

Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas

María del Carmen Monroy Dosta¹, Talía Castro Barrera¹,
Francisco José Fernández Perrino² y Lino Mayorga Reyes³

Recibido: 12 de marzo de 2009

Aceptado: 15 de abril de 2009

Resumen

Las bacteriocinas son sustancias peptídicas con actividad antimicrobiana, producidas por diferentes cepas bacterianas. Debido al creciente interés, sobre la obtención de microorganismos benéficos productores de sustancias antagonistas para su aplicación en la industria alimentaria, en la producción animal y recientemente en el campo acuícola, el objetivo de esta revisión es dar un panorama general del conocimiento que se tiene sobre las bacteriocinas, su modo de acción y aplicación.

Palabras clave: bacterias, bacteriocinas, probióticos.

Abstract

Bacteriocins are peptidic substances with antimicrobial activity, produced by different bacterial strains. Due to the growing interest on the obtaining of benefic microorganisms producers of this antagonistic substances for the application in the alimentary industry and in the animal production, the objective of this review is to give a general view of the current knowledge on the bacteriocins, way of action, and application.

Key words: bacteria, bacterocin, probiotics.

Introducción

Durante los últimos 20 años el uso de probióticos en diferentes campos productivos y de investigación se ha generalizado, esto debido al efecto que han demostrado tener en la prevención de enfermedades tanto en el ser humano como en muchas especies

de animales, así como su uso en la conservación de alimentos, siendo una alternativa para contrarrestar el uso de químicos y antibióticos en la alimentación (Galvin *et al.*, 1999; Turner *et al.*, 2001).

El uso de probióticos y el efecto de manipular la microflora intestinal fue inicialmente observado por Mechnikoff (1907), quién reportó los efectos benéficos de las bacterias productoras de ácido láctico en la prevención y tratamiento de enfermedades intestinales (Guarner y Malagelada 2002).

La interacción entre la cepa probiótica y la microflora intestinal puede basarse en la competición con bacterias patógenas por sitios de adhesión a los receptores epiteliales, por nutrientes y a la producción de sustancias específicas como son las bacteriocinas (Rodríguez y Le Moullac, 2000; Rengpipat *et al.*, 2000; Simon, 2005; Vázquez *et al.*, 2005).

Las bacteriocinas producidas por diferentes bacterias probióticas pueden servir como barreras antimicrobianas y ayudar a reducir los niveles de microorganismos patógenos (Fernández, 2005). Existen numerosas bacteriocinas y cada una tiene espectros de inhibición particulares, esta característica es aprovechada para la manipulación de poblaciones bacterianas a nivel de tracto digestivo con el fin de excluir patógenos, mejorar la digestibilidad e incrementar la actividad inmunológica de muchas especies animales y son ampliamente utilizadas en la cría de cerdos, aves y recientemente ha surgido un interés sobre su aprovechamiento en la producción de organismos acuáticos.

La intensificación de la actividad acuícola y la falta de control del comercio internacional de los organismos acuáticos vivos y de los productos derivados de éstos ha provocado la movilización de una gran cantidad de patógenos que en condiciones ambientales diferentes pueden ocasionar problemas infecciosos causando graves pérdidas económicas (Verschuere *et al.*, 2000; Quintana, 2001).

¹Laboratorio de Alimento Vivo, Depto. El Hombre y Su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, C. P. 04960, México, D. F. e-mail: monroydosta@hotmail.com.

²Depto. de Biotecnología, UAM-I. Av. San Rafael Atlixco 186 Colonia Vicentina. C. P. 09340 México D. F.

³Depto. de Sistemas Biológicos, UAM-X.

Para controlar las enfermedades en los cultivos se han usado compuestos químicos y antibióticos de manera indiscriminada. Esta práctica ha provocado el incremento en la presencia de plásmidos resistentes a dichos compuestos (Gómez-Gil *et al.*, 2000; Verschueren *et al.*, 2000; Gullian *et al.*, 2004; Venkant *et al.*, 2004).

Ante esta problemática, en la actualidad las investigaciones en el campo acuícola se han encaminado hacia el uso de probióticos, como una herramienta viable para reducir o eliminar la incidencia de microorganismos patógenos, mejorar el rendimiento en los cultivos de peces y crustáceos así como erradicar el uso de antibióticos. Sin embargo es escaso el conocimiento de los mecanismos de acción de los probióticos que se están utilizando y de las bacteriocinas que producen. El objetivo de este trabajo es hacer una revisión bibliográfica sobre las bacteriocinas producidas por bacterias probióticas, sus principales características y el efecto de éstas en la prevención de la enfermedad, lo que indudablemente permitirá una mejor aplicación y uso de estos microorganismos en la acuicultura.

Características de las Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana producidos por síntesis ribosomal y son segregadas por un gran número de bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores (Papagianni, 2003; Joerger, 2003; Katikou, 2005; Motta *et al.*, 2008). Estas sustancias con frecuencia actúan frente a las bacterias más estrechamente relacionadas. Sin embargo estudios recientes afirman que también pueden actuar frente a otras especies bacterianas, hongos y algunos parásitos (Eijsink *et al.*, 1998; Cotter *et al.*, 2005; Svetoch *et al.*, 2008).

En la naturaleza existe una enorme diversidad de bacteriocinas que han sido encontradas en casi todas las especies bacterianas examinadas hasta la fecha, y aún dentro de una especie podrían producirse diferentes tipos de bacteriocinas (Ennahar *et al.*, 2000; Cintas *et al.*, 2001; Joerger, 2003). Se piensa que el 99% de las bacterias pueden producir cuando menos una bacteriocina y la única razón de que no se hayan aislado es debido a que han sido muy poco estudiadas (Gordon y O'Brien, 2006). Las halobacterias por ejemplo, miembros del dominio Archaea, producen su propio tipo de bacteriocinas, las halocinas (Joerger, 2003). Los microorganismos invierten una gran proporción de energía para la produc-

ción y elaboración de mecanismos antimicrobianos, sin embargo aun, no se sabe mucho de cómo la diversidad de estas sustancias aumenta y cuál es la función que desempeñan en las comunidades microbianas, por lo que estas moléculas han servido como modelo para tratar de responder algunas preguntas evolutivas y ecológicas (Gordon y O'Brien, 2006).

La primera descripción de actividades relacionadas con las bacteriocinas se publicó hace más de ochenta años, cuando se descubrió un antagonismo entre cepas de *Escherichia coli*. Originalmente, estas sustancias fueron llamadas colicinas (Riley y Wertz, 2002). En el caso de las bacterias ácido-lácticas las primeras observaciones comenzaron en 1928, cuando se describió que ciertas cepas de *Lactococcus* empleadas en la fabricación de quesos producían un efecto inhibitorio del crecimiento de otras BAL y potencialmente podían inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y nocivas para la conservación del queso (Cotter *et al.*, 2005). En 1933 se describió por primera vez una sustancia de naturaleza peptídica con actividad antimicrobiana producida por cepas de la especie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, que posteriormente se denominó nisina (Riley y Wertz, 2002). La nisina es por tanto la bacteriocina que tiene un historial más largo de uso seguro en alimentación y la que ha sido más estudiada. En 1953 se comercializó por primera vez en Inglaterra, en 1969 se aprobó su uso en alimentación por la OMS (Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives) y en 1983 se incluyó en la lista de aditivos de la Unión Europea; poco después, en 1988, fue aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) norteamericana (Cotter *et al.*, 2005).

Bacteriocinas producidas por bacterias acidolácticas

Las bacterias ácido-lácticas ó bacterias lácticas (BAL) son microorganismos Gram-positivos, muy heterogéneos desde el punto de vista morfológico y fisiológico, y cuya característica principal es la producción de ácido láctico como producto mayoritario de un metabolismo fermentativo de los carbohidratos. En general, las BAL son microorganismos de morfología bacilar o cocoide, no esporulados, microaerofílicos o anaerobios facultativos, carecen de citocromos y catalasa *sensu stricto* y poseen un contenido de guanina y citosina (G+C) inferior a 50 mol%. Actualmente, el grupo de las BAL comprende microorganismos de los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloio-*

coccus, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Cintas *et al.*, 2001; Rojas y Vargas, 2008). Las bacterias lácticas se localizan frecuentemente en habitats ricos en nutrientes, caracterizados por la presencia de carbohidratos solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas, y con bajas tensiones de oxígeno como por ejemplo, la leche y productos lácteos, productos cárnicos y vegetales fermentados, frutas y hortalizas frescas, ensilados, pescado y derivados de la pesca (Lindgren y Dobrogosz, 1990; Stiles, 1996; Cintas *et al.*, 2000). Además, algunas bacterias lácticas son habitantes comunes del tracto gastrointestinal y mucosas del hombre y animales, del estiércol y de aguas residuales urbanas e industriales (Cintas *et al.*, 2000).

En la actualidad las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son las que encierran un mayor interés ya que tienen el estatus de QPS (*qualified presumption of safety*), es decir son consideradas como microorganismos seguros para la salud, ya que tanto ellas como sus metabolitos han sido consumidos en alimentos fermentados por innumerables generaciones sin que hubiera efectos adversos en la población (Joerger, 2002; Ogunbanwo *et al.*, 2003) (Driender *et al.*, 2006; Millete *et al.*, 2008).

Es importante mencionar que las bacterias ácido-lácticas son también los microorganismos más utilizados como probióticos no sólo en el ser humano sino en mamíferos y muy recientemente en los peces y crustáceos (Garriques y Arévalo, 1995; Gómez-Gil *et al.*, 2000; Briones y Lozano, 2003; Campaña *et al.*, 2003). Los estudios efectuados con BAL han reportado efectos positivos en el crecimiento, sobrevivencia y eliminación de patógenos de los organismos acuáticos; sin embargo, la gran diversidad de compuestos inhibidores producidos por las bacterias ácido-lácticas, como las bacteriocinas, requieren de rigurosos estudios sobre el modo de acción de estos compuestos sobre otros microorganismos en condiciones ambientales diferentes a las de su origen, ya que en la mayoría de los casos se han utilizado cepas aisladas del ser humano o de mamíferos y están siendo comercializadas y utilizadas en acuicultura y, a la fecha, no se cuenta con reportes sobre el tipo y efecto de estos compuestos en acuicultura (O'Sullivan *et al.*, 2002).

Tabla 1. Algunos ejemplos de BAL y bacteriocinas que producen (Castellano *et al.*, 2008)

Microorganismo productor	Bacteriocina
<i>L. lactis</i> WNC20	Nisina Z Ia
<i>L. sakei</i> 148	Lactocina S
<i>L. sakei</i> L45	Lactocina S
<i>L. sakei</i> LTH673	Sakacina K,
<i>L. sakei</i> I151	Sakacina P
<i>L. sakei</i> Lb706	Sakacina A
<i>L. sakei</i> CTC494	Sakacina K
<i>L. brevis</i> SB27	Brevicina 27
<i>L. curvatus</i> LTH1174	Curvacina A
<i>L. curvatus</i> FS47	Curvaticina FS47
<i>L. curvatus</i> L442	Curvaticina L442
<i>L. plantarum</i> CTC305	Plantarocina A
<i>L. carnosum</i> TA11a	Leucocina a
<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	Pediocina PA
<i>P. acidilactici</i> L50	Pediocina L50
<i>P. pentosaceus</i> Z102	Pediocina PA-1
<i>C. piscicola</i> LV17B	Carnobacteriocina B2*
<i>C. piscicola</i> V1	Piscicocina v1a *
<i>C. piscicola</i> LV17A	Carnobacteriocina *
<i>C. piscicola</i> JG126	Piscicolina 126 I *
<i>C. piscicola</i> KLV17B	Carnobacteriocina B1/B2*
<i>C. divergens</i> 750	Divergician 750
<i>C. divergens</i> LV13	Divergicina A

* Microorganismo aislado del tracto digestivo de peces

Clasificación de las bacteriocinas

Diversos investigadores han buscado clasificar a las bacteriocinas de acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas. A continuación se presenta la clasificación de estos compuestos propuesta por Kemperman *et al.*, (2003).

Clase I: Lantibióticos.- Son péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, b-metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. Con poca estabilidad al calor, péptidos poli cíclicos (< 5 KDa) con aminoácidos modificados. La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de los átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. Un ejemplo bien conocido de estas bacteriocinas es la nisina. A su vez, en función de su estructura y modo de acción, los lantibióticos se subdividen en 2 grupos:

Clase I A: Péptidos elongados y catiónicos que actúan a nivel de membrana y que engloban a los lan-

tibióticos de un sólo péptido y a aquellos que requieren la presencia de dos péptidos para ejercer su actividad antimicrobiana total.

Clase I B: Péptidos globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores enzimáticos.

Clase II: No lantibióticos.- bacteriocinas lineales y no modificadas postraduccionalmente. Son péptidos pequeños (< 10 kDa) y termoestables, que actúan a nivel de la membrana plasmática. El representante más característico de este grupo es la pediocina PA-1, la bacteriocina más estudiada después de la nisina. En este grupo se pueden identificar tres subclases:

Clase II a: Péptidos activos contra *Listeria*, tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P.

Clase II b: Formadores de complejos para la formación de poros que consisten de dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana. En este grupo se encuentran la lactococina G y las plantaricinas EF y JK.

Clase II c: péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B.

Clase III: bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles. Las bacteriocinas más conocidas de esta clase son helveticina J, V, acidofilicina Ay lactacinas A y B.

Clase IV: bacteriocinas complejas. Son péptidos con una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucídicas necesarias para su actividad biológica. Por tanto, esta clase incluye bacteriocinas que se consideran como glicoproteínas (lactocina S) o como lipoproteínas (mesenterocina 52).

Clase V: bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente. A esta clase pertenecen la enterocina AS-48 y la gasicina A.

Bacteriocinas representativas

Nisina

La nisina, descrita en 1928, fue la primer bacteriocina aislada a partir de la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis* Subs. *lactis*. Es la bacteriocina mejor caracterizada y es utilizada como conservador de alimentos; es la única reconocida por la FDA con

la categoría GRAS (Generally Recognized As Safe). Se produce de forma natural en algunos productos lácteos y se utiliza en la producción de alimentos y como un aditivo en productos lácteos para prevenir la descomposición ocasionada por bacterias Gram positivas, especialmente de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria* (Maldonado y Llanca, 2007).

La nisina es un péptido de 34 aminoácidos, de bajo peso molecular menor a 5 kDa. La síntesis de la nisina es compleja, requiere de procesos de transcripción, traducción, modificaciones postraduccionales, secreción, procesamiento, y señales de transducción. Existen dos variantes de esta bacteriocina, la nisina A y la nisina Z, que difieren solamente en el aminoácido de la posición 27, la histidina en la nisina A cambia por asparagina en la nisina Z (Sangronis y García, 2007).

La nisina es ácida por naturaleza por lo que es estable en condiciones ácidas; su solubilidad aumenta al aumentar la temperatura y disminuir el pH. Se demostró que la nisina es rápidamente inactivada en el intestino por las enzimas digestivas y no puede detectarse en la saliva de humanos diez minutos después de haber consumido un líquido que la contenga (Simova *et al.*, 2006).

Pediocina

Es una bacteriocina producida por *Pediococcus acidolactic* es utilizada como conservador en productos vegetales cárnicos y se ha observado una elevada actividad contra especies de *Listeria*. Dada su alta actividad contra especies de *Listeria* esta bacteriocina tiene un alto potencial para ser utilizado como conservador en alimentos lácteos (Fernández, 2005; Wirawan *et al.*, 2007).

Plantaricinas E/F y J/K

Son bacteriocinas del grupo IIb producidas por *Lactobacillus plantarum* que tienen actividad antimicrobiana cuando interactúan como un sistema de 2 péptidos. La síntesis de la plantaricina es sumamente compleja, está regulada por la acción de 5 operones con 21 genes diferentes, existen un sin número de reportes que asocian a la existencia de plásmidos para la producción de esta bacteriocina. (Mourad, 2007).

Divergicina A

Es una bacteriocina producida por *Caernobacterium divergens* LV13 que se caracteriza por poseer un sistema de secreción que involucra la presencia de un

Tabla 2. Principales Bacteriocinas y microorganismos productores utilizados en la industria (Mess, 2003).

Bacteriocina	Clase	Microorganismo productor
Nisina	I	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>
Pediocina PA-1	IIa	<i>Pediococcus acidilactici</i> y <i>Lactobacillus plantarum WHE92</i>
Pediocina JD	IIa	<i>Pediococcus acidilactici JD1-23</i>
Sakacina A	IIa	<i>Lactobacillus sake 706</i>
Sakacina P	IIa	<i>Lactobacillus sake LTH673</i>
Curvacina A	IIa	<i>Lactobacillus curvatus LTH1174</i>
Mesentericina Y105	IIa	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Plantaricina E/F	IIb	<i>Lactobacillus plantarum C11</i>
Lactococcina A	IIb	<i>Lactococcus lactis subsp cremoris</i>
Lactococcina B	IIb	<i>Lactococcus lactis subsp cremoris 9B4</i>
Lactacina F	IIb	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Divergicina	IIc	<i>Carnobacterium divergens LV13</i>
Helveticina	III	<i>Lactobacillus helveticus</i>

péptido señal. Con un peso molecular de 4.6 kDa, la divergicina A es un péptido pequeño, de naturaleza hidrofóbica y termoestable. A diferencia de las bacteriocinas de la clase II que tienen un sitio de rompimiento característico Gli-Gli, esta bacteriocina posee en su extremo N-terminal un sitio de rompimiento Ala-Ser-Ala y actúa como péptido señal para el uso del sistema de secreción de la célula (Maldonado y Llanca, 2007).

Helveticina J

Esta bacteriocina es producida por *Lactobacillus helveticus*, microorganismo que se encuentra de manera natural en quesos madurados. La bacteriocina presenta actividad antibacteriana contra especies relacionadas. Es una proteína de 37 kDa termolábil (30 min a 100°C) y el gen que la produce se localiza en el DNA cromosomal. Poco se conoce de las características bioquímicas de la bacteriocina y de su modo de acción (Cintas et al, 2001).

Modo de acción de las bacteriocinas

La acción de las bacteriocinas está determinada por composición de la membrana citoplasmática, la estructura y la expresión de una proteína en función de la inmunidad, además de la composición química del medio ambiente. Recientemente se considera también la existencia de las moléculas superficiales en la membrana de la célula blanco que permiten el acoplamiento con la bacteriocina producida por otra bacteria (Cintas et al, 2001; Heerklotz et al., 2004).

Las bacterias Gram-positivas se caracterizan por poseer un alto contenido en lípidos aniónicos en su membrana, en este caso el modo de acción de las bac-

teriocinas es la unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga neta positiva localizada en uno de sus extremos (extremo C-terminal de la nisina, extremo N-terminal de la pediocina); después se produce la inserción de las bacteriocinas en la bicapa lipídica, en el caso de la nisina esta inserción se realiza por su extremo N-terminal (Moll et al., 1999) y en el caso de la pediocina, a través de su α -hélice transmembranal del extremo C-terminal (Ennahar et al., 2000). De este modo se forman poros en la membrana bacteriana, la cual queda permeabilizada, la célula empieza a perder iones y metabolitos fundamentales para su supervivencia y eventualmente se produce la muerte bacteriana (Muy probablemente debido a vesiculación del protoplasma, la formación de poros y la desintegración completa de la célula (Bizani et al., 2005). Otro aspecto importante es la inhibición de la biosíntesis del ADN que conlleva a la muerte celular, como un mecanismo secundario de estos péptidos antimicrobianos (Brötz y Sahl 2000).

El poder que ejercen las bacteriocinas sobre otros microorganismos patógenos va a tener distintos comportamientos, es decir, algunos microorganismos pueden ser sensibles, mientras que otros, son resistentes a la acción de estos compuestos, incluso una cepa que parece ser sensible puede tener células que presenten resistencia a la acción de la bacteriocina. De estos mismos microorganismos algunos pueden ser sensibles a una y resistentes a otra, las mismas bacterias productoras de compuestos antimicrobianos pueden ser sensibles a la acción de otra bacteriocina y por últi-

mo, células de esporas que presentan resistencia a estas sustancias, pueden volverse sensibles después de la esporulación (Cintas *et al.*, 2001; Grande *et al.*, 2006). El campo de acción de las bacteriocinas se relaciona con el contenido de cistina y de acuerdo con ello, se establecen tres grupos: a) bacteriocinas con un estrecho rango de acción, restringido a microorganismos de la misma especie; b) bacteriocinas con un rango intermedio que inhibe bacterias lácticas y algunas bacterias Gram-Positivas; y b) bacteriocinas con amplio rango de acción, las cuales inhiben una amplia variedad de Gram-Positivas (Cintas *et al.*, 2001).

Producción y purificación de bacteriocinas

La detección de cepas productoras de bacteriocinas es muy importante porque permitirá hacer estudios posteriores que puedan establecer su potencial en el manejo y control de los procesos infecciosos en muchas especies de animales así como su uso en la industria alimenticia. Sin embargo esto no es nada fácil y se requieren de varios pasos metodológicos para identificar, producir y purificar dichas sustancias.

- Es necesario realizar estudios de producción y contar con grandes proporciones de cultivos antes de iniciar la purificación. La producción de algunas bacteriocinas puede ser favorecida bajo ciertas condiciones de crecimiento. Por ejemplo las condiciones de incubación, como son la temperatura y el pH (Wescombe y Tagg, 2003; Svetoslav, *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2007). Por lo que las condiciones de producción deben ser específicas para cada organismo productor (Pascual *et al.*, 2008).
- La composición del medio de crecimiento también afecta a la producción de estas sustancias (Wescombe y Tagg, 2003; Zalán *et al.*, 2005). En general los medios complejos que contienen una fuente rica en nitrógeno son óptimos para el aumento de producción de bacteriocinas (Kemperman, 2003; Kawai, 2003).

Es importante elegir un medio de crecimiento correcto ya que este puede interferir o aumentar la producción y purificación de bacteriocinas, por ejemplo, se ha reportado que el Tween 80, interfiere en la purificación de estas sustancias además de que disminuye la actividad antimicrobiana de pediocina A y lactocina S.

- Una vez conseguida la producción necesaria de la cepa de interés, se remueven las células por centrifugación y se precipita la proteína con la adición de sulfato de amonio, seguido de varios pasos de cromatografía (Cintas *et al.*, 2001). Se han desarrollado otros métodos con separaciones por cromatografía y de acuerdo al pH del medio donde logran una total liberación o absorción de las bacteriocinas dentro de la célula. El método más común utilizado es la precipitación con sulfato de amonio seguido de una cromatografía HPLC (Svetoslav *et al.*, 2004).
- Para comprobar las características bioquímicas del antibiótico producido se tratan las muestras obtenidas con diferentes proteasas (a-quimiotripsina, tripsina, proteinasa K, y pronasa E), o con otras enzimas (a-amilasa, lipasa A, lisozima, aminopeptidasa, mutanolisina, DNAsa, y RNAsa); después se determina el tamaño del compuesto producido mediante ultrafiltración o detectar la actividad en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 15 % (Tiwari y Srivastava, 2008).
- Posteriormente se determina el campo de acción inhibitorio de la bacteriocina haciendo diferentes pruebas de inhibición *in vitro*. Moreno *et al.* (2008), describen dos técnicas ampliamente utilizadas: antagonismo directo e indirecto. La primera consiste en hacer crecer la cepa productora de la sustancia inhibidora junto a una cepa indicadora o sensible y, observar, luego de la incubación la formación de halos de inhibición. La segunda tipo de antagonismo consiste en hacer crecer en primer lugar la cepa productora de la sustancia inhibidora, de esta forma se permite que libere la sustancia y solo entonces se siembra la cepa contra la cual se desea observar el efecto antagónico.

Técnicas de identificación detección y cuantificación

Las técnicas empleadas en la identificación, detección y cuantificación de las bacteriocinas pueden dividirse en tres grandes grupos (Martínez, 2000):

Pruebas biológicas

Las pruebas biológicas constituyen, habitualmente, el punto de partida en la búsqueda de bacterias productoras de bacteriocinas. Los bioensayos más empleados son la prueba de difusión en agar y los métodos turbidométricos, basados en la inhibición del

desarrollo de un microorganismo indicador inoculado en una placa microtituladora (Cintas *et al.*, 2000).

La cuantificación de la actividad antimicrobiana se realiza empleando “unidades arbitrarias” (UA), en la prueba de difusión en placas de agar, ó “unidades de bacteriocina” (UB), cuando el bioensayo utilizado es la prueba turbidométrica. Ambos parámetros se definen como la recíproca de la dilución más alta de una muestra que produce en el agar inhibición del indicador (UA) o que inhibe en las placas microtituladoras un 50 % el crecimiento del indicador (UB). No obstante, a pesar de su utilidad, sensibilidad y sencillez, ambas pruebas presentan inconvenientes que las convierten en poco reproducibles y fiables. La cuantificación de la actividad antimicrobiana es subjetiva y depende de la sensibilidad de la cepa indicadora y son pruebas inespecíficas, pues no permiten discriminar otros posibles compuestos o componentes con actividad antimicrobiana.

Pruebas genéticas

Las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o de hibridación DNA-DNA, (*Southern blotting*) son pruebas genéticas de uso rutinario que permiten determinar si una bacteria posee el potencial genético de codificar una determinada bacteriocina (Martínez, 2000). Estas pruebas tienen entre sus ventajas su elevada especificidad y sensibilidad y son de utilidad para determinar la presencia del gen estructural de una bacteriocina conocida en un gran número de cepas. Sin embargo, la detección del gen estructural de una bacteriocina en un organismo hospedador no implica conocer y cuantificar su producción.

Pruebas inmunológicas

Las pruebas inmunológicas constituyen métodos útiles para la detección y cuantificación de bacteriocinas. La mayoría de estas pruebas se basan en la transferencia del antígeno a una superficie inerte para que, una vez fijado a la superficie, pueda ser reconocido por un anticuerpo específico; el complejo antígeno-anticuerpo formado se detectará enzimáticamente. En general, los ensayos inmunoenzimáticos permiten la detección y cuantificación de estas sustancias en diferentes sustratos, ya sean los sobrenadantes de los cultivos de los microorganismos productores o los alimentos en los que se encuentran.

En función del tipo de muestra utilizada para detectar el antígeno, en este caso la bacteriocina, las técnicas

inmunoenzimáticas pueden dividirse en dos grandes grupos:

(a) Ensayos de transferencia de células y su posterior reconocimiento inmunológico, como la prueba de “*Colony immunoblotting*”.

(b) Ensayos basados en la transferencia de bacteriocinas semipurificadas. Dentro de este grupo, existen distintas técnicas, según la transferencia y superficie inerte utilizada para la fijación de los antígenos, como por ejemplo: “*Western blotting*”, basada en la transferencia electroforética de las bacteriocinas a una membrana de nitrocelulosa; el “*Spot immunoblotting*”, que es la transferencia directa de las bacteriocinas a una membrana de nitrocelulosa; y la técnica ELISA, que se lleva al cabo mediante la transferencia directa a placas de poliestireno. Hasta ahora, las técnicas inmunológicas más utilizadas han sido las basadas en la detección y cuantificación directa de las bacteriocinas.

Conclusiones

El empleo de productos biológicos como las bacteriocinas para inhibir o destruir a microorganismos patógenos, es un método de gran interés en la industria alimentaria que tiene como objetivo final la obtención de alimentos más seguros para el consumidor. Las bacterias ácido lácticas (BAL) por su origen alimentario son consideradas como GRAS y por lo tanto son ideales para su uso como biopreservantes o biocontroladores microbianos. De especial importancia su uso en alimentos de gran valor económico como por ejemplo el caso del Salmón, en el cual se han aislado patógenos como *L. monocytogenes*, y se ha podido eliminar mediante el uso de bacteriocinas aisladas de lactobacilos. Actualmente se está desarrollando un fuerte interés por la identificación, purificación y producción de bacteriocinas para su aplicación en el campo de la producción animal. Sin embargo; se requieren de más estudios sobre la identificación de bacteriocinas de cepas utilizadas como probióticos; como caso particular es de señalar la acuicultura, que a nivel mundial se ha desarrollado como una actividad económica importante, la cual se ha visto afectada por un gran número de procesos infecciosos que ponen en riesgo la producción, por lo que el uso de cepas probióticas productoras de bacteriocinas resulta una estrategia interesante para restringir o reducir el uso de antibióticos, debido a que estos han provocado marcadas resistencias bacterianas, destrucción de los ecosistemas y elevados costos de producción en

acuicultura.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte de la Tesis doctoral del primer autor. Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Financiamiento CONACYT-México

Bibliografía

1. Bizani, D., Motta, A., Morrissy, A., Terra, R., Souto, A. & Brandelli, A., Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*, *Intern. Microbiol.*, 8,125-131, 2005.
2. Briones, F. P. y Lozano, A. E., Factors affecting growth of the spiny lobster *Palinurus gracilis* and *Palinurus inflatus* (Decapoda: Palinuridae) in Guerrero, México, *Rev. de Biol. Trop.*, 51, 165-174.,2003.
3. Brötz, H., Sahl, H. G., New insights into the mechanism of action of lantibiotics-diverse biological effects by binding to the same molecular target, *J. Antimicrob. Chemother.*, 46,1-6, 2000.
4. Campaña, T. A., Virrreal, C., Civera, C. y Martínez, C. L. R., Efecto del nivel proteico de la dieta sobre el desarrollo de juveniles de la langosta australiana *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae), *Rev. Biol. Trop.*, 51,749-752, 2003.
5. Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., Vignolo, G., A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina, *Meat Science*, 79, 483-499, 2008.
6. Cintas, L. M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I. F. & Hernández, P. E., Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, *F. Scn, Tech. Inter.*, 74, 281- 305, 2001.
7. Cintas, L. M., Casaus, P. y Hernández, P. E., Bacterias lácticas de origen alimentario: consideraciones taxonómicas y filogenéticas, *Alimentaria*, 38, 61-70, 2000.
8. Cotter, P. D., Hill, C. & Ross, R. P., Bacteriocins: developing innate immunity for food, *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 777-788. 2005.
9. Chang, J. Y., Lee, H. J. and Chang, H. C., Identification of the agent from *Lactobacillus plantarum* KFRI464 that enhances bacteriocin production by *Leuconostoc citreum* GJ7. *J. of Appl. Microbiol.*, 103, 2504-2515,2007
10. Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L. M., Prevost, H., The continuing story of class IIa bacteriocins, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70, 564-582, 2006
11. Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto K. and Ishizaki, A., Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity, *FEMS Microbiol., Rev.* 24:85-106. 2000.
12. Eijsink, V. G. H., Skeie, M., Middelhoven, P. H., Brurberg, M. B. and Ness, I. F., Comparative Studies of Class IIa Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3275-328,1998.
13. Fernández, D. A., Producción inducible de lactococina A, pediocina PA-1, colicina V e interleuquina-2 en cepas de *Lactococcus lactis* productoras de nisina, Tesis Doctoral, 2005.
14. Galvin, M., C. Hill., y Ross, R. P., Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive pathogens which appear insensitive in standard plate assays, *Int. Lett. Appl. Microbiol.*, 28,355-358, 1999.
15. Garriques, D. y Arévalo, G., An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Pennaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In: Browdy, C. y Hopkins, J. (Eds.), *Swimming Through Troubled Water*, Proceedings of the Special Session on Prawn Farming, Aquaculture'95, World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 1995, pp. 53-59.
16. Gómez-Gil, B., Roque, A. y Turnbull, J. F., The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms, *Aquaculture*, 191, 259-270, 2000.
17. Gordon, M. D. and O'Brien, L. C., Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*, *Microbiology*, 2006, 152, 3239-3244.
18. Grande, M. J., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Omar, N. Ben., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. & Martínez-Cañamero, A., Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48, *Inter. J. of Food Microbiol.*, 106, 185-194, 2006.
19. Guarner, F. & Malagelada, J. R., Ecología Intestinal: Modulación mediante probióticos. En *Alimentos Funcionales. Probióticos*. [RM Ortega, A Marcos, J Aranceta, JA Mateos, AM Requejo, L Serra] Ed. Médica Panamericana. 2002. Cap 4.
20. Gullian, M., Thompson, F. y Rodríguez, J., Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Pennaeus vannamei*,

- Aquaculture*, 233, 1-14, 2004.
21. Heerklotz H., Wieprecht, T., Seelig, J., Membrane perturbation by the lipopeptide surfactin and detergents as studied by deuterium NMR, *J. Phys. Chem.*, 108, 4909-4915, 2004.
 22. Joerger, R. D., Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages, *Poult. Sci.*, 82, 640-647, 2003.
 23. Katikou P., Ambrosiadis, I., Georgantelis, D., Koidis, P., Georgakis, S. A., Effect of Lactobacillus-protective cultures with bacteriocin-like inhibitory substances producing ability on microbiological, chemical and sensory changes during storage of refrigerated vacuum-packaged sliced beef, *J. Appl. Microbiol.*, 99, 1303-1313, 2005.
 24. Kawai, y., Arakawa, K., Itoh, A., Saitoh, B., Ishii, Y., Nishimura, J., Kitazawa, H., Itoh, T. & Saito, T., Heterologous expression of gassericin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus gasserii* LA39, *Anim Sci J*, 74, 45-51, 2003.
 25. Kemperman, R., Kuipers, A., Karsens, H., Nauta, A., Kuipers, O. & Kok, J., Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574, *Appl Environ Microbiol*, 69, 1589-1597. 2003.
 26. Lindgren, S. E. & Dobrogosz, W. J., Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations, *FEMS Microbiol. Rev.*, 87,149-164. 1990.
 27. Maldonado, R. y Lllancas, L., Efecto de la incorporación de nisina sobre la supervivencia del *Staphylococcus aureus* en queso de mano, *Rev. Fac. Agron.*, 33,147- 163. 2007.
 28. Martínez, J. M., Producción y empleos de anticuerpos de especificidad predeterminada para la detección, cuantificación y purificación de las bacteriocinas pediocina PA-1 y enterocina A y para el reconocimiento específico de su co)expresión heteróloga en *Lactococcus lactis*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2000.
 29. Mechnikoff, E., Prolongation of Life, *Putnam and Sons*. New York, NY. 1907.
 30. Mess, P., Guerrieri, E., Bondi, M., Bacteriocin-like substance (BLS) production in *Aeromonas hydrophila* water isolates. *FEMS Microbiology Letters*, 220, 121-125, 2003.
 31. Millette, C., Dupont, F., Shareck, M. T., Ruiz, D., Archambault. and Lacroix. M., Purification and identification of the pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* MM33, a new human intestinal strain, *J. of Appl. Microbiol.*, 104, 269-275, 2008
 32. Moll, G. N., Konings, N. and Driessen, A. J., Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 185-198, 1999.
 33. Moreno, M. R., Baert, B., Denaye, S., Cornelis, P., De Vuyst, L., Characterization of the amylovorin locus of *Lactobacillus amylovorus* DCE 471, producer of a bacteriocin active against *Pseudomonas aeruginosa*, in combination with colistin and pyocins, *FEMS Microbiol Lett*, 286(2), 199-206, 2008.
 34. Motta, S. A., & Brandelli, Adriano., Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus* sp. strain P34, *World J. Microbiol Biotechnol.* 24,641-646. 2008.
 35. Mourad, K., Plasmid DNA studies in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from olive fermentations: production of and immunity to plantaricin OL15 is associated to a 9.6 Kb plasmid (pOL15), *Grasas y Aceites*, 58 (2). 2007.
 36. Ogunbanwo, S., Sanni, A. & Onilude, A., Influence of cultural conditions on the production of bacteriocina by *Lactobacillus brevis* OG1. *African J. of Biotech.*, 2 (7), 179-184. 2003.
 37. O'Sullivan, L., Ross, R. P, Hill, C., Potential of bacteriocin producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality, *Biochimie*, 84, 593-604, 2002.
 38. Papagianni, M., Ribosomally synthesized peptides and antimicrobial properties: Biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol. Adv.*, 21, 465-499, 2003.
 39. Pascual, L. M., Daniele, M. B, Giordano. C. Pájaro, M., Pufication and Partial Characterization of Novel Bacteriocin L23 Produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Curr Microbiol*, 56,397-402, 2008
 40. Rengpipat, S., Rukpratanpom,S., Piyatiratitivorakul,S., Menasaveta, P., Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiotic bacterium (*Bacillus* SII), *Aquaculture*, 191,271-288, 2000.
 41. Riley, M. A. y Wertz, J. E., Bacteriocins:Evolution, Ecology, and Application, *Annu. Rev. Microbiol.*, 56,117-137. 2002.
 42. Rodriguez, J. & Le Moullac, G., Stage of the art of immunological tool and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*, 191, 109-119. 2000.
 43. Rojas, C., Vargas, P., Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimen-

- taria, *Tecnología en Marcha*, 21(2) 9-16, 2008.
44. Quintana, A. A., Riesgo sanitario asociado al comercio de animales acuáticos. *Revista Aquatic*, 14 (1), 36-41, 2001.
 45. Sangronis, E., García, J., Efecto de la adición de nisina en los parámetros físicos, químicos y sensoriales del queso "telita". *An. Venez. de Nutrición.*, 20 (1), 12-16, 2007
 46. Simon, O. 2005., Microorganisms as feed additives Probiotics, *Adv. Pork. Production*, 16, 161-167.
 47. Simova, E, Beshkova, D, Najdenski H, Frenkova, G, Simov Z, Tsvetkova, I., Antimicrobial-producing lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian milk products: Inhibitory properties and in situ bacteriocinogenic activity, 685. In: Proceedings of the IUFOST, 13th World Congress Food Sci Technol "Food is life", 17-21 September, Nantes, France, 2006, 907-908.
 48. Stiles, M. E., Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 331-345 Svetoslav, T., Vaz-Velho, M. & Gibbs, P. 2004. Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST31. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35: 157-160. 1996.
 49. Svetoslav, T., Vaz-Velho, M. & Gibbs, P., Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST31, *Brazilian J. of Microbiol.*, 35, 157-160, 2004.
 50. Svetoch, E. A., Eruslanov, B., Perelygin, V. V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, P. I., Borzenkov, V., Levchuk, N. V., P.Svetoch, O. E., Kovalev, Y. N., Stepanshin, Y. G., Siragusa, N. G., Bruce, R. S., Norman, J. S., Diverse Antimicrobial Killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 Bacteriocin., *J. Agric. Food Chem.* 56, 1942-1948., 2008.
 51. Tiwari y Srivastava, S., Purification and characterization of plantaricin LR14: a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LR/14, *Appl. Microbio. and Biotech.*, 79, (5), 759-767, 2008.
 52. Turner, D. G., Welch, G., Graham, M., Characteristics of the variable star pcygni determined from cluster membership, *JAAVSO*, 29, 73, 2001.
 53. Vázquez, J. A., González, M. P., y Murado, M. A., Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish, *Aquaculture* 245, 149-161, 2005.
 54. Venkant, H. K., Sahu, N. P. & Jai N, K. K., Effect of feeding *Lactobacillus*- based probiotic on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), *Aquaculture Research*, 35, 501-507. 2004.
 55. Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos & Verstraete, W., Probiotic bacteria as biological agents in aquaculture, *Micro. And Mole. Biol. Rev.*, 64 (4) 655-671, 2000.
 56. Wescombe, P. A. & Tagg, J. R., Purification and characterization of streptin, a type A1 lantibiotic produced by *Streptococcus pyogenes*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 2737-2747, 2003.
 57. Wirawan. R. E., Swanson, M. K. Kleffmann, T. Jack, W. R. and Tagg, J. R., Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis* Yousef AE, JB Luchansky, AJ Degnan and MP Doyle, 1991, Behavior of *Listeria monocytogenes* in wiener exudates in the presence of *Pediococcus acidilactici* H or pediocin AcH during storage at 4 or 25°C. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1461-1467, 2007.
 58. Zalán, Z., Néemeth, E., Barath, A., Halasz, A., Influence of growth medium in hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains, *Food. Technol. Biotechnol.*, 43, 219-225, 2005.