

Aislamiento, Caracterización y Evaluación Antimicrobiana de Bacterias a partir de Leche de Cabra

Cuvas-Limón Ruth B^a, Cruz Hernández Mario^b, Belmares-Cerda Ruth E^a.

^a Departamento de Investigación en Alimentos, Universidad Autónoma de Coahuila, Blvd. Venustiano Carranza e Ing. José Cárdenas A.P. 935, C.P. 25280, Saltillo, Coahuila,

^b Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro, C.P. 25315, Buenavista Saltillo, Coahuila.

E- mail: rcuvas@uadec.edu.mx

RESUMEN:

Las bacterias ácido lácticas poseen características con potencial funcional debido a la actividad antimicrobiana, ya que producen bacteriocinas las cuales tienen la capacidad de inhibir contra bacterias patógenas, se aisló, caracterizó y se evaluó la actividad antimicrobiana a partir de leche de Cabra, se hizo la identificación morfológica y la evaluación antimicrobiana por el método de difusión en disco y evaluando contra tres bacterias patógenas. *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella*. Los resultados obtenidos fueron dos bacterias ácido lácticas, la evaluación antimicrobiana revela que hay inhibición contra las tres bacterias sin embargo se observa que la inhibición es mayor con *E.coli*. Las bacterias aisladas producen bacteriocinas las cuales pueden usarse como ingrediente en los alimentos además de su uso como conservadores..

ABSTRACT:

Lactic acid bacteria have characteristics with functional potential due to antimicrobial activity, since they produce bacteriocins which have the capacity to inhibit against pathogenic bacteria. The antimicrobial activity was isolated, characterized and evaluated from goat milk, morphological identification and antimicrobial evaluation was made by the method of disk diffusion and evaluation against three pathogenic bacteria. *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella*. The results obtained were two lactic acid bacteria, the antimicrobial evaluation reveals that there is inhibition against the three bacteria but it is observed that the inhibition is greater with *E.coli*. Isolated bacteria produce bacteriocins which can be used as an ingredient in foods in addition to their use as preservatives..

Palabras Clave:

Bacterias ácido lácticas, inhibición, actividad antimicrobiana.

Key words:

Lactic acid bacteria, inhibition, antimicrobial activity.

Área: Microbiología

INTRODUCCIÓN

En las dos últimas décadas, las BAL han recibido mucha atención, particularmente los géneros utilizados como cultivos iniciadores, debido a su gran importancia comercial. La Ciencia y la Tecnología se enfocan en aislar nuevas cepas con el fin de estudiar sus potencialidades como cultivos iniciadores o como ingredientes para alimentos con potencial funcional. Se ha reportado que las BAL usadas en bebidas fermentadas influyen notablemente en los cambios químicos, bioquímicos y sensoriales (Hayaloglu *et al.*, 2005)

Las bacterias del ácido láctico tienen diferentes beneficios como actividad conservadora, antimicrobiana que se considera probiótica por los efectos beneficiosos que le dan al huésped. Los péptidos de LAB han sido aislados con potencial biológico debido a sus propiedades, como propiedades metabólicas, juegan un papel importante en la

industria alimentaria. Las bacterias del ácido láctico (BAL) son un grupo de organismos representados por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. Los BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerófilos o aerotolerantes; oxidasas, catalasas y benzidinas negativas, falta de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito, y producen ácido láctico como único o principal producto de la fermentación de los hidratos de carbono (Carr et al, 2002; Vázquez et al., 2009).

Además, las BAL son ácido tolerantes pudiendo crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3.2, otras a valores tan altos como 9.6, y la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no aguantarían la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos (Carr et al., 2002). La clasificación de las BAL es basada en la morfología, modo fermentación de la glucosa (homofermentativas y heterofermentativas), el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia ácida o alcalina. En la naturaleza existen los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloinococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (Axelsson, 1998; Carr et al., 2002).

Las bacterias aisladas de las fuentes de leche que son bacterias pertenecientes al género bacteriano del ácido láctico se consideran a su vez como probióticos, ya que producen ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacterias y compuestos antimicrobianos que pueden tener propiedades bactericidas y bacteriostáticas (Pringsulaka et al., 2015)

Las bacterias lácticas, además de su función tecnológica, poseen la capacidad de inhibir el desarrollo de un gran número de microorganismos alterantes y/o patógenos presentes potencialmente en los alimentos. El efecto antimicrobiano primario de las bacterias lácticas se debe a la competencia por los nutrientes del sustrato y a la formación de ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético, principalmente), con el siguiente descenso del pH. No obstante, las bacterias lácticas también producen otras sustancias antimicrobianas como el etanol, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrógenos y otros metabolitos del oxígeno, isómeros D. de los aminoácidos, reuterina y otros compuestos no proteicos de pequeño tamaño molecular y, por último, sustancias proteicas de síntesis ribosomal denominadas bacteriocinas (Cintas et al., 2000)

Las bacteriocinas Gram-positivas representan un grupo heterogéneo de péptidos antimicrobianos, los péptidos tienen actividad antimicrobiana directa con microorganismos patógenos. La actividad conservadora del BAL se debe a la acción inhibitoria de un gran número de patógenos y microorganismos nocivos por diversos productos finales de la fermentación. Estas sustancias son principalmente lácticas y acéticas, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetil, etanol de bacteriocinas, aromáticos, compuestos antibacterianos, ácidos grasos y productos secundarios generados por la acción de la lactoperoxidasa sobre el peróxido de hidrógeno y el tiocianato, péptidos antifúngicos (Servin, A. L., 2004).

Las bacteriocinas que producen las BAL han sido intensamente estudiadas por su actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Salmonella*, entre otras (Holo et al., 2001; Vázquez et al., 2009). Por ello el objetivo de este trabajo fue aislar e identificar bacterias ácido lácticas de la leche de cabra y evaluar su actividad antimicrobiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y caracterización

Se llevó a cabo el aislamiento con un asa bacteriológica, se tomó una cantidad de muestra la cual fue sembrada en placas con 15 mL de Agar MRS con un pH de 6.5, por el método de estría abierta cruzada, para la obtención de colonias aisladas. Las placas inoculadas se incubaron en condiciones de anaerobiosis con aplicación de Nitrógeno para el desplazamiento del oxígeno. La incubación se realizó a una temperatura de 37°C, por un tiempo de 24 horas. Posteriormente se procedió a la purificación donde de cada cepa aislada se tomaron tres colonias aisladas, cada colonia se inoculó por estría abierta cruzada en una caja Petri conteniendo Agar MRS con un pH de 4.5, de tal manera que se obtuvieron cepas puras. Seguido de su incubación en anaerobiosis, se realizó la identificación microscópica (por triplicado) por el método de Tinción Gram.

También se realizó una identificación de su morfología macroscópica evaluando forma, bordes, elevación, superficie, consistencia y características ópticas de las colonias y la prueba de catalasa. Se llevó a cabo la conservación por congelación a una temperatura de -22°C en tubos eppendorf conteniendo 500µL de conservador (composición: leche descremada 10% y Glicerol 10%) y 500µL de cultivo.

Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se evaluó contra tres bacterias patógenas; *Salmonella Tiphy*, *E. coli* y *Staphylococcus aerus* que fueron reactivadas.

Posteriormente las bacterias ácido lácticas se sembraron en Caldo MRS con la finalidad de obtener biomasa para la extracción de las bacteriocinas. Se tomó una colonia aislada de cada una de las cepas de bacterias lácticas, luego se inoculó en caldo de MRS contenido en un reactor estéril y se inyectó nitrógeno para proporcionarles condiciones anaeróbicas, incubando a 37°C durante 48 horas.

Evaluación de inhibición de las bacteriocinas

La separación de las bacteriocinas de las células bacterianas lácticas se llevó a cabo por centrifugación y filtración. De cada uno de los reactores que contenían el cultivo láctico y en condiciones estériles, se tomó un volumen de 10 ml de caldo de cultivo de MRS utilizando una jeringa estéril, posteriormente se centrifugó a 3400 rpm durante 15 min. El sobrenadante se decantó en tubos nuevos y se calentó a baño maría a 80°C durante 30 minutos. Finalmente, el líquido fue filtrado con membranas con un poro de 0.45 µm, acoplado a jeringas y el sobrenadante fue recogido en nuevos tubos.

Los antibiogramas se prepararon por el método de difusión en disco. Por medio de discos de papel filtro de poro cerrado de 0,4 mm de diámetro y 3 mm de espesor, fueron esterilizados a 15 Lb de presión a 121°C durante 15 minutos. Luego se sumergieron durante 15 minutos en 10 ml del extracto de bacteriocina. Después del tiempo reservado, una colonia de una cepa de bacterias patógenas fue inoculada por estría homogénea en una caja entera de agar nutritivo, luego 3 discos ya impregnados con el extracto fueron colocados en la placa de manera equidistante e incubados a 37°C durante 48 horas.


Posterior a este tiempo se midieron los halos de inhibición contra las tres bacterias patógenas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se purificaron dos bacterias codificadas como LC1 y LC2. Los resultados de la caracterización microscópica y morfológica de las bacterias aisladas de leche de cabra es característica de las bacterias lácticas, la prueba de catalasa resulta negativa, ya que son bacterias anaeróbicas no descomponen el peróxido de hidrógeno (Iñiguez-Palomares, C., R. Pérez-Morales, et al. 2007).

Las BAL tienen la característica de reaccionar negativamente a esta prueba ya que estos microorganismos carecen de sistemas de citocromo para realizar la fosforilación oxidativa y no poseen enzimas superóxido dismutasa o catalasa. Los resultados se muestran en la Tabla I Caracterización microscópica de bacterias aisladas de leche de cabra. y Tabla II Identificación morfológica.

Tabla I. Caracterización microscópica de bacterias aisladas de leche de cabra.

Código de BAL	Fuente de aislamiento	de	Gram +/-	Forma	Catalasa	Imagen
LC1	Leche de Cabra	de	+	Coco	-	

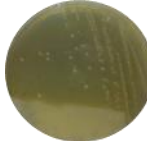
BD1	Leche Materna	+	Coco	-	
------------	----------------------	---	-------------	---	---

Tabla II Identificación morfológica

BAL	Forma de la colonia	Bordes de la colonia	Elevación	Superficie de la colonia	Consistencia	Características ópticas	
						Luz transmitida	Luz reflejada
LC1	Puntiforme	Entero	Convexa	Lisa	Cremosa	Translúcida	Opaca
LC2	Puntiforme	Entero	Plana	Lisa	Cremosa	Translúcida	Opaca

Diversas investigaciones han demostrado que varias especies de bacterias ácido lácticas presentan una acción antagonica en contra de patógenos intestinales y el deterioro de alimentos.

En la figura 1 Producción de biomasa para extracción de bacteriocinas. Se observa la producción de biomasa en caldo MRS, del cual se extraen las bacteriocinas para posteriormente evaluar la actividad antimicrobiana

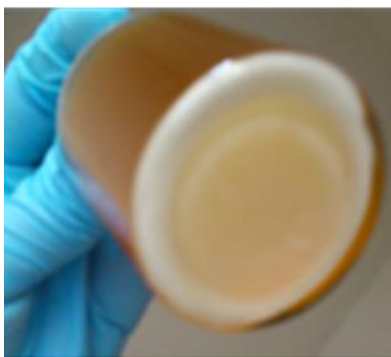


Figura 1. Producción de biomasa para extracción de bacteriocinas.

En la evaluación de la actividad antimicrobiana, se encontró que las dos bacterias aisladas de leche de cabra inhiben contra bacterias patógenas evaluadas en comparación con el control, En la Tabla III Halos de inhiacion (cm), se muestran los halos de inhibición que fueron evaluados.

Tabla III Halos de inhiacion (cm)

	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Control	0.0	0.0	0.0
LC1	1.02±0.10	1.32±0.03	1.17±0.06
BD	1.12 ±0.29	1.17±0.17	1.14±0.15

Se observa que las bacterias ácido lácticas usadas para la evaluación de la actividad antimicrobiana actúan mejor inhibiendo contra *E. coli* esto probablemente se deba a la producción de ácido orgánicos como el ácido láctico o

acético y de esta manera bajando el pH del medio limitando de esta manera el crecimiento de *E. coli*. La literatura reportada demuestra que las bacterias Gram negativas son poco sensibles a bacteriocinas, debido a su estructura de la membrana externa y a la constitución de la pared. (Calderón, O., C. Padilla, et al., 2007).

El efecto perjudicial de estas moléculas sobre los microorganismos sensibles se debe a la alteración de la permeabilidad celular, a la alteración del potencial de la membrana y a la subsiguiente alteración de la fuerza Motive Proton, así como a una disminución del pH intracelular que resulta en la alteración de importantes funciones celulares (Mejía JA et al., 2007).

La actividad antimicrobiana de las bacterias del ácido láctico se ha atribuido a la acumulación de productos finales de procesos de fermentación como el ácido láctico, el dióxido de carbono, el peróxido de hidrógeno, etc. O a la producción de bacteriocinas (Ouwehand AC. 2001).

CONCLUSION

Las bacterias aisladas de leche de cabra se caracterizan dentro del genero de las bacterias acido lacticas, hay inhibicion contra las bacterias sin embargo sobresaliendo *E. coli*. En la industria alimentaria las bacteriocinas han tenido un gran auge, debido a su actividad potencial, las bacterias acido lácticas puedes ser usadas como microorganismos iniciadores en alimentos fermentados para potenciar su actividad funcional.

BIBLIOGRAFÍA

- Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. En: Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects. (Salminen, S. y Wright, A. von, eds.), 2nd edition. Pp. 1-72. Marcel Dekker Inc. New York, USA.
- Carr, F. J., Chill, D. y Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28(4):281-370.
- Cintas, L. M.; Casaus, P. y Hernández, P. E. (2000). Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas (I y II). En: *Alimentación, Equipos y Tecnología*. Vol. 19, No.7 (Sep); p. 109- 119
- Hayaloglu, A.A.; Guven, M.; Fox, P.F.; McSweeney, P. L. H. Influence of starters on chemical, biochemical, and sensory changes in turkish White-Brined cheese during ripening. *J. Dairy Sci.* 88: 3460-3474 pp. 2005.
- Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S. y Nes, I. F. (2001). Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology*. 147: 643-651.
- Servin, A. L., (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.*, 28, 405–440
- Pringsulaka, O., Rueangyotchanthana, K., Suwannasai, N., Watanapokasin, R., Amnueysit, P., Sunthornthummas, S., ... Rangsiruji, A. (2015). In vitro screening of lactic acid bacteria for multi-strain probiotics. *Livestock Science*, 174, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.01.016>
- Vázquez, S.M., Suárez, H. y Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*. 36(1):64-71