



Universidad de Jaén  
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

**PURIFICACIÓN PARCIAL  
DEL COMPUESTO  
PROTEICO  
ANTIMICROBIANO POR  
*PAENIBACILLUS  
THIAMINOLYTICUS* 165 EN  
CONDICIONES IN VITRO**

**Alumno: Avalos Valenzuela, Jorge Vinicio**

Tutores: Rubén Pérez Pulido

María José Grande Burgos

Dpto: Departamento de Microbiología

**Julio, 2019**

# ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen.....	4
Abstrac .....	4
1. Introducción .....	5
1.1. Problemática y justificación .....	5
1.2. Marco teórico.....	7
1.2.1. Microorganismos productores de metabolitos antimicrobianos .....	7
1.2.2. Clasificación de bacteriocina .....	10
1.2.2.1. Péptidos antimicrobianos de síntesis ribosómica de BAL .....	11
1.2.2.2. Clasificación de péptidos antimicrobianos por su origen de síntesis.....	13
1.2.3. Bacteria <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i> cepa 165 .....	16
1.2.4. Purificación de péptidos antimicrobianos.....	18
2. Objetivos .....	19
2.1. Objetivo general.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. Materiales y métodos .....	20
3.1. Caracterización macroscópica y microscópica <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i> 165 .....	20
3.2. Determinación de la actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células de la bacteria <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i> 165 .....	21
3.3. Cinética del crecimiento de <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i> 165 .....	22
3.4. Purificación de la bacteriocina por cromatografía de intercambio iónico.....	24
4. Resultado y discusión .....	24
4.1. Caracterización de <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i> 165 .....	24
4.2. Determinación de la actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células de la bacteria <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i> 165 .....	26
4.3. Cinética del crecimiento de <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i> 165 .....	27
4.4. Purificación de la bacteriocina por cromatografía de intercambio iónico.....	30
5. Conclusiones.....	32
6. Referencias.....	33

## CONTENIDO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación y principales características de las bacteriocinas. Adaptado de Lagha et al., (2017) .....	11
<b>Tabla 2.</b> Crecimiento de <i>P. Thiaminolyticus</i> 165 en medio TSB a diferentes rangos de temperaturas y pH.....	26
<b>Tabla 3.</b> Actividad antimicrobiana generada del sobrenadante libre de células de <i>P. thiaminolyticus</i> 165 contra patógenos Gram positivos y Gram negativos.....	26
<b>Tabla 4.</b> Cinética del crecimiento <i>in vitro</i> de <i>P. thiaminolyticus</i> 165 en medio TSB.....	27
<b>Tabla 5.</b> Actividad antimicrobiana de las fracciones de la bacteriocina obtenidas por cromatografía de intercambio iónico. ....	31

## CONTENIDO DE IMÁGENES

<b>Imagen 1.</b> Placas con el medio de cultivo de agar BHA-T con pocillos de acero Oxford para la técnica en discusión en agar.....	22
<b>Imagen 2.</b> Esquema de dilución seria en NaCl al 0.85%. de muestras para el recuento en placa de células viables.....	23
<b>Imagen 3.</b> Características macroscópicas y microscópicas de <i>P. Thiaminolyticus</i> 165. <b>(A.)</b> Tinción de Gram. <b>(B.)</b> , crecimiento en medio Agar TSB a 30 °C. <b>(C)</b> crecimiento en el gradiente de pH <b>(D)</b> y temperatura .....	25
<b>Imagen 4.</b> Cinética del crecimiento de <i>P. thiaminolyticus</i> 165, <b>(A)</b> Recuento de células viables y del pH <b>(B)</b> Medición de la Absorbancia a 600 nm y del pH.....	28
<b>Imagen 5.</b> Diámetro (mm) de la actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positiva y Gram negativa del sobrenadante libre de células durante 58 horas de <i>P. thiaminolyticus</i> 165.....	29
<b>Imagen 6.</b> Halos de inhibición de la actividad antimicrobiana frente <i>Staphylococcus aureus</i> del sobrenadante libre de células de <i>P. thiaminolyticus</i> 165.....	29
<b>Imagen 7.</b> Purificación de la bacteriocina mediante la cromatografía de intercambio iónico con la matriz CM Sephadex C-25 .....	31

## Resumen

El objetivo de esta investigación fue caracterizar la bacteria *Paenibacillus thiaminolyticus* 165, determinar su actividad antimicrobiana y purificar parcialmente el compuesto antimicrobiano que produce. Se determinó la actividad frente a bacterias gram positivas y gram negativas mediante la técnica de difusión en agar. Posteriormente mediante cromatografía de intercambio iónico se purificó el compuesto antimicrobiano. Los resultados indicaron que es una bacteria Gram positiva con forma de bastón y generadora de esporas. Forma colonias blancas, rugosas y con bordes rizoides en TSA. La bacteria presentó crecimiento a pH neutro y a temperaturas de 30° a 45° C. El péptido antimicrobiano producido es activo frente a *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Klebsiella spp.* Las condiciones óptimas para la mayor producción de péptidos antimicrobianos tienen lugar en medio TSB (pH 7.1) a 30° C durante 27 horas. La técnica de cromatografía de intercambio iónico utilizada no nos permitió una purificación del compuesto antimicrobiano, debido probablemente a su naturaleza protéica o a su conformación estructural.

## Abstract

This research was to characterize the bacterium *Paenibacillus thiaminolyticus* 165, determine its antimicrobial activity and partially purify the antimicrobial compound that produc. The activity against gram-positive and gram-negative bacteria was determined by the agar diffusion technique. Subsequently, by means of ion exchange chromatography, the antimicrobial compound was purified. Results indicated that is a Gram positive rod shaped bacterium and spore generator. It forms white, rough colonies with rhizoid borders on TSA. The bacteria presented growth at neutral pH and at a temperature of 45° C. The antimicrobial peptide produced is active against *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Klebsiella spp.* The optimal conditions for the highest production of antimicrobial peptides take place in TSB medium (pH 7.1) at 30°C for 27 hours. Chromatography technique used did not allow a purification of the antimicrobial compound, probably due to its proteinic nature or its structural conformation.

## **1. Introducción**

En las últimas décadas, numerosos brotes de contaminación en la industria alimentaria causados por diversos patógenos para el ser humano, han aumentado la preocupación por la conservación de los alimentos y lograr mantener la seguridad alimentaria. Los esfuerzos de investigación por la comunidad científica y las industrias, se han centrado en el descubrimiento de nuevas moléculas con la capacidad de inhibirlos. Las bacteriocinas son péptidos o proteínas sintetizados por diferentes grupos de bacterias. Hasta la actualidad los compuestos bacterianos más estudiados son los producidos por las bacterias ácido láctico (BAL), aunque se han encontrado diversas bacterias con la misma capacidad de producir compuestos antimicrobianos. Estas bacteriocinas presentan espectros de inhibición bastante amplio contra bacterias patógenas y alterantes de los alimentos. Estos compuestos pueden ser usados en la industria alimentaria ayudando a disminuir el uso de conservantes químicos y garantizando las propiedades organolépticas y nutricionales del alimento. Existen diferentes métodos para obtener y purificar los metabolitos secundarios producidos por microorganismos.

### **1.1. Problemática y justificación**

Los desafíos de la industria alimentaria, hoy en día son claros y precisos, entre ellos se encuentran: pérdida económica por el deterioro de los alimentos, disminución de costos en la producción y procesado de los alimentos, evitar la transmisión de patógenos en la cadena alimentaria, la búsqueda de satisfacción de la demanda por el consumidor con productos con alta calidad nutricional, la fácil disponibilidad del alimento, mínimamente procesado y con un mayor tiempo

de vida útil (Gálvez, Abriouel, López, & Omar, 2007). Por lo cual, es de gran importancia tanto en países desarrollados como aquellos en vías de desarrollo un correcto manejo y conservación de los alimentos, para evitar problemas de salud en los consumidores y pérdidas económicas en la industria alimentaria (Lucera, Costa, Conte, & Nobile, 2012).

La aparición de patógenos asociados con el consumo de alimentos, la resistencia de microorganismos a distintos fármacos, la demanda y preferencia de los consumidores por alimentos libres de conservantes artificiales, ha impulsado a la industria alimentaria a la investigación y desarrollo de nuevos métodos o formas de conservación de los mismos, con el fin de lograr una extensión de la vida útil y una mayor seguridad alimentaria (Lucera et al., 2012; Perez, Zendo, & Sonomoto, 2014).

En los últimos años, el interés de los sectores alimentarios y de la comunidad científica por conocer más sobre nuevos métodos de conservación para los alimentos, ha llevado a investigar nuevos métodos o formas con el fin de aumentar el tiempo de vida de los alimentos, sin afectar las características organolépticas de los mismos. El uso de diferentes métodos fisicoquímicos y biológicos pueden ayudar a conseguir un mayor tiempo de vida útil y la disponibilidad de los mismos en cualquier época del año según la demanda de los consumidores. La pasteurización, refrigeración, congelación, envases con atmosfera modificada, altas presiones, uso de conservantes químicos, fermentación y uso de bacteriocina son métodos y técnicas empleadas para prolongar el tiempo de vida útil de los alimentos (Lagha, Haas, Gottschalk, & Grenier, 2017; Lucera et al., 2012). El interés sobre las bacteriocinas por su origen biológico y características proteicas, son consideradas tecnología

biológica y la actividad antilisterial *in vitro* de la mayoría. Existe un interés en garantizar la seguridad de los alimentos mínimamente procesados (MONTVILLE & KAISER, 2014).

Las características antimicrobianas de dichas proteínas pueden ser una alternativa contra la lucha de otras bacterias patógenas en los alimentos (Lagha et al., 2017; Perez et al., 2014). Las características principales de las bacteriocinas es que deben ser proteínas y pueden ser sintetizadas ribosomalmente y no ribosomalmente, presentar una letalidad nula frente a las células que las sintetizan, presentar actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas.

## **1.2. Marco teórico**

### **1.2.1. Microorganismos productores de metabolitos antimicrobianos**

Los seres humanos han utilizado microorganismos desde sus inicios para obtener alimentos con una mayor durabilidad y mejorar las características organolépticas. Los primeros registros datan de 8000 años a. C., en la elaboración de quesos en Iraq. Seguido por la fermentación alcohólica de vino y cerveza por los egipcios y sumerios en 4000 años a. C. Aunque la fermentación haya sido utilizada durante varios siglos atrás como método de preservación hasta recién se conocen los microorganismos responsables del proceso y se descubrió que la acción combinada de una gama de metabolitos antimicrobianos producidos durante el proceso de fermentación, proporcionan un ambiente desfavorable para el crecimiento de muchos microorganismos patógenos y que pueden deteriorar el alimento (Paul Ross, Morgan, & Hill, 2002). En 1861 con el desarrollo de la pasteurización y el manejo de los microorganismos fermentadores se da un cambio en la producción de los alimentos, llegando

aumentar la producción y alargar el tiempo de vida de los alimentos. Desarrollando procesos de fermentación de vegetales, lácteos, carnes, bebidas alcohólicas (cerveza y vino), con el uso de levaduras y BAL.

Esto a su vez condujo al desarrollo de procesos de fermentación a gran escala para la producción comercial de alimentos fermentados y bebidas alcohólicas, con los microorganismos más ampliamente utilizados, incluyendo la levadura para la producción de cerveza, vinos y lácteos. En cada proceso fermentativo, la materia prima de bebidas y alimentos provee los sustratos para la formación de metabolitos microbianos que contribuyen a la prolongación mejorando la calidad del producto final.

En la actualidad, el procesamiento de los alimentos depende de diferentes tecnologías para conservar y garantizar que los alimentos mantengan su nivel de calidad y durabilidad desde la fabricación hasta su consumo (Paul Ross et al., 2002). En los últimos años se han estado buscando nuevas alternativas para la lucha contra microorganismos patógenos como bacteriocinas y hongos (Perez et al., 2014). Los microorganismos y sus metabolitos presentan la capacidad de inhibir a otros organismos. La mayoría de metabolitos generados por algunas bacterias son enzimas, ácidos y compuestos proteicos con actividad antimicrobiana.

Una alternativa es el uso de péptidos antimicrobianos o bacteriocinas, producidos por varios microorganismos, como respuesta inmune no específica. Estos péptidos se encuentran involucrados en la inhibición de varios microorganismos. Diferentes estudios de péptidos antimicrobianos han demostrado la eficacia y la actividad antibacteriana contra bacterias, parásitos,

virus y hongos (Abriouel, Valdivia, Martí, Maqueda, & Ga, 2003; Baltzer & Brown, 2011; Lagha et al., 2017).

Las bacterias pueden sintetizar bacteriocinas, la mayoría de estas son producidas por bacterias Gram-positivas (Chikindas et al., 2019). Se han evaluado péptidos antimicrobianos *in vitro*, obteniendo resultados favorables. Estos compuestos proteicos con característica antimicrobianas han atraído un gran interés durante las últimas tres décadas, siendo de mayor interés las bacteriocinas sintetizadas por bacterias ácido lácticas (LAB). Las bacteriocinas más estudiadas son la nisina, lacticina 3147 y pediocina sintetizadas por *Lactococcus lactis* y *Pediococcus acidilactici* respectivamente (Paul Ross et al., 2002). La mayoría presenta actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas para el ser humano como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Echerichia coli* y entre otras más.

La actividad de inhibición de las bacteriocinas, está restringida la mayoría de las veces con cepas filogenéticamente con las bacterias productoras, aunque también pueden actuar contra otras bacterias (Mokoena, 2017). El mecanismo de acción de los compuestos antimicrobianos depende de la estructura primaria, actuando sobre la envoltura celular de la bacteria y generando la lisis celular, otras actúan en el interior, llegando a afectar a la expresión de genes y proteínas (Lagha et al., 2017). Los genes productores de estos compuestos bacterianos se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido de la bacteria. Estos modifican la regulación, la exportación y la autoinmunidad de la producción de la bacteriocina. Las bacterias productoras usualmente sintetizan proteínas de autoinmunidad que les protege de sus propias bacteriocinas (Lagha et al., 2017).

Existe un gran interés por el uso de las bacteriocina en la conservación de alimentos por la industria alimentaria. Estas estructuras proteicas pueden sustituir a los conservantes químicos y también a los tratamientos térmicos. La aplicación en los alimentos no modifica las características nutricionales y organolépticas del mismo. Las bacteriocinas presentan un potencial en la preservación de diferentes alimentos. Se pueden usar en productos y derivados lácteos, preservación de la carne, ensaladas, productos de panificación, alimentos enlatados, huevo, vegetales fermentados, bebidas alcohólicas, mariscos, entre otros (Gálvez et al., 2007; Lagha et al., 2017; López-malo, 2012). La forma de usar la bacteriocina en la industria alimentaria, puede ser únicamente la bacteriocina o a la par con otro método de conservación como altas presiones, envases con atmosfera modificada y pasteurización para así lograr aumentar el tiempo de vida del alimento. La forma más común de aplicación de las bacteriocinas en los alimentos puede ser como: cultivos iniciadores en alimentos fermentados, sobre el producto directamente o bien como un ingrediente en forma de aditivo (Beshkova & Frengova, 2012).

### **1.2.2. Clasificación de bacteriocina**

Las bacteriocinas pueden ser clasificadas de dos maneras en la actualidad, la primera, es mediante el esquema de clasificación principal para los péptidos antimicrobianos de síntesis ribosómica actualmente disponible para BAL (**Tabla 1**). La segunda forma de clasificación es por su origen de síntesis como: Sintetizados Ribosomalmente y No Sintetizados Ribosomalmente (NRPS, de sus siglas en inglés).

**Tabla 1.** Clasificación y principales características de las bacteriocinas.  
Adaptado de Lagha et al., (2017)

CLASE	SUBCLASE	EJEMPLO	CARACTERÍSTICAS
I. Lantibiotico	I.a. Lineal	Nisina A	<5 kDa - Péptido lineal
	I.b. Globular	Suicin 3908	Presencia de aminoácidos modificados (lantionina, metilmetionina)
	I.c. Multicompetentes	Lacticina 3147	Estable al calor
II. No lantibioticos	II.a. Similar a la pediocina	Pediocina PA-1	<5 kDa - Péptido lineal
	II.b. Varios	Aureocina A53	Ausencia de aminoácidos modificados
	II.c. Multicompetentes	Lactococcin G	Estable al calor
III.	III.a. Bacteriolítico	Lysostaphin	> 25 kDa - Péptido lineal
	III.b. No lítico	Helveticin J	Sensible al calor
IV.	Ninguna	Enterocina AS-48	<8 kDa - Péptido cíclico

#### 1.2.2.1. Péptidos antimicrobianos de síntesis ribosómica de bacterias ácido lácticas

1. Las bacteriocinas de Clase I se denominan lantibióticos, son estructuras peptídicas policíclicas de un peso molecular entre 2 a 5 kDa y están conformados por 19 a 38 aminoácidos. Se caracterizan por la forma de actuar en la membrana celular. Son sintetizados ribosomalmente y modificados después de la traducción, algunos presentan la característica de ser estables al calor (Mokoena, 2017). Los lantibióticos se dividen en dos subgrupos basados en la similitud estructural. La subclase I.a. presentan estructura lineal, larga y flexible con carga

positiva. Generalmente actúan generando poros en la membrana citoplasmática. Los péptidos de la subclase I.b. son globulares y tienen una estructura más rígida. Están cargados negativamente o no tienen carga neta. Tienden a ejercer su acción al interferir con las reacciones enzimáticas esenciales en las bacterias (Lagha et al., 2017; Parada, Caron, Bianchi, Medeiros, & Soccol, 2007).

2. Las bacteriocinas de Clase II son conocidas como No lantibióticos, son estructuras proteicas catiónicas con característica hidrófobas con un peso < 10 kDa, algunas requieren una molécula receptora específica para la adsorción (Beshkova & Frengova, 2012; Mokoena, 2017). La bacteriocina de Clase II presenta varias subclases. La primera es la subclase II.a., este tipo de bacteriocinas presentan actividad antimicrobiana frente a *Listeria spp.* Se han aislado alrededor de 50 diferentes tipos de bacteriocinas de esta subclase a partir de alimentos como vegetales fermentados y productos lácteos, salmón ahumado y también en el tracto gastrointestinal humano. Otra subclase es II.b., algunos de estos péptidos antimicrobianos necesitan la complementariedad de otro péptido con el fin de presentar o aumentar la actividad inhibición. Los péptidos antimicrobianos presentan regiones anfífilas e hidrófobas y son catiónicos en la mayoría de veces. La subclase II.c. presenta un tamaño pequeño y carácter termoestable (Parada et al., 2007).
3. La clase III de bacteriocinas incluyen péptidos termolábiles de gran tamaño > 10 kDa. Esta clase presenta dos subclases, la primera es III.a. péptidos bacteriolíticos catalizan la hidrólisis del péptidoglicano resultado en la lisis y muerte de la célula diana. La segunda subclase es III.b.

péptidos no líticos, estos péptidos presentan diferentes mecanismos como la filtración de la membrana de de pequeñas moléculas, la inhibición de la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) y de la absorción de azúcares (Lagha et al., 2017).

4. Finalmente, la clase IV estos péptidos son de forma circular, modificados después de la traducción y ejercen su acción antibacteriana en la membrana celular. Presentan un enlace covalente en el Nitrógeno y Carbono terminal. Las bacteriocinas de forma circular que se han estudiado hasta la actualidad son sintetizadas por bacterias Gram positivas. Estas bacteriocinas presentan alta resistencia a temperaturas elevadas, pH extremos, proteasas y presentan un gran espectro de actividad (Lagha et al., 2017).

#### **1.2.2.2. Clasificación de péptidos antimicrobianos por su origen de síntesis**

Según, el origen de su síntesis, los péptidos antimicrobianos se pueden clasificar en dos categorías. Los péptidos sintetizados ribosomalmente y los péptidos no sintetizados ribosomalmente.

Los péptidos sintetizados ribosomalmente comprende tres clases. La primera clase, son péptidos pequeños (<10 kDa) producidos ribosomalmente y modificados después de la traducción (RiPPs, de sus siglas en ingles). Esta se puede dividir en siete subclases por las diferencias de modificaciones (Zhao & Kuipers, 2016).

1. Subclase I o también conocidos como lantipéptidos, estos presentan aminoácidos inusuales introducidos en la modificación después de la

traducción por las enzimas involucradas. Los péptidos con actividad antimicrobiana son los llamados lantibióticos (Zhao & Kuipers, 2016).

2. Subclase II o péptidos cíclicos de la cabeza a la cola, presentan una circulación de sus esqueletos péptidos con enlaces directos en los aminoácidos terminales N y C obteniendo como resultados una estructura bidimensional. Estos péptidos no contienen aminoácidos inusuales introducidos en la modificación después de la traducción, lo que los distingue de la subclase I (Zhao & Kuipers, 2016).
3. Subclase III o actipéptidos, estos forman péptidos antimicrobianos cíclicos por enlaces de azufre con carbono, los cuales son catalizados por enzimas. Los enlaces generados después de la traducción de un tiol al carbono  $\alpha$ , es el responsable de su actividad antimicrobiana, estas modificaciones no se encuentran en péptidos sintetizados ribosomalmente (Zhao & Kuipers, 2016).
4. Subclase IV o llamados Péptidos lineales por su estructura, estos que contienen azol. Forman un importante subgrupo de péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados después de la traducción, presentan un anillo heterocíclico. En los que podemos encontrar, la microcina B17 de *Escherichia coli* y la Estreptolisis S producida por LAB (Zhao & Kuipers, 2016).
5. Subclase V o Liopéptidos, son conocidos como péptidos tiazolílicos, están altamente modificados mediante un ensamblaje no ribosómico o ribosómico (Zhao & Kuipers, 2016).
6. Subclase VI o Glicocinas, son bacteriocinas con residuos glicosilados. Existen diversos glicopéptidos putativos únicos y diversos que

contienen bacteriocinas llamadas glicocinas en *Firmicutes* (Zhao & Kuipers, 2016).

7. Subclase VIII o Péptidos del lazo, su estructura está compuesta por un anillo de macrolactama. El cual se forma por la unión entre N-terminal y la cola de un C-terminal, formando una estructura de lazo única o llamado nudo lariat. El anillo está formado por un enlace isopeptídico entre el grupo  $\alpha$ -amino N-terminal y la cadena lateral de ácido carboxílico (Zhao & Kuipers, 2016).

La segunda clase o clase II, son bacteriocinas sin modificación después de la traducción los cuales incluyen péptidos lineales activos con membrana pequeños (<10 kDa), sintetizados ribosomalmente y con estabilidad a altas temperaturas. Esta clase se puede dividir en Péptidos similares a la pediocina con una actividad antimicrobiana contra listeria y péptidos no modificados (Zhao & Kuipers, 2016).

La tercera clase o clase III, son proteínas antimicrobianas de tamaño grande superior a 10 kDa. Estas proteínas presentan actividad antimicrobiana contra bacterias. Los genes que sintetizan estas proteínas están relacionadas al gen de inmunidad y estructural.

Los péptidos antimicrobianos sintetizados no ribosomalmente (NPR, de sus siglas en ingles) y los policétidos (PKs), son generados por enzimas complejas. Estas enzimas son conocidas con el nombre de sintetasa peptídicas no ribosómicas (NRPS) y policétidas sintetisas (PKS). Estos péptidos antimicrobianos pueden presentar estructuras diferentes, lineales, cíclicas y ramificadas (Zhao & Kuipers, 2016).

En los NPR presentan los Lipopéptidos (LP) y no Lipopéptidos(NLP). Los lipopéptidos son compuestos naturales de origen bacteriano que consisten en una cadena alquílica larga hidrófoba unida a un polipéptido hidrófilo para formar una estructura lineal o cíclica. Los NLP son péptidos sin característica lipídica y sintetizados no ribosomalmente, algunas de estas bacteriocinas demostraron ser un inhibidor de la biosíntesis de la pared celular de bacterias Gram positivas (Zhao & Kuipers, 2016).

Los policétidos son un grupo de metabolitos secundarios, presentando una diversidad en su estructura y en su actividad antimicrobiana. Se sabe que los productos naturales de policétidos poseen una gran cantidad de actividades antimicrobianas, antifúngicas, antiparasitarias, antitumorales (Zhao & Kuipers, 2016).

### **1.2.3. Bacteria *Paenibacillus thiaminolyticus* cepa 165**

Las bacterias que pertenecen al género *Paenibacillus* se puede desarrollar en diferentes ambientes. Estos microorganismos han sido encontrados en diferentes regiones del planeta, lugares fríos como los polos y calurosos en zonas tropicales. La bacteria *Paenibacillus thiaminolyticus*, presenta morfología de bacilos Gram positivos alargados aerobios. En condiciones de estrés forman endósporas como mecanismo de defensa (Fernández, Hidalgo, & Badilla, 2005; Grady, MacDonald, Liu, Richman, & Yuan, 2016).

*Paenibacillus* sp. presenta características y aplicaciones en diferentes áreas como: la medicina, industria alimentaria y agricultura. En la agricultura ayudan con la fijación de Nitrógeno, solubilización del fosfato y biocontrol de plantaciones (Grady et al., 2016). Algunos géneros pueden colonizar raíces de diferentes

plantas y llegar a tener relaciones simbióticas, promoviendo el crecimiento de las plantas. Muchas especies de *Paenibacillus* producen enzimas que han generado resultados favorables en biorremediación (Grady et al., 2016).

Algunas especies de *Paenibacillus* producen compuestos antimicrobianos frente a otros microorganismos patógenos como bacterias y hongos. Los compuestos antimicrobianos producidos por estas especies incluyen compuestos orgánicos volátiles, enzimas y péptidos. Estos presentan gran potencial en el uso para biocontrol y pueden ser aplicables en medicina y seguridad alimentaria por su potencial antimicrobiano (Baindara et al., 2016; Grady et al., 2016).

Otra característica de algunas cepas de *Paenibacillus* es la síntesis de bacteriocinas y el uso como control biológico, medicina y la industria alimentaria. Los péptidos antimicrobianos producidos pueden ser obtenidos y purificados *in vitro* (Huang & Yousef, 2014a). Se conoce que algunas especies de *Paenibacillus* sintetizan al menos dos bacteriocinas, que son pediocinas y lantibióticos. Las pediocinas son estructuras de péptidos lineales. Los lantibióticos se sintetizan ribosomalmente durante la fase exponencial y hasta la fase estacionaria del crecimiento bacteriano (Baindara et al., 2016; Huang & Yousef, 2014b). En los últimos años se han descubierto lipopéptidos sintetizados no ribosomalmente por algunas especies de *Paenibacillus*. Estos péptidos presentan actividad antimicrobiana, contra patógenos Gram positivos, Gram negativos y algunos hongos (Huang, Gou, & Yousef, 2012; Zhao & Kuipers, 2016).

La detección y purificación de bacteriocinas aún no está muy estudiada, una de las etapas con mayor limitación es la purificación de dichos compuestos. En la actualidad se busca aplicar métodos rápidos y eficientes. Los métodos más

aplicados utilizan la característica catiónica e hidrófoba de las bacteriocinas para usar el intercambio de cationes. Las técnicas más usadas son la cromatografía de intercambio catiónico, con eluciones de NaCl a diferentes concentraciones y la cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa con una columna específica dependiendo la clase de bacteriocina a purificar.

#### **1.2.4. Purificación de péptidos antimicrobianos**

Dentro los procesos biotecnológicos usados para poder purificar bacteriocinas están la electroforesis (SDS-PAGE) y las técnicas cromatografías (Parada et al., 2007). SDS-PAGE es una técnica muy usada para la separación de proteínas. Esta técnica depende según la movilidad y separación de moléculas en un campo eléctrico a través de una matriz como el gel de acrilamida. La movilidad de la proteína depende del peso molecular y longitud de la cadena polipeptídica después de ser recuperados de con precipitados con sulfato amonio de extractos proteicos (Abriouel et al., 2003; Vuyst & Vancanneyt, 2007). Las técnicas cromatografías presentan un alto potencial por las características de separación, alta versatilidad y dinámica. Esta técnica permite separar una mezcla de diferentes moléculas o analitos, basada en la velocidad de desplazamiento diferencial de estos. Las moléculas son arrastradas por una fase móvil a través de un lecho cromatográfico que presenta una fase estacionaria.

Las técnicas cromatografías se pueden denominar dependiendo de la naturaleza de las fases móviles y estacionarias. En varias investigaciones son la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y la cromatografía de intercambio iónico (Parada et al., 2007). La cromatografía iónica depende de las características de la matriz y el potencial isoeléctrico de los analitos con la aplicación de sales (Berjeaud & Cenatiempo, 2011). La purificación final del

compuesto activo se realiza mediante HPLC, captando las moléculas activas dependiendo de la afinidad de las columnas, lo cual facilita la separación dependiendo la volatilidad, solubilidad y adsorción de la proteína de interés. (Baindara et al., 2016).

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

Realizar la purificación parcial del compuesto proteico antimicrobiano producido por la bacteria *Paenibacillus thiaminolyticus* 165 en condiciones *in vitro*.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar macroscópica y microscópicamente la bacteria *Paenibacillus thiaminolyticus* 165
- Determinar la actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células de la bacteria *Paenibacillus thiaminolyticus* 165 frente a *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus spp.* y *klebsiella spp.*
- Identificar el tiempo donde se produce la mayor producción de bacteriocina por *Paenibacillus thiaminolyticus* 165 en condiciones *in vitro*.
- Purificar parcialmente el compuesto antimicrobiano producido por *Paenibacillus thiaminolyticus* 165 en condiciones *in vitro*.
- Evaluar el compuesto antimicrobiano purificado parcialmente producido por *Paenibacillus thiaminolyticus* 165, en condiciones *in vitro*.

### **3. Materiales y métodos**

Para el desarrollo del presente trabajo, se dividió el mismo en varias fases como se describe a continuación. Los medios de cultivo usados fueron Tryptone Soy Broth (TSB, por sus siglas en el inglés) y Tryptone Soy Agar (TSA, por sus siglas en el inglés), se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante (PanReac AppliChem, 2019).

#### **3.1. Caracterización macroscópica y microscópica *Paenibacillus thiaminolyticus* 165**

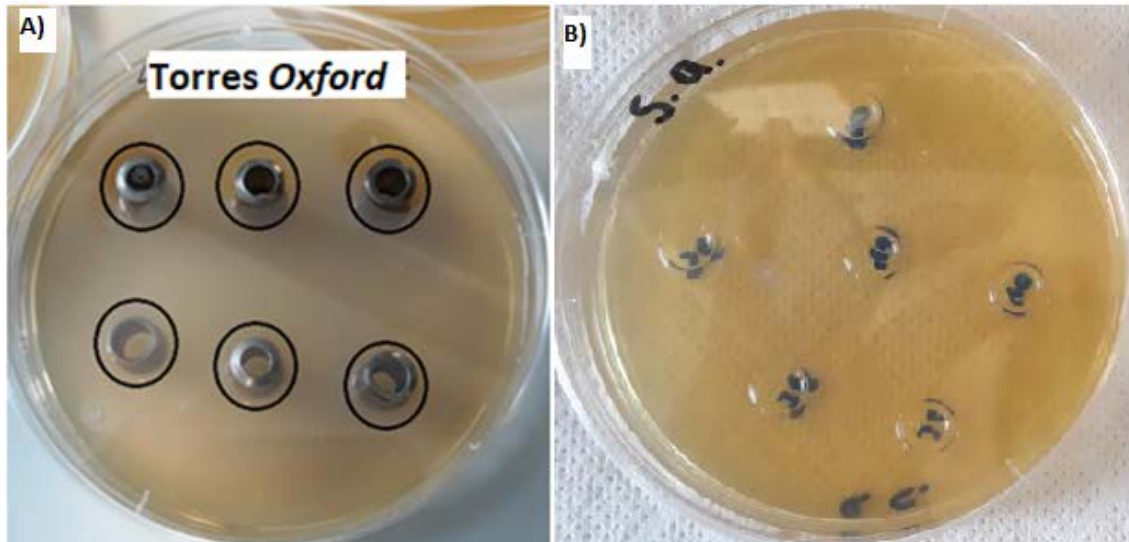
En primer lugar, se repicó la cepa de *P. thiaminolyticus* 165 conservada en glicerol a -80° C, en 1 mL de TSB, luego se incubó a 30° C durante 48 horas. Luego se sembró en agar TSA por agotamiento. Las placas se incubaron a 30° C durante 48h. Posteriormente se prosiguió a realizar una tinción de Gram de una UFC, para eso se realizó un frotis en una porta objetos con una gota de agua y se fijó en llama. A continuación, se colocó Cristal Violeta, se dejó reposar durante tres minutos y se lavó con abundante agua destilada. Luego, se colocó una dilución de Lugol durante dos minutos y se lavó con abundante agua destilada. Se prosiguió a realizar la decoloración con Etanol al 98%, durante 20 segundos y se lavó con agua destilada. Después, se añadió el colorante de contraste con solución de safranina, enjuagándose posteriormente con agua destilada, se dejó secar a temperatura ambiente durante 2 minutos y a continuación se observó al microscopio.

Se estudiaron las condiciones óptimas de temperatura y pH (ácido o básico) para la bacteria *P. thiaminolyticus* 165, donde se inoculó en 2 mL de caldo TSB

(pH 7.1) y se prosiguió a incubar a temperatura de 8, 30, 37 y 45° C durante 24 horas. Posteriormente se inoculo la bacteria a 30° C por 24 horas en TSB a pH: 2, 4, 7, 8, 10 y 12.

### **3.2. Determinación de la actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células de la bacteria *Paenibacillus thiaminolyticus* 165**

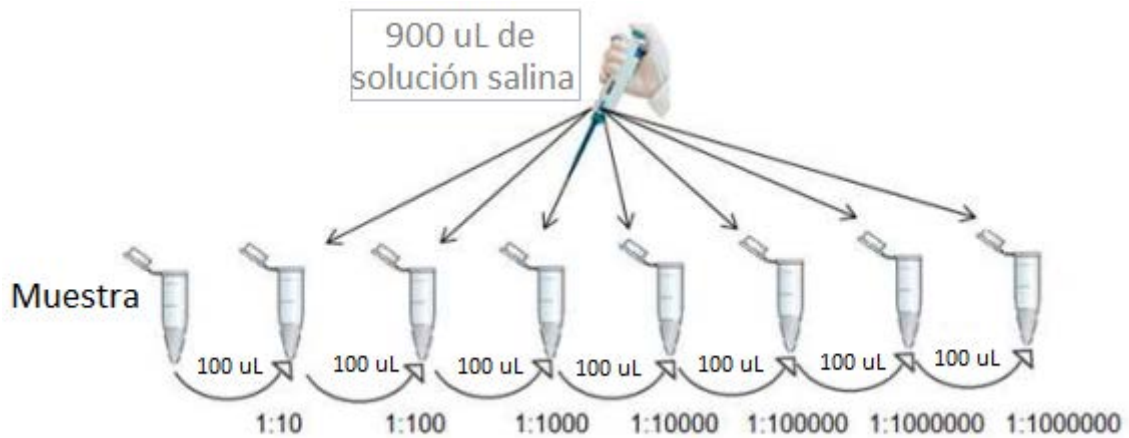
Se repicó una colonia de un cultivo puro de *Paenibacillus thiaminolyticus* en agar TSA en caldo TSB (pH 7,1). Se incubó a 30° C durante 2 días sin agitación. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se recolectó el sobrenadante en tubo nuevo estéril y se conservó a 4 °C hasta su uso posterior. Para este método se colocaron en la parte superior de la placa de agar BHA-T los pocillos de acero *Oxford* de 8 mm de diametro en condiciones estériles. Luego se agregó 100 uL de un cultivo indicador (*Escherichia coli*) a 10 mL BHA-T (tubos de ensayo en estado líquido) atemperados a 55 °C. Luego se homogenizó y se agregó en las placas de Petri con agar BHA-T con los pocillos colocados. Se dejó solidificar a temperatura ambiente por 20 minutos y se prosiguió a retirar los pocillos (**Imagen 1**). En los huecos realizados por los pocillos se colocaron 100 uL del sobrenadante libre de células (SLC) obtenido en el apartado anterior. Las placas se incubaron a 37° C durante 18 horas. Este procedimiento se repitió con las cepas indicadoras *Salmonella* sp, *Staphylococcus aureus* sp, *Listeria monocytogenes*, *Proteus* sp. y *Klebsiella* sp.



**Imagen 1.** Placas con el medio de cultivo de agar BHA-T con **A)** pocillos de acero Oxford y **B)** con el sobrenadante libre de células en los pocillos.

### 3.3. Cinética del crecimiento de *Paenibacillus thiaminolyticus* 165

Se repicó una colonia de un cultivo puro de *Paenibacillus thiaminolyticus* 165 en TSA. Luego se incubó a 30° C durante 24h. Posteriormente se agregaron 2 mL del cultivo en 10 ml de TSB (pH 7,1) y se incubó en las mismas condiciones. Luego se agregaron 10 mL del inóculo en 200 mL de TSB (pH 7,1) y se incubó a 30° C durante 58h. Durante el transcurso de la incubación se tomaron muestras en el tiempo (0, 2, 4, 6, 8,10, 12, 16 20, 24, 27, 30, 36, 46, 48, 56 y 58 horas). A todas las muestras se les determinó el recuento de células viables, densidad óptica, pH y actividad bacteriocina. Para el recuento de células viables las muestras fueron diluidas en NaCl al 0.85% (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000, 1:10000000) (**Imagen 2**). Posterior se realizó siembra en superficie bajo condiciones estériles por duplicado de cada uno de las diluciones en medio de cultivo TSA y se incubó durante 48 horas a 30° C.



**Imagen2.** Esquema de dilución serial en NaCl al 0.85%. de muestras para el recuento en placa de células viables.

Posteriormente a cada una de las muestras, se tomó 2 mL con lo cual se prosiguió a la medición de la densidad óptica (600 nm), usando el espectrofotómetro SmartSPEC-Plus de la casa comercial BIO-RAD. Después se midió el pH a cada una de las muestras con pH-BASIC 20 de la casa comercial CRISON. Para poder conocer el tiempo y la concentración del péptido antimicrobiano producido en el transcurso del crecimiento poblacional de *P. thiaminolyticus* 165, se dispensó cada una de las muestras recolectadas en el apartado anterior (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 27, 30, 36, 46, 48, 56 y 58 horas) en tubos eppendorff (1mL por tubo) y se centrifugaron a 13000 rpm por 5 minutos. Se recolectaron SLC en tubo nuevo y estéril. Luego los sobrenadantes libres de células fueron evaluados mediante el método de difusión en agar BHA-T, tal como se describió en el apartado anterior. Se usó como bacterias indicadoras *E. coli* y *S. aureus*.

### **3.4. Purificación de la bacteriocina por cromatografía de intercambio iónico**

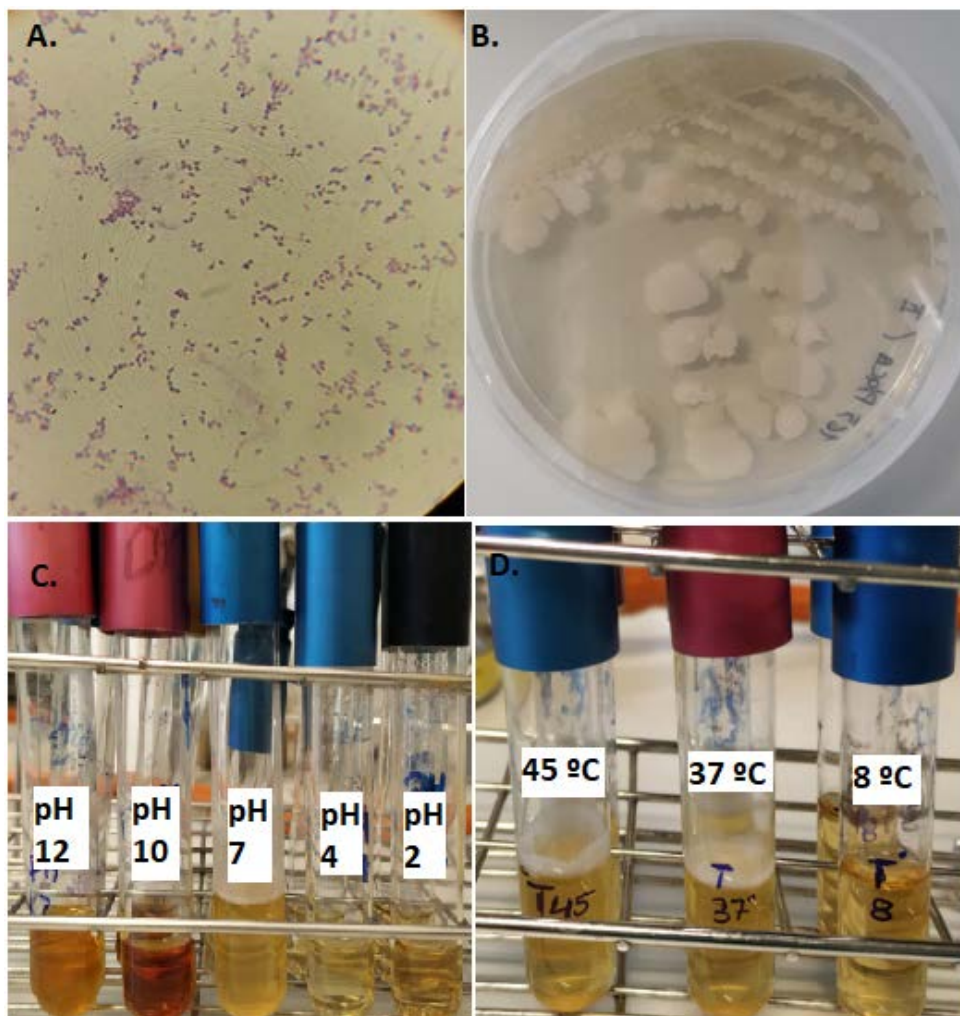
Inicialmente, se realizó una inoculación de 10 mL de *P. thiaminolyticus* 165 en 100 mL de medio TSB, para ser incubado durante 24 horas a 30° C. Posterior a la incubación, se tomó 2 mL y se obtuvo SLC (control de la producción de bacteriocina). Después se ajustó el pH del cultivo a 6.5 con NaOH 10 N. A continuación, se mezcló la matriz CM Sephadex C-25 (Gel Healthcare Bio-Sciences AB) con el cultivo y se prosiguió a incubar en agitación a 37° C, 150 rpm, durante 45 minutos. Posteriormente se decantó el cultivo por 30 minutos. Luego a medida que se fue descartando el sobrenadante, se recolectó una fracción (Sb) de 10 mL. Posteriormente el gel se trasladó a la columna de vidrio de 10 x50 cm. A continuación, se retiró el precipitado y se recolectó una fracción (Pt) de 10 mL. Seguido se lavó con dos volúmenes de 10 mL de agua desionizada (Milli Q) y se tomaron dos fracciones (Lv) de 10 mL. Luego se prosiguió a eluir con dos volúmenes de 10 mL de NaCl a 0.5 M, tomándose dos fracciones de 10 mL. Posteriormente se lavó con 18 volúmenes de 10 mL de NaCl a 1.5 M., para eluir la bacteriocina absorbida, se tomaron 18 fracciones de 10 mL. Posteriormente se evaluó la actividad antimicrobiana de las fracciones recolectadas mediante el método de difusión en pocillos, descrito anteriormente. Se usó como bacterias indicadoras *E. coli* y *S. aureus*.

## **4. Resultado y discusión**

### **4.1. Caracterización de *Paenibacillus thiaminolyticus* 165**

La bacteria *P. thiaminolyticus* 165 presenta tinción Gram positiva, colonias en forma de bastón alargado con un diámetro aproximado de 4 mm de diámetro. En medio de Agar TSA crece formando colonias planas, rugosas con borde rizoide y a temperaturas bajas la bacteria forma endosporas (**Imagen 3**). La bacteria

crece en un rango de temperatura desde los 25 a 45° C y solo a pH cercano a 6.5 - 8 y con un óptimo próximo a 7 (**Tabla 2**). Según Alippi y Reynaldi (2006) *P. thiaminolyticus*, son bacterias Gram positiva, generadoras de esporas, cuya temperatura es 30° C en medio TSA o TSB. Por otro lado Bartel L. et al.,(2019) describe una temperatura de 37° C para el crecimiento de otras especies de *Paenibacillus sp.* en medios MYPG (Caldo de Mueller-Hinton, extracto de levadura, fosfato de potasio, glucosa y piruvato agar) con pH neutro.



**Imagen 3.** Características macroscópicas y microscópicas de *P. Thiaminolyticus* 165. **(A.)** Tinción de Gram. **(B.)**, crecimiento en medio Agar TSB a 30 °C. **(C)** crecimiento en el gradiente de pH **(D)** y temperatura.

**Tabla 2.** Crecimiento de *P. Thiaminolyticus* 165 en medio TSB a diferentes rangos de temperaturas y pH.

Rango de Temperatura				Rango de pH				
8° C	30° C	37° C	45° C	2	4	7	10	12
-	+++	+++	++	-	-	+++	-	-

(-) No existe crecimiento.  
 (+) Poco crecimiento.  
 (++) Buen crecimiento.  
 (+++) Excelente crecimiento.

#### 4.2. Determinación de la actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células de la bacteria *Paenibacillus thiaminolyticus* 165

La presencia de metabolitos con características antimicrobianas producidos por *P. thiaminolyticus* cepa 165 se obtienen después de la incubación a 30 °C durante 24 horas en medio de cultivo comercial TSB. El sobrenadante libre de células de *P. thiaminolyticus* 165 presentó inhibición del crecimiento de patógenos Gram positivas y Gram negativas (**tabla 3**). Bartel et al., (2019) determinaron que *P. thiaminolyticus* presentó actividad antimicrobiana contra *P. larvae* y *Ascosphaera apis*, causantes de las enfermedades conocidas como Loque americano y Larva Yesificada respectivamente en abejas de miel. Por otro lado Huang et al. (2012) describió que la actividad antimicrobiana de *Paenibacillus* sp. frente a *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* entérica serovar *Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *S. aureus* con resistencia a meticilina.

**Tabla 3.** Actividad antimicrobiana generada del sobrenadante libre de células de *P. thiaminolyticus* 165 contra patógenos Gram positivos y Gram negativos.

Bacterias Patógenas	Diámetro inhibición (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> CETC	16
<i>Listeria monocytogenes</i> CETC	15
<i>Proteus</i> spp.	0
<i>Salmonella</i> spp CETC	15
<i>Klebsiella</i> spp	14
<i>Escherichia coli</i>	13

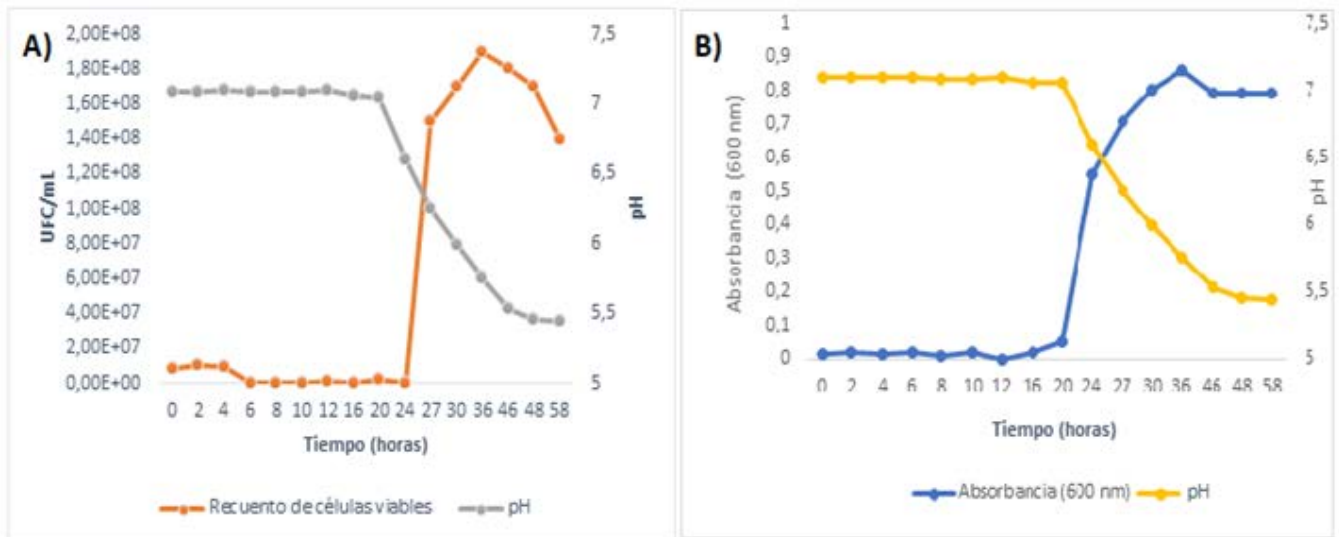
### 4.3. Cinética del crecimiento de *Paenibacillus thiaminolyticus* 165

En la cinética de crecimiento *in vitro* de *P. thiaminolyticus* 165, la fase de latencia (*lag*) se mantuvo dentro de las 24 horas de incubación. Esto se confirmó con los valores de absorbancia, antes de las 24 horas ligeramente se encuentra constante. Esto se debe al proceso de adaptación que sufre el microorganismo en las nuevas condiciones. Pasada las 24 horas empezó la fase exponencial o logarítmica (*log*), la cual alcanzó la máxima concentración de células viables a las 36 horas, con un recuento de  $1,9 \times 10^8$  UFC/mL (**Imagen 4**). Estos datos tienen concordancia con los valores de absorbancia (600 nm) presentando un comportamiento exponencial (**Tabla 4**). Estos resultados concuerdan por lo descrito por Fernández et. al., (2005), que observaron que el crecimiento de *P. lentimorbus*, permanece constante las primeras 24 horas de incubación y transcurrido 62 horas alcanza la máxima concentración celular, la cual fue de  $1,1 \times 10^8$  UFC/mL. Por otro lado, Luthy et. al., (1970) y su grupo de investigación reportaron 24 horas de fase de latencia de *Paenibacillus* sp., la máxima concentración de células viables la obtuvieron a los 4 días con una concentración de  $2 \times 10^8$  UFC/mL.

**Tabla 4.** Cinética del crecimiento *in vitro* de *P. thiaminolyticus* 165 en medio TSB

Tiempo (h)	Recuento de células viables	Absorbancia (600 nm)	pH
0	$8,48 \times 10^6$	0,017	7,09
2	$1,00 \times 10^7$	0,02	7,09
4	$8,97 \times 10^6$	0,016	7,1
6	$9,00 \times 10^4$	0,018	7,09
8	$8,90 \times 10^4$	0,011	7,08
10	$8,10 \times 10^4$	0,019	7,08
12	$6,45 \times 10^5$	0,001	7,10
16	$8,50 \times 10^4$	0,018	7,06
20	$2,47 \times 10^6$	0,05	7,05
24	$5,50 \times 10^5$	0,551	6,6

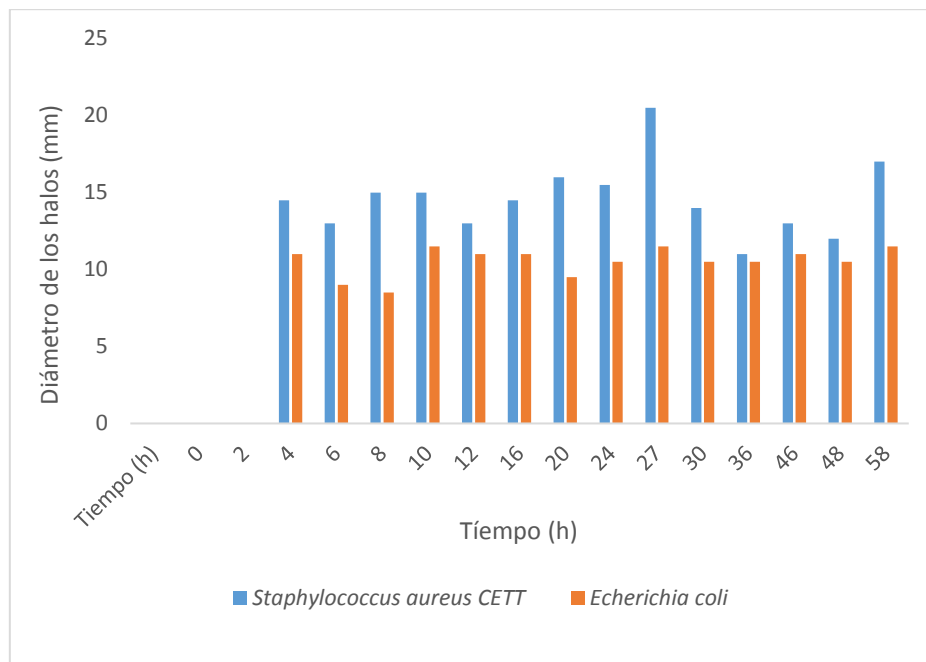
27	$1,50 \times 10^8$	0,709	6,25
30	$1,70 \times 10^8$	0,8	5,99
36	$1,90 \times 10^8$	0,86	5,76
46	$1,80 \times 10^8$	0,79	5,54
48	$1,70 \times 10^8$	0,79	5,46
58	$1,40 \times 10^8$	0,79	5,44



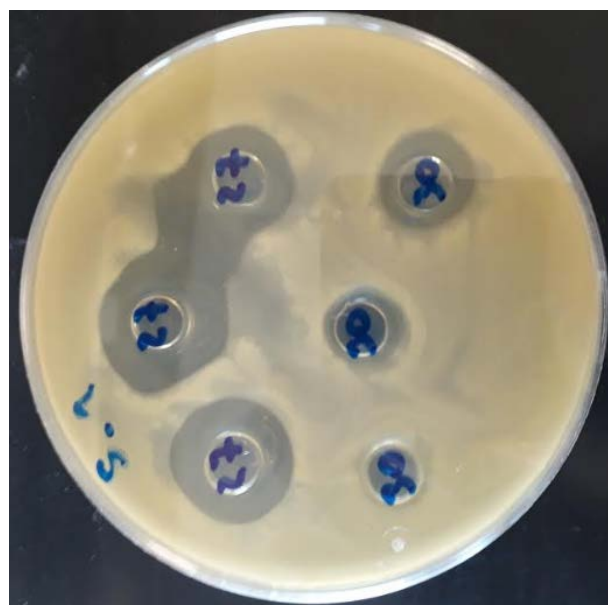
**Imagen 4.** Cinética del crecimiento de *P. thiaminolyticus* 165, **(A)** Recuento de células viables y del pH **(B)** Medición de la Absorbancia a 600 nm y del pH.

La obtención de SLC con actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (Gram-positivo) y *E. coli* (Gram-negativa) se detectó a las 4 horas después de la incubación y continúa hasta las 58 horas **(Imagen 5)**. En las 27 horas se detectaron los diámetros con mayor tamaño de 20,5 mm para *S. aureus* y 11,5 mm *E. coli*. Estudios realizados por Gou Y. et al., (2012) la actividad antimicrobiana se observó después de 4 días de incubación, contra *Pseudomonas putida*, *Clostridium difficile*, y *Staphylococcus aureus*, No obstante, en investigaciones realizadas de *Paenibacillus* sp. la actividad antimicrobiana se presentó a las 72 horas contra *A. apis*, *Paenibacillus* sp. contra *E. coli*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* y *S. aureus* (Alippi & Reynaldi,

2006; Bartel et al., 2019; Huang et al., 2012). Según lo descrito por Nilsen T., et. al.(1998), existe una correlación directa entre el número de bacterias y la producción de péptidos antimicrobianos en el medio.



**Imagen 5.** Diámetro (mm) de la actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positiva y Gram negativa del sobrenadante libre de células durante 58 horas de *P. thiaminolyticus* 165.



**Imagen 6.** Halos de inhibición de la actividad antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus* del sobrenadante libre de células a las 27 y 30 horas de *P. thiaminolyticus* 165.

#### 4.4. Purificación de la bacteriocina por cromatografía de intercambio iónico

La purificación realizada con la cromatografía de intercambio iónico utilizando la matriz CM 25 (**Imagen 6**), se realizó a las 24 horas con un pH de 6,5. SLC presento actividad antimicrobiana, indicando que existió la presencia de compuestos con la capacidad inhibir el crecimiento antimicrobiano. En las fracciones de la cromatografía de intercambio iónico solo Sb presentó actividad antimicrobiana frente a las bacterias indicadoras (**Tabla 5**), a diferencia de las fracciones de Pt, Lv, NaCl a 0.5 M y NaCl a 1.5 M que no presentaron actividad antimicrobiana contra las bacterias control (**Tabla 5**). Según lo descrito por Abriouel et al., (2003) la recuperación de la bacteriocina AS-48 producida por *Enterococcus faecalis* A-48-32, basándose en la adsorción de la bacteriocina en cromatografía de intercambio iónico con la matriz CM-25 carboximetil Sephadex y eluciones a diferentes concentraciones de NaCl. Huang y Yousef (2014) establece que la mayoría de péptidos antimicrobianos presentan cargas catiónicas a pH neutro y con propiedades anfílipicas. Estas características se ajustan con los requerimientos para el uso de cromatografía de intercambio iónico que aprovecha la carga molecular, pH 7 y con característica hidrofilia de la molécula para poder realizar las eluciones en NaCl a diferentes concentraciones. *Paenibacillus* sp. puede producir lipopéptidos antimicrobianos (Bartel et al., 2019), la característica de estos pueden ser catiónica o no catiónica hidrofóbicos, por su estructura lipídica, pueden presentar actividad contra bacterias y hongos por la estructura molecular de las proteínas (Grady et al., 2016; Huang & Yousef, 2014b), lo que concuerda con lo que la técnica de cromatografía de intercambio iónico no se logró captar fracciones con actividad antimicrobiana en las eluciones con NaCl, pero si en el Sn, ya que la características lipídica y no catiónica de la proteína evito la captura por la matriz CM 25. La técnica con mayor eficacia para purificar péptidos antimicrobianos es cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) por su versatilidad de la técnica (Abriouel, Franz, Omar, & Galvez, 2011; Abriouel et al., 2003; Baidara et al., 2016; Huang & Yousef, 2014a).



**Imagen 6.** Purificación de la bacteriocina mediante la cromatografía de intercambio iónico con la matriz CM Sephadex C-25

**Tabla 5.** Actividad antimicrobiana de las fracciones de la bacteriocina obtenidas por cromatografía de intercambio iónico.

<b>Fracción</b>	<b>Diámetro de inhibición contra <i>E. coli</i> (mm)</b>	<b>Diámetro de inhibición contra <i>S. aureus</i> (mm)</b>
SLC (control)	12	15
Sb	13	14
Pt	0	0
Lv	0	0
NaCl a 0.5 M	0	0
NaCl a 1.5 M	0	0

SLC: Sobrenadante libre de célula.

Sb: Sobrenadante de la cromatografía.

Pt: Precipitado de la cromatografía

Lv: Lavado con Agua Milli Q

## 5. Conclusiones

En el transcurso de la investigación se concluyó que de la bacteria *P. thiaminolyticus* 165 es una bacteria Gram positiva, presenta forma de bastón y generadora de esporas. En medio solido crece en forma rugosa y bordes rizoides. La bacteria es sensible a cambios bruscos de temperatura y tiende a esporular. Las condiciones óptimas para la mayor producción de péptidos antimicrobianos en medio TSB es un pH 7,1 a temperatura 30° C durante 27 horas. El péptido antimicrobiano producido es activo frente a bacterias gram positivas y gram negativas como *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Klebsiella spp.* La técnica de intercambio iónico no es la indicada para los péptidos antimicrobianos generados por *P. thiaminolyticus* 165, posiblemente por su naturaleza protéica o por la conformación de la molécula. Podríamos continuar investigando sobre nuevas vías de purificación como la utilización de HPLC.

## 6. Referencias

- Abriouel, H., Franz, C., Omar, N. Ben, & Galvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1), 201–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- Abriouel, H., Valdivia, E., Marti, M., Maqueda, M., & Ga, A. (2003). A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* sub. *liquefaciens* A-48-32, 55, 599–605. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00202-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00202-1)
- Alippi, A. M., & Reynaldi, F. J. (2006). Inhibition of the growth of *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources. *Journal of Invertebrate Pathology*, 91(3), 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.12.002>
- Baindara, P., Chaudhry, V., Mittal, G., Liao, M., Matos, C. O., Khatri, N., & Franco, O. L. (2016). Characterization of the Antimicrobial Peptide Penisin , a Class Ia. *Antimicrob Agents Chemoter*, 60(1), 580–591. <https://doi.org/10.1128/AAC.01813-15>.Address
- Baltzer, S. A., & Brown, M. H. (2011). Antimicrobial peptides promising alternatives to conventional antibiotics. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 20(4), 228–235. <https://doi.org/10.1159/000331009>
- Bartel, L. C., Abrahamovich, E., Mori, C., López, A. C., & Alippi, A. M. (2019). *Bacillus* and *Brevibacillus* strains as potential antagonists of *Paenibacillus* larvae and *Ascosphaera apis*. *Journal of Apicultural Research*, 58(1), 117–132. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1495439>
- Berjeaud, J., & Cenatiempo, Y. (2011). Purification of Antilisterial Bacteriocins, 268(4).
- Beshkova, D., & Frengova, G. (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 419–432. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100127>
- Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., Dicks, L. M. T., Sciences, B., ... Africa, S. (2019). Functions and emerging applications of bacteriocins, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.011>.Functions
- Fernández, G., Hidalgo, E., & Badilla, F. (2005). Reproducción y esporulación in vitro de

- la bacteria *Paenibacillus (Bacillus) lentimorbus* para el control de larvas de *Phyllophaga eleanans*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 75, 38–42.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Omar, N. Ben. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation, 120, 51–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001>
- Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., & Yuan, Z. C. (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: A review. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7>
- Huang, E., Gou, Y., & Yousef, A. (2012). Draft Genome Sequence of *Paenibacillus* sp . Strain OSY-SE , a Bacterium Producing the Novel Broad-Spectrum Lipopeptide, 194(22), 6306. <https://doi.org/10.1128/JB.01506-12>
- Huang, E., & Yousef, A. E. (2014a). *Paenibacterin*, a novel broad-spectrum lipopeptide antibiotic, neutralises endotoxins and promotes survival in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa*-induced sepsis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(1), 74–77. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.02.018>
- Huang, E., & Yousef, A. E. (2014b). The Lipopeptide Antibiotic *Paenibacterin* Binds to the Bacterial Outer Membrane and Exerts Bactericidal Activity through Cytoplasmic, 80(9), 2700–2704. <https://doi.org/10.1128/AEM.03775-13>
- Lagha, A. Ben, Haas, B., Gottschalk, M., & Grenier, D. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Veterinary Research*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0425-6>
- López-malo, E. P. A. (2012). Bacteriocinas : antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos, 2, 64–78.
- Lucera, A., Costa, C., Conte, A., & Nobile, M. A. Del. (2012). Food applications of natural antimicrobial compounds, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00287>
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins : <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>
- MONTVILLE, T. J., & KAISER, A. L. (2014). *Antimicrobial Proteins: Classification, Nomenclature, Diversity, and Relationship to Bacteriocins. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. ACADEMIC PRESS, INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-355510-6.50009-9>

- Nilsen, T., Nes, I. F., & Holo, H. (1998). An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. *Journal of Bacteriology*, *180*(7), 1848–1854.
- Parada, J. L., Caron, C. R., Bianchi, A., Medeiros, P., & Soccol, C. R. (2007). BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *50*(3), 521–542. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/babt/v50n3/18.pdf>
- Paul Ross, R., Morgan, S., & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: Past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, *79*(1–2), 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00174-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00174-5)
- Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria ( LAB ): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, *13*(Suppl 1), S3. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S3>
- Vuyst, L. De, & Vancanneyt, M. (2007). Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria, *24*, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.005>
- Zhao, X., & Kuipers, O. P. (2016). Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. *BMC Genomics*, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3224-y>