IDp35 (Intra Diálisis del precipitado a 35% de sal)
b) IDb35 (Intra Diálisis del blanco a 35 %)
c) IDp50 (Intra Diálisis del precipitado a 50 %)
d) IDb50 (Intra Diálisis del blanco a 50%)

Se determinó: * Absorbancia a 280 ηm para: a, b, c, y d.

* Act. Biológica para: a y c.

2) proteínas dializadas: Fue necesario recolectar el agua procedente de los 4 recambios realizados al cabo de las 24 h de diálisis.

El volumen total de agua procedente de la diálisis de muestra: a) se lo llevó a 35 % de saturación con sal y en el caso de b) se saturó a 35% y a continuación hasta 50% de saturación, para obtener después de centrifugar los correspondientes precipitados, que se disolvieron en agua.

De esta forma se obtuvo las muestras:

a') EDp35 (Extra Diálisis del precipitado a 35% de saturación)

b') EDp50 (Extra Diálisis del precipitado a 50% " ")

A ambas muestras se les determinó:* Act. Biológica.

* Absorbancia a 280 ηm.

Los blancos usados en este caso fueron para:

a')- agua con 35 % de saturación con sal.

b')- agua con 35 y despues 50 % de sal.

Por último, se calculó Actividad Específica, resultado del cociente entre las Unidades arbitrarias (UA/ml) y Concentración de Prot. Totales (mg/ml) y también el Factor de Purificación, el que representa el incremento de la Actividad Específica en cada paso, con respecto al sobrenadante de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

D .1- AISLAMIENTO DE BACTERIAS LÁCTICAS

Se procesaron dos quesos de pasta dura, ocho de pasta blanda, cinco muestras de suero fermento, siete de lactosuero y dos de leche de distintas zonas del Sur de Córdoba, durante el período Junio 1997 a Noviembre 1998.

Aislándose un total de 206 bacterias del ácido láctico. De las cuales, 24 provienen de muestras de queso pasta dura, 84 de pasta blanda, 39 de lactosuero, 29 de leche y 30 de suero fermento.

Los aislamientos respondían a las siguientes caracterísicas, cocos o bacilos, Gram positivos, catalasa negativos, inmóviles y no productores de endosporas.

D. 2- DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Siguiendo el ***Protocolo 1:*** se estudiaron 136 aislamientos y se detectaron 68 cepas capaces de inhibir a uno o a varios de los patógenos alimentarios .

AISLAMIENTOS CON CAPACIDAD DE INHIBICION A:

S. aureus **Enterotoxina A** (fueron 36 de 134 aislamientos ensayados) : S 6, S 7, 5Q 14, 5Q 16, 5Q 17, 5 Q 2**,K 1, K 3, K 8; K 9, K 10, K 12, K 13, K14, K 15, K 16, K 19, K 20, Q 2, Q 5, Q 6, Q 7, Q 9, 1F 4, L 5,L 7, L 9, L 13, 6 Q18, 7Q 4, 7Q 5, 7Q 14, 7Q 2**, 7Q E, 7Q N, 8Q 9, 8Q 10 y 8 Q 16.
Cepas en color: dato mostrado en Foto N° 1

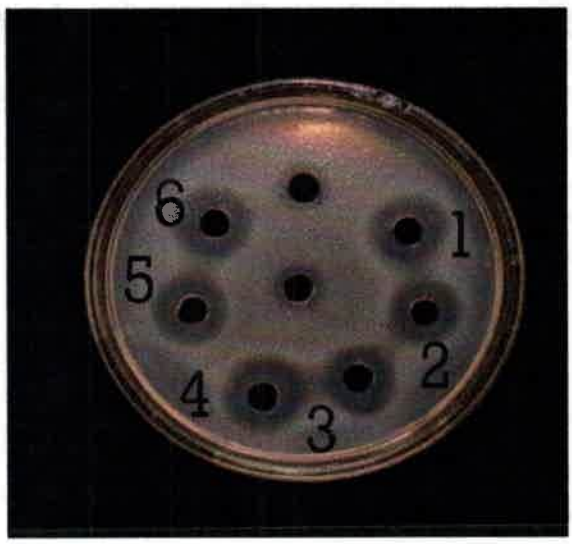
S. aureus **Enterotoxina B** : (fueron 4 de 123 aislamientos ensayados):K 12, S 6, Q 9 y 8 Q 16.

L. monocytogenes: (fueron 2 de 52 aislamientos ensayados): S 6 y L9.

B. cereus (se obtuvieron 58 de 133 probadas):S 5,S 6,S 8, S 9, S 10, S 11, 5Q 1, 5Q 4, 5Q 11, 5Q 13, 5Q 14, 5Q 17, 5Q 20, 5Q2**, 5Q2***, K 1, K 4, K 5, K 6, K 8, K 9, K 10, K 12, K 13,K 14,K 15, K 16, K 18, K 19, K 20, K , 7Q 4***, Q 1, Q 2, Q 3, Q 4, Q 5, Q 6, Q9, Q 11, 2K, 1F 6, 1F 3, L 5, L 9, L 11, L 13, 6Q 8, 6Q 18, 7Q 5, 7Q 14, 7Q 2**, 7Q E, 8Q 10, 8Q 12, 8Q 14, 8Q 16 y 8Q C.

Aislamientos que dieron positiva la inhibición de ***S. aureus*** **Enterotoxina A,** ***B. cereus*** **y** ***L. monocytogenes*** : S 6 y L 9.

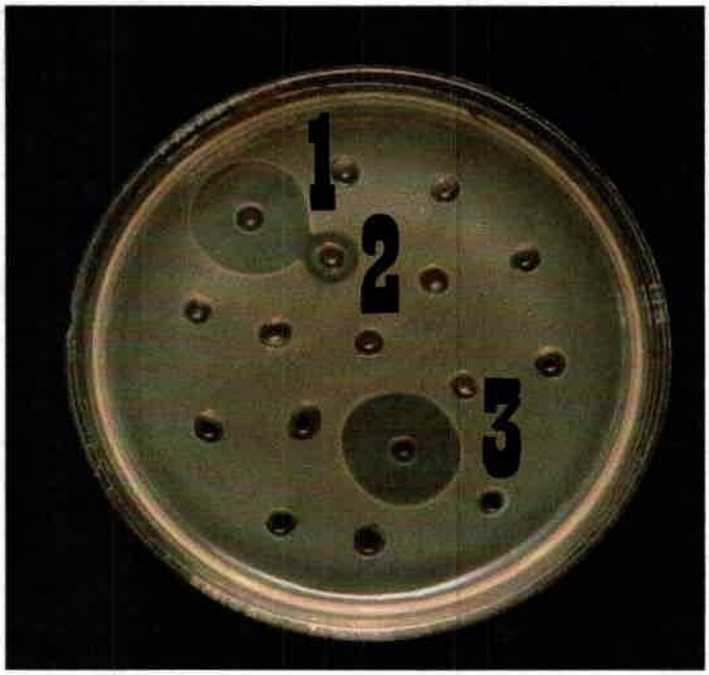
Foto N° 1. Bacterias lácticas con actividad antimicrobiana contra *S. aureus* Enterotoxina A.



Referencias: 1) K9, 2)K10, 3)K12, 4)K13, 5)K14, 6)K15.

Por el ***Protocolo 2*** :de 70 aislamientos enfrentados a *Lactobacilus plantarum* C.R.L. 691, se encontraron 3 con acción antagónica: S2,S3 y S6, provenientes de una muestra de lactosuero de queso criollo.

Foto N° 2. Bacterias lácticas activas contra *L. plantarum*



Referencias : 1) S2, 2)S3 y 3)S6

Las cepas con actividad inhibitoria detectadas en el muestreo suman 71 (protocolo 1 y 2) lo que representa un 34 % del total de las cepas estudiadas .

D. 3- DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINA

La inhibición antes detectada puede darse por diversos factores, ácidos orgánicos, H_2O_2 ó bacteriocinas, para detectar si el componente responsable de la inhibición es del tipo de las bacteriocinas , fue necesario descartar el efecto de los dos primeros factores.

El sobrenadante libre de células de cada una de las 68 cepas aisladas en el ***Protocolo 1***, capaces de inhibir a alguno de los patógenos ensayados fue neutralizaddo, tratado con catalasa para descartar el posible efecto de H_2O_2 repitiéndose la experiencia de difusión en placa para determinar si continuaba manifestando actividad antimicrobiana

Los resultados de los ensayos fueron los siguientes:

1) Sobrenadante sin tratamiento: inhibición (+) en todos los casos.
2) Sobrenadante neutralizado y tratado con catalasa: No se detectó inhibición en ningún caso.

Por lo tanto, se puede adjudicar el efecto inhibitorio a la presencia de ácido lactico y/o peróxido de hidrógeno.

Los tres aislamientos con actividad antimicrobiana , S2,S3 y S6 de acuerdo al ***Protocolo 2*** fueron ensayados según detalle:

1) sobrenadante sin tratar: inhibición (+).
2) sobrenadante del cultivo libre de células, neutralizado y tratado con catalasa : Se observó actividad antagónica frente a *L. plantarum*, en los tres casos. Por lo tanto se descartó inhibición por ácido o peróxido de hidrógeno .

Los controles usados en Protocolo 1 y 2 fueron:

a) Medio MRS:(-)
b) Enterocina 35 (+)
c) H_2O_2 y H_2O (+)
d) H_2O_2 y catalasa: (-)
e) catalasa y H_2O: (-)

(-) No hubo inhibición (+) Sí hubo inhibición

En los pocillos donde se sembró caldo MRS, catalasa y peróxido de hidrógeno y en aquel conteniendo catalasa y agua , no se detectó inhibición. Por el contrario se observaron zonas de inhibición, al sembrar el sobrenadante de la cepa productora de Enterocina 35, peróxido de hidrógeno más agua(Datos no mostrados).

Por lo tanto se concluye que de los 68 aislamientos estudiados por el Protocolo 1, no se detectó ninguna cepa productora de sustancias tipo bacteriocinas. En cambio los 3 aislamientos detectados por el Protocolo 2, resultaron ser productores.

Como resultado de la comparación de las 2 Metodologías aplicadas en el aislamiento de BAL con actividad antagónica, se desprende que el Protocolo 2 resultó más apropiado, en el cual se usó *L. plantarum* como cepa indicadora. Por ser esta una bacteria láctica es más resistente al ácido láctico y al H_2O_2, y su inhibición puede ser adjudicada a bacteriocinas.

Según los resultados expuestos se seleccionaron tres cepas productoras de bacteriocinas a partir de 206 aislamientos de bacterias lácticas (136 según el Protocolo 1 y 70 según Protocolo 2), lo que representa 1,4 % de cepas productoras a partir del análisis de 24 muestras de productos lácteos.

Estos hallazgos son coincidentes con los resultados de Coventry y col. (1997) quienes sugieren que, un gran número de aislamientos de BAL deben ensayarse para poder identificar cepas productoras de bacteriocinas. Estos autores encontraron sólo 0,2% de cepas bacteriocinogénicas a partir de 72 muestras de lácteos y carnes.

Similares resultados fueron obtenidos por Casla y col. (1996), ya que de 203 BAL aisladas de leche cruda y quesos de cabra artesanales, sólo 4 cepas fueron productoras de bacteriocinas.

D . 4- ESPECTRO DE ACCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS.

Las sustancias producidas por las cepas S2, S3 y S6 resultaron activas contra *S. aureus* Enterotoxina A, *S . aureus* Enterotoxina B, *Bacillus cereus, L. monocytogenes* y *Cl. perfringens* (Tabla 1).

La acción antagónica frente a *L. monocytogenes* está descripta en la mayoría de las publicaciones sobre bacteriocinas de BAL, dado el particular interés, por combatir la listeriosis en alimentos.

Es de destacar el amplio espectro de acción de las Enterocinas S2, S3 y S6.

Tabla N° 1. ESPECTRO DE ACCIÓN DE LAS ENTEROCINAS S2, S3 y S6

Especies Sensibles	**Actividad Antimicrobiana** *Diámetro de la zona de inhibición (mm)*		
	S2	**S3**	**S6**
Cl. perfringens	19	20	19
S. aureus Ent A	13	11	11
S. aureus Ent. B	9	13	13
B. cereus	15	11	9
L monocyto-genes	15	15	17

La zona de inhibición incluye 5 mm de diámetro del pocillo.

D. 5- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS

Se comparó la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) de las tres cepas productoras (S2, S3 y S6), las que se evaluaron en una misma experiencia bajo idénticas condiciones de trabajo. La técnica empleada fué WDA. Como cepa sensible se utilizo: *L. plantarum,* demostrándose que el valor de CIM, no es el mismo para las tres cepas.

Se expresó el título de las bacteriocinas en Unidades Arbitrarias / ml. (U.A./ml) aplicando la fórmula: (1000/50) x (1/D) .

Para S2 y S3 , el "D "fue 1/8 dando como resultado 160 UA/ml. En cambio, para S6 el valor "D" fue 1/32 obteniéndose 640 UA/ml.

Este estudio semicuantitativo arrojó el mayor valor de CIM para la Enterocina S6.

D.6-IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

Los resultados de las pruebas metabólicas, se muestran en la Tabla 2 y el perfil de fermentación de azúcares en la Tabla 3. Con todos estos datos se identificaron las tres cepas con ayuda de tablas.(Cowan y Steel's 1995); (Haba y Pérez 1992); (Holt y col. 1994)

Según Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology, el género *Enterococcus* comprende células esféricas u ovoides que se presentan de a pares o en cadenas cortas en medio líquido, tienen un metabolismo fermentativo, fermentan un amplio rango de carbohidratos con producción principalmente de ácido láctico L(+), sin formación de gas y dando un pH final entre 4,2-4,6. Usualmente crecen a 10°C y 45°C, a pH 9,6 en presencia de 6,5 % de NaCl y de 40% de bilis.

En función de los resultados de Tabla 2 y 3, se deduce que los tres aislamientos pertenecen al Género *Enterococcus,* ya que responden a las características del género.

Las cepas S2 y S6 se identificaron como *E. durans y* S3 como *E. hirae.* Estas dos especies tienen un perfil fermentativo muy semejante pero difieren en que la primera es melibiosa y sacarosa (-)

E. durans y E. hirae son miembros del grupo " faecium", según homología del RNAr 16 S.(Franz y col. 1999)

Tabla N° 2. PRUEBAS METABÓLICAS

CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS		
PRUEBA	**S2 Y S6**	**S3**
COLORACION DE GRAM	+	+
MORFOLOGÍA	COCOS OVOIDES, EN CAD.CORTAS	COCOS DE A PARES
CATALASA	-	-
MOVILIDAD	-	-
ESPORAS	-	-
CRECIMIENTO A:		
10°C	+	+
45°C	+	+
50°C	-	-
2% ClNa	+	+
4% ClNa	+	+
6,5 % ClNa	+	+
pH 9,2	+	+
pH 9,6	+	+
PRUEBA DE GIBSON	-	-
OXIDASA	-	-
NITRATO REDUCTASA	-	-
VOGES PROSKAUER	+	+
pH FINAL EN MRS	4,5	4,3
SHOCK TÉRMICO (60°C ,30 min.)	+	+
CRECIMIENTO EN 40% DE BILIS	+	+
LECHE CITRATADA	-	-

Tabla N° 3 .UTILIZACIÓN DE AZUCARES

AZUCAR	S2 S6	S3	AZÚCAR	S2 S6	S3
CONTROL	-	-	ESCULINA	+	+
GLICEROL	-	-	SALICINA	+	+
ERITRITOL	-	-	MALTOSA	+	+
D-ARABINOSA	-	-	LACTOSA	+	+
L-ARABINOSA	-	-	MELIBIOSA	-	+
RIBOSA	+	+	SACAROSA	-	+
D-XILOSA	-	-	TREHALOSA	+	+
L-XILOSA	-	-	INULINA	-	-
ADONITOL	-	-	MELEZITOSA	-	-
B-METIL-XILÓSIDO	-	-	D-RAFINOSA	-	-
GALACTOSA	+	+	ALMIDÓN	-	-
D-GLUCOSA	+	+	GLICOGENO	-	-
D-FUCOSA	+	+	XILITOL	-	-
D-MANOSA	+	+	B-GENTIOBIOSA	+	+
L-SORBOSA	-	-	D-TURANOSA	-	-
RAMNOSA	-	-	D-LISOSA	-	-
DULCITOL	-	-	D- TAGATOSA	-	-
INOSITOL	-	-	D-FUCOSA	-	-
MANITOL	-	-	L-FUCOSA	-	-
SORBITOL	-	-	D-ARABITOL	-	-
A-METIL-D-MANÓSIDO	-	-	L-ARABITOL	-	-
A-METIL-D-GLUCÓSIDO	-	-	GLUCONATO	-	-
N-ACETIL-GLUCOSAMINA	+	+	2 CETO-GLUCONATO	-	-
AMIGDALINA	+	+	5 CETO-GLUCONATO	-	-
ARBUTINA	+	+			

(+) Fermentación ; (-) No fermentación

Las tres cepas seleccionadas en este trabajo pertenecen a un mismo género: *Enterococcus;* la preponderacia de este grupo bacteriano en muestras de leche y derivados ha sido destacado por varios autores.

Ali y col.(1995), de 77 aislamientos de lácticas de leche cruda y quesos artesanales, encontraron 38 cepas pertenecientes a este género.

Simonetta y col.(1997) estudiaron 37 cepas de enterococos aisladas de leches y productos lácteos de la zona de Santa Fe; 10 resultaron ser *E. durans* y de ellas, 4 producían bacteriocinas.

El grupo de Casla y col.(1996) a partir de un total de 203 cepas estudiadas de leche cruda de cabra, y quesos artesanales, encontraron 49 pertenecientes al género *Enterococcus* .

En quesos Suizos, los enterococos representan un 12% de la microbióta y en el queso Cheddar, más del 50% de la microflora (Giraffa 1995). La mejor calidad de aroma y textura de la pasta de este último está asociada a la presencia de *E. durans y E. faecium.* Por otra parte se destaca la presencia de estas dos 2 especies en leches pasteurizadas.

Giraffa (1995) analizaró 48 variedades de quesos italianos blandos y semiduros al final de la etapa de maduración y en el 96% de ellos se encontró una presencia relevante de enterococos. Ellos afirman que los grandes cambios tecnológicos implementados en la recoleción de la leche y en la elaboración de los quesos, con la consiguiente mejora en la calidad microbiológica del producto, no trajo aparejado una disminución de la cantidad de enterococos presentes en los mismos .

La presencia de enterocos en productos lácteos ha sido considerada por largo tiempo como indicador de condiciones sanitarias insuficientes .Por el contrario, otros autores sugieren que los enterococos cumplen un rol importante en algunos quesos, ya que están presenten en un número elevado (10^7-10^8 UFC/gr) como flora normal, siendo los responsables del bouquet durante el almacenamiento.(Giraffa y col. 1997).

Tampoco hay una estrategia coherente para establecer los criterios de las Prácticas de Buena Manufactura (GMP), que establecen valores máximos de coliformes y *Escherichia coli* tolerados , considerados como indicadores de higiene, pero no mencionan a los enterococos. (Giraffa y col. 1997).

D. 7-CARACTERIZACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

D.7 a) SENSIBILIDAD A ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Las bacteriocinas son compuestos de naturaleza proteica; por lo tanto, una forma de demostrar que la sustancia inhibitoria es una bacteriocina, es probando su sensibilidad a proteasas.

Se ensayaron las siguientes enzimas: proteasa tipo IV y XXV, pepsina, papaína, proteinasa K y tripsina.

En Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos. Las sustancias producidas por ***E. durans y E. hirae*** son sensibles a proteasa tipo IV, tipo XXV , pepsina, proteinasa K y tripsina. Sólo se detectó vestigio de actividad para S6 en presencia de papaína, a una concentración de 15 U/ ml y 4 h de incubación. (Foto 3) .

Controles: a) Buffer: (-)

b) Enzima más buffer: (-)

c) Sobrenadante más buffer: (+)

(-) No inhibición y (+) Inhibición

Estos resultados confirman que el compuesto con acción inhibidora es una bacteriocina.

Las bacteriocinas producidas por especies del género *Enterococcus* se denominan Enterocinas. Las halladas en este estudio se denominaron Enterocina S2 y S6 (*E. durans* S2 y S6 , respectivamente) y Enterocina S3 (*E. hirae* S3) .

Este comportamiento frente a diversas proteasas es compartido por otras bacteriocinas (Casla y col. 1996);(Ali y col.1995);(Green y col. 1997).

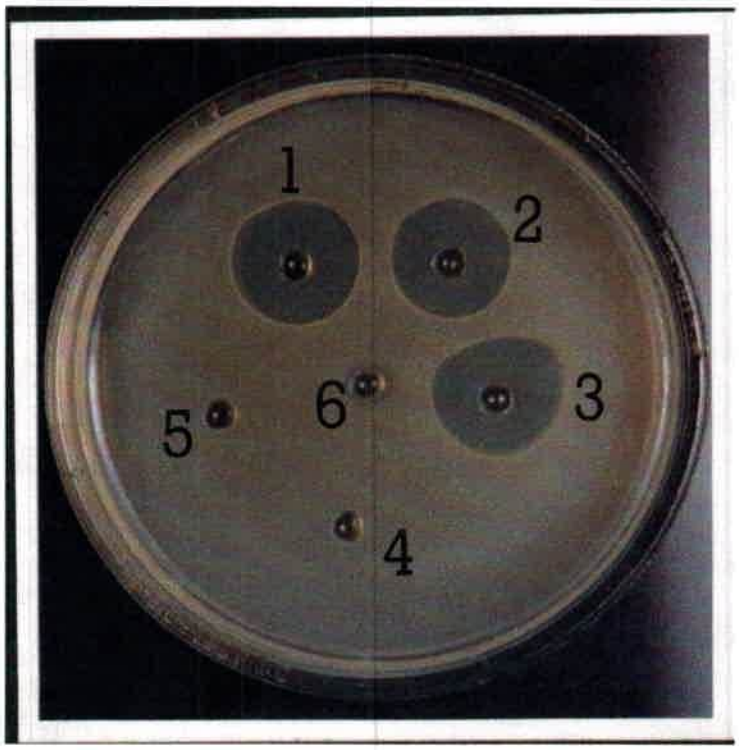
Tabla N° 4: SENSIBILIDAD A PROTEASAS DE LAS BACTERIOCINAS

ENZIMAS	RETENCIÓN DE LA ACTIVIDAD
	S2- S3**-S6**
Control sin tratar	+
Proteinasa K	-
Tripsina	-
Papaína	-
Proteasa tipo IV	-
Proteasa tipo XXV	-
Pepsina	-

* *E. durans* ** *E. hirae*

La elevada sensibilidad de las enterocinas a las enzimas proteolíticas es muy interesante con respecto a su potencial aplicación como aditivo, en cuanto a la seguridad del alimento, ya que la ingestión de bacteriocinas no altera la ecología del tracto intestinal.(Piard y Desmazeaud 1992).

Foto N°3. Repuesta de Enterocina S6 a diferentes tratamientos



Referencias: Sobrenadantes: 1) sin tratar, 2) neutralizado y con catalasa 3)autoclavado, 4) con Proteasa tipo IV, 5) con pepsina, 6) con papaina

D.7b) ESTABILIDAD FRENTE AL CALOR

Se observó que éstas enterocinas resisten 65, 100 y 121 °C durante 15 y 30 minutos e incluso el autoclavado.

Elevada termorresistencia ha sido informada por otras bacteriocinas como es el caso de Pediocin PD (Green y col. 1997), Bifidocin B (Yildirim y Johnson 1998), bacteriocina S50 producida por *Lactococcus lactis subsp diacetilactis* (Kojic y col 1991) y la bacteriocina producida por *Lactobacillus acidophilus*, la que también es resistente al autoclavado (Dave y Shah 1997).

En algunos casos se detecta una disminución en la actividad, después del proceso de esterilización como lo afirma Reenen y col. (1998) y Yildirim y Johnson (1998).

No ocurre lo mismo con la Enterocina S6 que no disminuye su actividad como se observa en la Foto 3. Lo mismo ocurrió con S2 y S3 (Datos no mostrados).

La evaluación de diversos factores físico-químicos sobre la actividad de una bacteriocina no sólo permite la caracterización sino también evaluar su posible aplicación industrial.

Las elevadas temperaturas y las amplias variaciones de pH durante los procesos tecnológicos son, entre otras, algunas de las condiciones que debe resistir una sustancia para ser usada como agente biológico inhibidor de microorganismos no deseados en la industria de alimentos (fermentaciones de leche, maduración de quesos, curado de encurtidos, etc).

D. 7c) ESTABILIDAD DE ENTEROCINAS S2, S3 Y S6 A CAMBIOS DE pH

Se confirmó que estas sustancias continúan siendo estables después de ser expuestas a pH 2,0; 4,0; 7,0; 9,0 y 11,0 durante 5 h. (Tabla N° 6), aunque la mayor actividad de la Enterocina S6 y S3 se detectó a pH2 y 7 y a partir del pH 9 se observó más disminución del halo de inhibición, mostrando ligera inhibición inclusive a pH 11. Para S2 la mayor actividad está comprendida entre los valores de pH 2,0 y 4,0.

Es de destacar que la termoestabilidad se mantiene luego de ser expuesta la bacteriocina a cambios de pH (dato no mostrado).

En la bibliografía abundan ejemplos de mayor actividad de bacteriocinas a pH ácido. Ejemplos: plantaricin F, activa hasta pH 4,5 (Fricourt y col. 1994); bacteriocina producida por *L. curvatus,* mayor actividad entre pH 4 y 6 (Casla y col.1996) y también la producida por *L. delbrueckii subsp bulgaricus,* activa hasta pH 6.(Balasubramanyam y Varadaraj 1998).

Termophilin T es estable a niveles de pH entre 1 y 9 e inactivada parcialmente a pH 10 y 12. (Aktypis y col. 1998).

Tabla N° 5. EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENTEROCINAS PRODUCIDAS POR LAS CEPAS S2, S3, Y S6.

pH	Actividad relativa[a]		
	S2	S3	S6
2	+++	+++	+++
4	+++	+++	+++
7	++	+++	+++
9	++	++	++
11	+	+	+

[a]: Método de difusión en agar , bacteria indicadora: *L. plantarum*

(+++) Inhibición Fuerte :13 a 15 mm de diámetro total

(++) " Moderada: 11 a 13 mm.

(+) " Ligera : 9 a 11 mm.

La mayor estabilidad a pH ácido y neutro indica que estas sustancias están bien adaptadas al ambiente de la bacteria productora.

Además la hace útil, como aditivo en una gran variedad de alimentos.

D.8-COMPARACIÓN CON OTRAS ENTEROCINAS

Como resultado de comparar las propiedades de la Enterocina S2, S3 y S6, con otras 5 Enterocinas conocidas: Enterocina I (Floriano y col. 1998), Enterocina EL 1 (Lyon y col. 1995), Hiraecin S (Siragusa 1992),Enterocina 35 (Farias y col. M.1994) y Enterocina 81 (Ennahar, S.1998) .En la Tabla N° 6 se comprueba que:

- -La mayoría resiste 100°C entre 5 y 30 min. La S2, S3 y S6 toleran temperaturas de autoclavado.
- -Estabilidad frente a un amplio rango de pH.

Por lo expuesto, se puede afirmar que las enterocinas seleccionadas en este trabajo son semejantes en cuanto a sus propiedades físico-químicas a las ya conocidas.

En cuanto al espectro de acción, se enfrentaron a un mayor número de especies patógenas, en comparación con los demás autores.

Aunque todas las sustancias comparadas actúan inhibiendo a *L. monocytogenes,* estas además ejercen su acción antimicrobiana contra *S. aureus*, *B. cereus, Cl. perfringens* en forma simultánea . Actividad no presentada para una única sustancia por los otros autores.

Por lo tanto el espectro de acción de Enterocinas S2, S3 y S6 difiere notablemente de las restantes, ya que inhiben a un mayor número de especies patógenas.

La acción antagónica frente a *L. monocytogenes* , es una característica frecuente entre las enterocinas, debido a que *Listeria* y *Enterococcus* están filogenéticamente muy relacionadas y se encuentran presentes en el mismo nicho ecológico (Giraffa 1995).

Enterocina	ACTIVIDAD POST -TRATAMIENTO						ESPECTRO DE ACCIÓN				
	Temperatura			Ph			BACTERIAS PATÓGENAS SENSIBLES				
	100°C 5 min.	100°C 30 min	121°C 15min	2-7	2-10	2-11	*S. aureus*	*B. cereus*	*L. monocytogenes*	*Cl. perfringens*	Referencias
Enterocinas S2-S6(*E. durans*) S3 (*E. hirae*)	+	+	+	+	+	+	S	S	S	S	Este estudio
Enterocina I (*E. faecium*)	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	S	S	ND	*Floriano y col. (1998)*
Enterocina EL1 (*E. faecium*)	+	+	+	+	+	+	R	ND	S	ND	*Lyon y col. (1995)*
Iraecin S (*E. hirae*)	+	+	ND	+	ND	ND	R	ND	S	ND	*Siragusa. (1992)*
Enterocina 35 (*E. faecium*)	+	+	ND		+	+	S	ND	S	ND	*Farias y col. (1994)*
Enterocina 81 (*E. faecium*)	ND	ND	ND	+	–	–	R	R	S	ND	*Ennahar y col. (1998)*

Referencias +: actividad; -: No actividad; ND: No Determinado; S: sensible; R :resistente

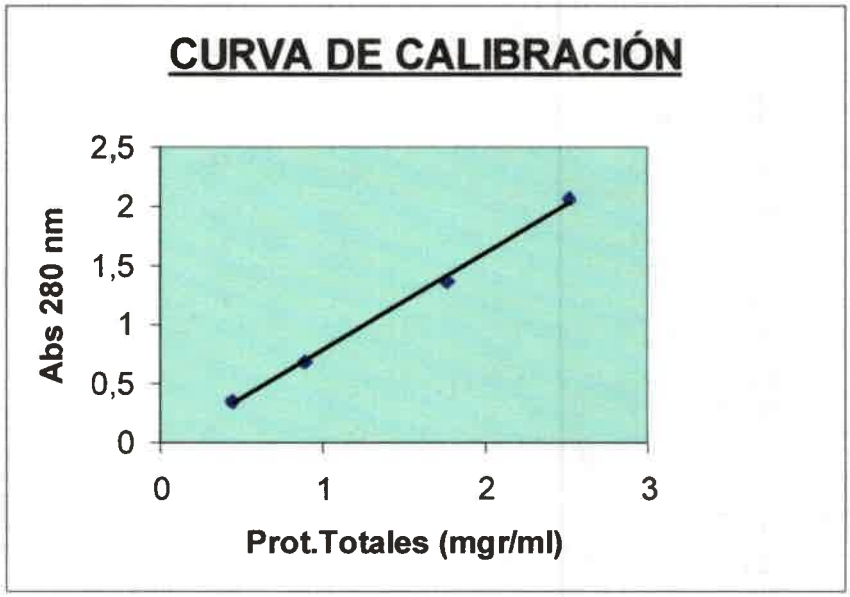
Tabla N° 6. **COMPARACION DE S2, S3 y S6 CON 5 ENTEROCINAS**

D.9- PROTEINAS TOTALES

A partir de un suero patron Proti-2 (Wiener lab.) con un valor de proteinas totales de 5,5 g/ dl., se realizaron diluciones, leyéndose la absorvancia a 280 ηm en un espectrofotómetro. Se graficó una curva de calibración (Figura N° 1). Esto permitió conocer la concentración de proteinas totales de las muestras.

X	Y
0,447	0,343
0,89	0,687
1,76	1,375
2,52	2,062

Figura N° 1



Referencias:Abs (Absorvancia) a 280 nm,
Prot. Totales: Diluiciones de Suero Patron Proti-2

D.10-PURIFICACION PARCIAL DE LA BACTERIOCINA

D.10 a-)PRECIPITACIÓN SALINA FRACCIONADA.

D.10 a 1) Precipitación fraccionada con $SO_4(NH_4)_2$ y Determinación de la actividad biológica.

Los ensayos de purificación se realizaron para la cepa que presentó mayor CIM, de las tres seleccionadas: Enterocina S6

Para conocer como precipita la proteina de interés a diferentes porcentajes de saturación con $SO_4(NH_4)_2$, se evaluó la actividad biológica del precipitado celular y sobrenadante.[(+) Inhibición de *L. plantarum* (-) No inhibición]

1°Paso: Al sobrenadante de cultivo, se le agregó sal hasta un 35 % de saturación. Precipitado 35% :++++ y Sobrenadante:++.

2° Paso: Al sobrenadante obtenido luego de separar el precipitado con un 35 % de sal,se lo llevó a un 50 % de saturación obteniéndose estos resultados Precipitado 50%: +++ y Sobrenadante(-).

3 Paso: A continuación se logró un 60 % de saturación . Precipitado 60%: (-) y Sobrenadante : (-).

4° Etapa : Finalmente se lo saturó al sobrenadante hasta un 75 % . Precipitado 75%: (-) y Sobrenadante : (-).

De lo expuesto se deduce que toda la proteina biológicamente activa precipita con un 35 y 50 % de saturación (Lasagno y col. 1999) .

D.10 a 2)Precipitacion de la proteina con 35 y 50 % de $SO_4(NH_4)_2$ y determinaciones de actividad biológica y medidas espectrofotométricas

Se repitió la experiencia evaluándose la actividad biológica y dosando proteinas totales por espectrofotometría a 280 ηm.

En Tabla N° 7 se observan los valores de Actividad Biológica, Prot. Totales y Actividad específica. del sobrenadante del cultivo (antes de la saturación con sal), del "precipitado 35 %" y "precipitado 50%".

Se comenzó el estudio con 320 UA/ml de Enterocina S6 dado por 12,83 mg/ml de PT (Proteinas Totales), con una Actividad específica de 24,94 UA/mg.

Una simple precipitación con $SO_4(NH_4)_2$ hasta 35% de saturación, permitió duplicar la actividad biológica, con sólo ¼ parte de las PT presentes en el sobrenadante de cultivo de partida. Se incrementó 8,5 veces (213,33/ 24,94) la actividad específica inicial. .

Con una precipitación hasta 50 % de saturación, se logró una proteína 16 veces más activa (400/24,94) en relación al sobrenadante de cultivo.

Se puede afirmar que el sistema de precipitación con $SO_4(NH_4)_2$ hasta 35% y 50% de saturación es promisorio como posible método simple y económico de procesamiento industrial, para una purificación parcial de la enterocina S6. Así lo demuestran los incrementos de actividad específica logrados.

D.10 b- DIÁLISIS

Los resultados de la diálisis se observan en la Tabla N° 7.

La proteina precipitada con 35 % de saturación de $SO_4(NH_4)_2$ (en D.10 a-2, antes de dializar) presentó una actividad biológica de 640 UA/ml. Con una concentración de PT igual a 3 mg/ml, dió una actividad específica de 213,33 UA/mg.

Con una diálisis contra agua, se logró incrementar a 2560 UA/ml la act. biológica, con casi 2/3 de las PT. Se elevó la act. específica a 1347,37 UA/mg. Se obtuvo una proteina 6,3 veces más activa (1347 /213) con respecto a la precipitada con 35% sin dializar; y 54 veces(1347/24,94) más purificada si se compara con el sobrenadante del cultivo de partida.

Al analizar los resultados de las proteinas precipitadas con 50% (antes de la diálisis), se comprobó que: 0,8 mg/ml de PT , arrojó valores de actividad específica igual a 400 UA/mg. Después de ser dializadas, se encontró que la proteina retenida, que se recuperó es altamente activa, 133 veces más purificada que el sobrenadante de cultivo.

La mayor parte de los péptidos bioactivos quedaron retenidos dentro del saco de diálisis.

Dentro de la bolsa de diálisis se detectó una Act. Específica de 1347,37 UA/ml para el precipitado obtenido con 35 % de saturación y de 3333,33 UA/ml para el precipitado con 50% de sulfato de amonio. La proteina dializada presentó 279,23 UA/mg (35 %) y 334,73 UA/mg (50%) respectivamente. Por lo que se puede afirmar que la proteína se libera al medio mayoritariamente con un Peso Molecular mayor a 12000 Da según lo evidencian los valores de actividad específica .

Los resultados de la diálisis muestran que para una misma actividad biológica se presentan por lo menos dos tamaños moleculares. Una fracción menor y otra mayor a 12000 Da. Estos resultados son coherentes con la tendencia de las bacteriocinas en su forma nativa a formar agregados moleculares, los que por tratamientos físicos o químicos pueden ser disgregados (Piard y Desmazeaud 1992) .

Tabla N° 7: Purificación de Enterocina S6

Muestra	Actividad Biológica (UA/ml)(*)	Proteína Totales (mg/ml)	Act. Específica (#) (UA/mg)	Factor de Purificación (∫)
		ANTES DE DIÁLISIS		
Sobrenad. Cultivo	320	12,83	24,94	1
Precipitado 35 %sal	640	3	213,33	8,5
Precipitado 50 %sal	320	0,8	400	16
		DESPUÉS DE DIÁLISIS		
		PESO MAYOR A 12000		
Precipitado 35 %sal	2560	1,9	1347,37	54
Precipitado 50% sal	80	0,024	3333,33	133,6
		PESO MENOR A 12000		
Precipitado 35% sal	320	1,146	279,23	11,2
Precipitado 50% sal	80	0,239	334,73	13,4

REFERENCIAS:

(*) UA / ml: Unidades Arbitrarias/ ml

(#) Actividad Específica: Actividad Biológica dividido por Proteínas Totales.

(∫) Factor de Purificación: Es el incremento en la Actividad Específica inicial.

CONCLUSIONES

E.1 - CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se desprenden de los resultados presentados son:

- Por primera vez en el Sur de la Pcia. de Córdoba se llevó a cabo una selección de cepas ácido lácticas, autóctonas con propiedades bacteriocinogénicas.
- Se emplearon dos protocolos para poner en evidencia la actividad antagónica mediante la técnica de difusión en agar, siendo más conveniente el Protocolo 2, que emplea *L. plantarum* como cepa indicadora. De 70 aislamientos ensayados, se detectaron tres cepas productoras de bacteriocinas.
- De un total de 136 aislamientos de bacterias ácido lácticas estudiadas por el Protocolo 1, 68 ejercen acción de antibiosis frente a especies Gram positivas patógenas por medio de ácidos y/o peróxido de hidrógeno.
- Se seleccionaron tres cepas autóctonas productoras de bacteriocinas de muestra de suero de queso artesanal; dos corresponden a *Enterococcus durans* y una a *Enterococcus hirae.*
- Las 3 enterocinas, designadas como Enterocina S2, S3 y S6, presentaron un amplio espectro de actividad, quedando demostrado su acción contra *Staphylococcus aureus* productor de Enterotoxina "A" y *S. aureus* productor de Ent. "B", *Listeria monocytogenes, Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens.*

- Las pruebas para caracterizar dichas sustancias pusieron en evidencia grandes semejanzas entre ellas: son termorresitentes, su actividad no es afectada por el autoclavado y son efectivas en un amplio rango de pH: 2 a 11.
- Los procesos de precipitación con $SO_4(NH_4)_2$, permitieron una purificación parcial.
- El péptido bioactivo producido por *Enterococcus durans* S6, se liberó al medio de cultivo mayoritariamente con un peso molecular superior a 12.000 Da, ya que la mayor actividad específica quedó retenida en el saco de diálisis.

E.2 - PESPECTIVAS

Los resultados presentados a lo largo de este estudio constituyen un aporte a la industria local con posibilidad de aplicación de las cepas bacteriocinogénicas o las enterocinas en la preservación biológica de los alimentos. Para ello es necesario continuar estos estudios, para optimizar la producción de las bacteriocinas y su aplicación industrial, principalmente en la elaboración de quesos.

Para lograr este objetivo mediato, sería necesario producir la bacteriocina en gran escala, purificarla y adicionarla al alimento como preservador, o bién agregar la cepa productora al alimento para que produzca " in situ" la bacteriocina, inhibiendo así a los patógenos presentes. En este caso será necesario desarrollar estudios dirigidos a optimizar la producción de bacteriocinas en las condiciones propias del alimento, enfocados a un mayor conocimiento de los factores ambientales que condicionan su producción.

También debería estudiarse las propiedades tecnológicas, tales como actividad acidificante, proteolítica y producción de aroma, de las cepas productoras para determinar su inclusión en el cultivo iniciador.

BIBLIOGRAFÍA

F. BIBLIOGRAFÍA

Aktypis, A.; Kalantzopoulos, J.; Veld, J. and Brink, B.. 1998. Purification and charaterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. J. Appl. Microbiol. 84: 568-576.

Ali,D.; Lacroix, C.; Thuault, D.; Bourgeois, C. and Simard, R.. 1995. Characterization of diacetin B, a bacteriocin from *Lactococcus lactis subsp. lactis bv. diacetilactis* UL 720. Can. J. Microbiol. 41: 832-841.

Aymerich, M.; Hugas, M. and Monfor,J.. 1998. Review: Bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. Food Sci. and Technol. Int. .4: 141-158.

Balasubramanyam, B. and Varadaraj, M..1998. Cultural conditions for the production of bacteriocin by a native isolate of *Lactobacillus delbruecki ssp. bulgaricus* CFR 2028 in milk medium . J. Appl. Microbiol. 84, 97-102.

Casla, D.; Requena, T. and Gómez, R..1996. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat´s milk and artesanal cheeses: characteristcs of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL 105. J. Appl. Bacteriol. 81: 35-41.

Coventry, M.; Gordon, J.; Wilcock, A.; Harmark, K.; Davidson, B.; Hickey, M.; Hiller, A. and Wan, J..1997. Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. J. Appl. Microbiol. 83 , 248-258.

Cowan and Steel´s. 1995. Cap. 6. Characters of gram-positive bacteria. Pag: 50-93. In Manual for the identification of Medical Bacteria.Eds. Barroww, G. and Felthman, R. 3° Ed. Cambrigde University Press. Great Britain.

Daba, H.; Pandian, S.; Gosselin, J.; Simard, R.; Huang, J. and Lacroix, C..1991. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. Appl. Env. Microbiol. Vol 57, N° 12: 3450-3455.

Dave, R. and Shah, N..1997. Characteristcs of bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LA-1. Int. Dairy J. 7 :707-715.

De Man, J.; Rogosa, M. and Sharpe, M..1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. J App. Bacteriol. 23: 130-155.

Dykes, G..1995. Review. Bacteriocins: ecological and evolutionary significance. Tree Vol 10 N°5 :186-189.

Elliker, P.; Anderson A. and Hannesson G..1956. An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. J. Dairy Sci. 39: 1611-1612.

Ennahar, S.; Aoude-Werner, D.; Assobhei, O. and Hasselmann. 1998 Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by Enterococcus faecium WHE 81 isolated from cheese. J. Appl. Microbiol. 85, 521-526.

Farias, M,;Ruiz Holgado, A. and Sesma, F..1994. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheeses: inhibition of foodborne pathogens. J. Food Protect., Vol 57 N° 11: 1013-1015.

Floriano, B.; Ruiz-Barba, J. and Jiménez-Díaz, R.. 1998. Purification and genetic

characterization of Enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. Appl. Env. Microbiol. Vol 64, N° 12: 4883-3890.

Franz, C.; Holzapfel, W. and Stiles, M.. 1999 .Enterococci at the croossroads of food safety?. Int. J. Food Microbiol. 47:1-24

Fricourt, B.;Barefoot, S.; Testin, R.. and Hayasaka ,S.. 1994. Detection and activity of Plantaricin F, an antibacterial substance from *Lactobacillus plantarum* BF001 isolated from processed channel catfish. J. Food Protect., Vol 57 N° 8 : 698-702.

Giraffa, G. 1995. Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-*listeria* factors in dairy technology. Food Microbiol.12,:291-299.

Giraffa, G.; Carminati, D. and Neviani, E. 1997. Enterococci isolated from dairy products: a review of risk and potential technology use. J. Food Protect., Vol 60, N° 6 : 732-738.

Green, G.; Dicks, L.; Bruggman, G.; Vandamme, E. and Chikindas, M.. 1997. Pediocin PD-1, a bactericidal antimicrobial peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. J. Appl. Microbiol. 83, 127-132.

Haba, H. and Pérez, D..1992. Sección 12. Cocos Gram positivos. En Sistemática Bacteriana. 3° Ed. Copión. Valencia. España.

Harding, C. and Shaw, B.. 1990. Antimicrobial activity of *Leuconostoc gelidum* against closely related species and *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Bacteriol. 69: 648-654.

Holt, J.; Krieg, N.; Sneath, J. and Stanley, W.. 1994. Group 17. Gram-positive cocci. Pag: 527-559. In Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology. 9° Ed.

Klaenhammer, T.1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev.12 :39-86.

Klaenhammer T..1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie 70:337-349.

Kojic, M.; Svircevic, J.; Banina, A. and Topisirovic, L.. 1991. Bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus lactis subsp. diacetilactis* S50. Appl. Env. Microbiol. Vol 57, N° 6 : 1835- 1837.

Lasagno, M; Eraso, A.;Font de Valdez, G.; Sesma, F. .Octubre 1999. Bacterias lácticas y /ó sus metabolitos potencialmente útiles en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia. VIII Congreso Argentino de Farmacia y Bioquímica Industrial. Buenos Aires.

Lauková, A.; Czikková, S.; Vasilková, Z.; Juriš, P. and Mareková, M.. 1998. Occurrence of bacteriocin production among environmental enterococci. Lett. Appl. Microbiol. 27: 178-182.

Lejeune, R.; Callewaert, K.; Crabbé, K. and De Vuyst, L.. 1998. Modelling the growth and bacteriocin produced by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation. J. Appl. Microbiol. 84: 159-168.

Lewus, C. and Montville, T.. 1991. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria . J. Microbiol. Meth. 13 : 145-150.

Lyon, W.; Olson, D. and Murano, E.. 1995. Isolation and purification of Enterocin EL 1 , a bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecium*. J. Food Protect. Vol 58 N° 8: 890-898.

Mart, E.. 1984. Standard Methods for the examination of dairy products. 15° Ed. American Public Health Association. Washington DC.USA.

Martinez, B.; Suárez, J. and Rodriguez, A.. 1995. Antimicrobials produced by wild Lactococcal strains isolated from homemade cheeses. J. Food Prot. Vol 58 N° 10 :1118-1123.

McMullen, L. and Stiles, M..1996. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. J. Food Prot. Supp.: 64-71.

Murinda, S.; Roberts, R. and Doores,S.. 1995. Evaluation of lactic acid-producing *Bacillus* and *Sporolactobacillus* for antilisterial activity. J. Food Protect. Vol 58, N° 5:570-572.

Nes, I.; Diep, D; Havarstein, L. and Brurberg, M.. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 70: 113-128.

Nielsen, J.; Dickson, J. and Crouse, J.. 1990. Use of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. Appl. Env. Microbiol, Vol 56, N° 7: 2142-2145.

Norris, J. and Ribbons, D. 1970. Cap.1: Classical and rapid identification methods for medically important bacteria.pag 2-67. In Methods in Microbiology. 2° Ed.

Piard, J. and Desmazeaud M.. 1992. Review: Inhibition factors produced by lactic acid bacteria. Bacteriocins and other antibacterial substances. Lait 72, 113-142.

Raccach, M.; Baker, R.; Regenstein, J. and Mulnix, E.. 1979. Potential application of microbial antagonism to extended storage stability of a flesh type food. J. Food Sci. Vol 44 N°1: 43-46

Raibaud, P.; Caulet, M.; Galpin, J. and Mocquot, G.. 1961. Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs II. Streptococci: selective enumeration and differentiation of the dominant group. App. Bacteriol. 24: 285- 291.

Rammelsberg, M.; Müller, E. and Radler, F..1990. Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei.* Arch Microbiol. 154:249-252.

Reenen, C.; Dicks, L. and Chikindas, M..1998. Isolation , purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum.* J. Appl. Microbiol. 84,: 1131-1137.

Reuter, G.. 1970. Lactobazillen und eng verwandte mikroorganismen in fleisch und fleischerzeugnissen, 2. Mitteilung: Die charakterisierung der isolierten lactobazillenstamme . Fleischwitsch. 954-962.

Savoy de Giori, G. 1983. Comportamiento de fermentos regionales aplicados a la industria lechera. Tesis Doctoral.

Schillinger, U. and Lücke, F.. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat .Appl. Env. Microbiol. Vol 55, N° 8:1901-1906.

Scott, V. and Taylor, S..1981. Effect of nisin on the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. J. Food Sci., Vol 46:117-126.

Simonetta, A.; Velasco, L. and Frisón, L.. 1997. Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*. Lett. Appl. Microbiol. 24: 139-143.

Siragusa, G..1992. Production of bacteriocin inhibitory to *Listeria* species by *Enterococcus hirae*. Appl. Env. Microbiol. Vol 58 , N° 11,: 3508-3513.

Stiles, M. and Holzapfel, W..1997. Review article. Lactic acid bacteria of foos and their current taxonomy . Int. J. Food Microbiol. 36: 1- 29.

Terzaghi, B. and Sandine, W.. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. App. Microbiol. 29: 807-814.

Valdéz-Stauber, N. and Scherer, S..1994. Isolation and characterization of Linolin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. Appl. Env. Microbiol. Vol 60, N° 10 : 3809-3814.

Yildirim, Z. and Johnson, M. 1998. Characterization and antimicrobial spectrum of Bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. J. Food Protect, Vol 61.N°1.: 47-51.