



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos  
PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE  
LA REPUBLICA (PROPAC)

**“POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LOS COMPUESTOS PRODUCIDOS POR  
BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DE ALIMENTOS MEXICANOS”.**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Presenta:  
**CLAUDIA ALVARADO OSUNA**

Dirigido por:  
**DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ**  
SINODALES

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ  
Presidente

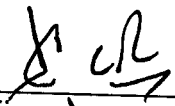
M. C. BLANCA GARCÍA ALMENDÁREZ  
Secretario

DRA. EVA MARÍA SANTOS LÓPEZ  
Vocal

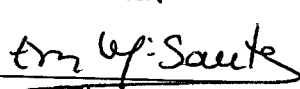
DRA. MONTSERRAT HERNÁNDEZ ITURRIAGA  
Suplente

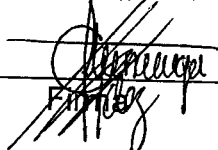
DR. SCOTT E. MARTIN  
Suplente

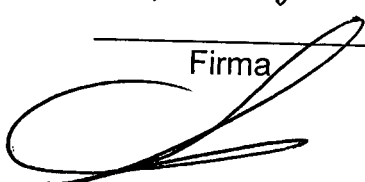
M.C. GUSTAVO PEDRAZA ABOYTES  
Director de la Facultad de Química

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

DR. SERGIO QUESADA ALDANA  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Santiago de Querétaro, Qro.  
Noviembre, 2003  
México

No. Adq. H68476

No. Título \_\_\_\_\_

Clas TS

664.028

A4720

Handwritten note

## RESÚMEN

México tiene una gran diversidad de alimentos tradicionales, algunos de los cuales presentan etapas de fermentación y semi-fermentación, en donde es posible encontrar bacterias ácido lácticas (BAL). Algunas BAL son productoras de compuestos antimicrobianos de tipo proteico denominadas bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos sintetizados a nivel ribosomal capaces de inhibir el crecimiento de otras bacterias Gram positivas. Los compuestos antimicrobianos de tipo proteico tienen un gran potencial de utilización como bioconservadores. En el presente trabajo se aisló una cepa de LAB a partir de un queso panela mexicano de manufactura artesanal, el cual produce un compuesto de tipo bacteriocina que fue denominado QP11. Este compuesto mostró actividad antibacteriana contra *L. monocytogenes*, *St. aureus* y *P. acidilactici*. Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar las características correspondientes al espectro antibacteriano así como su comportamiento frente a diferentes factores ambientales. El espectro anti-*Listeria monocytogenes* fue ensayado con 8 diferentes cepas con el método de difusión en agar. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizó evaluando el crecimiento en caldo de un inóculo inicial de  $10^4$ - $10^5$  ufc/ml, en diferentes concentraciones de QP11. El efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana se llevó a cabo en caldo ajustado a pH 5, 6, 7 y 9 con ac, cítrico, TRIS y NaOH, y adicionando un inóculo inicial de microorganismos. Se encontraron grandes variaciones en cuanto a la susceptibilidad de las cepas de *L. monocytogenes* hacia el compuesto tipo bacteriocina QP11. La cepa *L. monocytogenes* Scott A fue la cepa más resistente con un CMI =1582 UA/ml. La cepa *L. monocytogenes* 7644 fue la cepa más sensible con CMI=11.5 UA/ml. QP11 mostró el mejor efecto antibacterial entre los pH 5 y 7 con una reducción de 3 a 4 log. A pH de 9 se observó una disminución de solo 2 logaritmos. QP11 mostró tener actividad residual después de tratamientos térmicos de 100° C por 30 min y 121° C por 15 min. La identificación de la cepa QP11 productora del compuesto tipo bacteriocina mediante pruebas bioquímicas, dio como resultado el género *Enterococcus*. De acuerdo a la secuencia del gen 16S rRNA de la cepa QP11, la cepa es *Enterococcus faecium* o *Enterococcus durans*.

**(Palabras clave:** Bacteriocinas, *Enterococcus*, bioconservador, bacterias ácido lácticas).

## ABSTRACT

Mexico has a wide diversity of traditional foods. Some of the Lactic Acid Bacteria (LAB) present in this type of foods may produce proteinaceous compounds named "bacteriocins". We have isolated a LAB strain from Mexican style cheese, identified by biochemical phenotype and 16S rRNA analysis as *Enterococcus faecium* or *durans*. This strain produced a bacteriocin-like substance labeled as BLS-QPI1, that showed antibacterial activity toward the foodborne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Large variations in susceptibility of different strains of *L. monocytogenes* to the BLS-QPI1 compound were found. *L. monocytogenes* Scott A had a minimal inhibitory concentration (MIC)= 1582 AU/ml, while *L. monocytogenes* 7644 was the most sensitive, MIC= 11.5 AU/ml.

The BLS-QPI1 compound affected most drastically the viability of *L. monocytogenes* Scott A, at pH values 5, 6, and 9. The antimicrobial activity of the BLS-QPI1 was completely lost upon treatment with  $\alpha$ -chymotrypsin, indicating its proteinaceous nature. The BLS-QPI1 inhibitory activity was not destroyed by exposure to elevated temperature at pH=5, not even at autoclaving temperatures (121°C, 15 min). The dry BLS-QPI1 retained full activity upon storage at 4°C for four months. The increasing incidence of food-borne infectious diseases and the potential of bacteriocins to be used as food biopreservatives, makes this BLS an interesting compound.

**(Key words:** Bacteriocins, *Enterococcus faecium*, food antimicrobial, lactic acid bacteria)

## DEDICATORIAS

Esta tesis va dedicada de manera muy particular a mis padres, Josefina y Venustiano:

Porque sé que tu enseñanza ha terminado  
pero tú continúas a mi lado,  
porque sé que mi actitud te desafía  
y tú nunca te muestras afectado,  
es que ahora nuestras vidas no concuerdan  
pero tú no pareces preocupado,  
porque siento que mis sueños te estremecen  
y tu aceptas y me miras sin enfado,  
porque en todo el recuento de estos años  
no me alcanza a pagar lo que me has dado.

A mis hijos Ana Isela y Luis Gerardo:

Estos dos diablillos míos  
de emoción me hacen vibrar,  
un día me tienen contenta  
cuando los veo saltar,  
otro en cambio me atormentan  
si los escucho llorar,  
mueven toda mi existencia  
me obligan a despertar,  
cuando me muero ellos logran  
que vuelva a resúctar,  
solo temo se parezcan  
a mi que estoy loca de atar.

A mis hermanos, Ana Gabriela, Eduardo y Héctor.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios, estoy entregando mi trabajo con mi ofrenda.

Al CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA por becarme mediante el contrato 149062.

A la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO mediante la LICENCIATURA EN NUTRICIÓN, F.C.N., por apoyarme con descarga horaria.

Al programa USA/AID-México por apoyar mi estancia estudiantil en la UNIVERSIDAD DE ILLINOIS, Urbana-Champaign, USA. De manera particular a la Dra. Elvira de Mejía y la Dra. Jeffery quienes se encargaron de hacerlo posible.

Al laboratorio Estatal de Salud Pública de Querétaro, SSA, por la donación de cepas bacterianas provenientes de alimentos.

A mi director de Tesis: Dr. Carlos Regalado González, por confiar en mi y aceptarme en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos, PROPAC, UAQ.

A mis sinodales por su tiempo y consejos:

M.C. Blanca García Almendárez

Dra. Eva M. Santos López

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Dr. Scott E. Martin

A mis compañeros de Querétaro, hermanos del camino: Sandra, Miguel, Sergio e Irais.

A mis amigos de la Universidad de Illinois porque nunca tuve un "no" como respuesta: Flavia, Andrew, Meredith, Marco, Miguel y Justin.

Al Dr. Jose Luis Blasco por su asesoría sobre la interpretación de la parte molecular.

Al personal administrativo del PROPAC, quienes siempre tuvieron la mejor de las sonrisas para mi.

## INDICE

Resumen	i
Abstract	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Indice	v
Indice de Cuadros	vii
Indice de Figuras	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 INFECCIONES DE ORIGEN ALIMENTARIO	2
2.2 CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS	3
2.3 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)	5
2.4 ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN NO PROTEICO	
PRODUCIDOS POR BAL	7
2.4.1 Ac. láctico	7
2.4.2 Ac. acético	8
2.4.3 Acetaldehído	10
2.4.4 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	11
2.4.5 Diacetilo	11
2.4.6 Ac. grasos	12
2.4.7 Reuterina	13
2.4.8 Ac. piroglutámico	13
2.5 ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN PROTEICO PRODUCIDOS	
POR BAL: BACTERIOCINAS	15
2.5.1 Clasificación	15
2.5.2 Mecanismo de acción	19
2.6 ALIMENTOS FERMENTADOS MEXICANOS	21
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. OBJETIVOS	26

5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1 Esquema general de la metodología empleada	27
5.2 Aislamiento de cepas BAL a partir de alimentos	28
5.3 Búsqueda de cepas BAL con capacidad antimicrobiana	29
5.4 Preparación del Extracto Libre de Células (ELC)	30
5.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana por difusión en agar	30
5.6 Cinética de producción del antimicrobiano	32
5.7 Determinación de la naturaleza proteica del compuesto	33
5.8 Espectro de actividad anti- <i>Listeria monocytogenes</i>	36
5.9 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	38
5.10 Evaluaciones de estabilidad térmica del antimicrobiano	38
5.11 Evaluaciones de estabilidad a condiciones de almacenamiento	41
5.12 Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana	41
5.13 Identificación de la cepa seleccionada	41
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
6.1 Aislamiento de BAL con actividad antimicrobiana	47
6.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana por difusión en agar	53
6.3 Cinética de producción de QPI1 en cultivo agitado	56
6.4 Determinación de la naturaleza proteica del compuesto	59
6.5 Espectro de actividad anti- <i>Listeria monocytogenes</i> del ELCC QPI1	62
6.6 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a dos cepas de <i>L. monocytogenes</i>	67
6.7 Estabilidad térmica del ELCC QPI1	72
6.8 Estabilidad del ELCC QPI1 a condiciones de almacenamiento	74
6.9 Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana del ELCC QPI1	76
6.10 Identificación de la cepa QPI1	84
7. CONCLUSIONES	93
8. REFERENCIAS	94
9. APÉNDICE	103



## INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación de las Bacteriocinas.	17
2. Lista de bacterias indicadoras y medios de cultivo utilizadas en las pruebas de antagonismo.	31
3. Protocolo para adición de enzimas proteolíticas al compuesto QPI1.	36
4. Características de las cepas utilizadas para el espectro anti- <i>Listeria monocytogenes</i> .	38
5. Protocolo para determinación de CMI de QPI1 empleando como indicador <i>L. monocytogenes</i> 7644.	40
6. Protocolo para determinación de CMI de QPI1 empleando como indicador a <i>L. monocytogenes</i> Scott A.	40
7. Protocolo de tratamientos para la evaluación de resistencia térmica del compuesto QPI1.	41
8. Espectro de actividad antimicrobiano de las cepas BAL aisladas, frente a microorganismos patógenos y deterioradores.	48
9. Evaluación de actividad antimicrobiana de los ELC de cepas BAL utilizando <i>L. monocytogenes</i> Scott A como indicador.	54
10. Espectro de actividad antimicrobiana del ELC de la cepa QPI1.	55
11. Variables medidas durante la cinética de producción del compuesto QPI1.	57
12. Efecto de diferentes enzimas proteolíticas sobre la actividad antimicrobiana del ELLC QPI1.	60

13. Espectro de actividad anti- <i>Listeria monocytogenes</i> del ELCC QPI1.	63
14. Concentración mínima inhibitoria usando <i>L. monocytogenes</i> 7644 como microorganismo indicador.	68
15. Concentración mínima inhibitoria usando <i>L. monocytogenes</i> Scott A como microorganismo indicador.	69
16. Concentración mínima inhibitoria del ELCC QPI1 frente a dos cepas de <i>L. monocytogenes</i> .	70
17. Efecto de tratamientos térmicos sobre la actividad del compuesto QPI1.	73
18. Estabilidad del ELCC QPI1 a condiciones de almacenamiento.	75
19. Efecto del pH sobre la actividad del ELCC QPI1 usando <i>L. monocytogenes</i> Scott A como organismo indicador	77
20. Comparación de actividad antimicrobiana de QPI1 y otras bacteriocinas usando <i>L. monocytogenes</i> como indicador	83
21. Homologías representativas entre el fragmento de la cepa QPI1 y las secuencias depositadas en la base de datos del BLAST	88

## INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Metabolismo heterofermentativo de las BAL.	9
2. Reuterina en equilibrio con sus isoformas.	14
3. Mecanismo de acción de las bacteriocinas.	22
4. Mecanismo de acción de la mersacidina.	22
5. Halos de inhibición causados por cepas BAL aisladas de alimentos frente a microorganismos patógenos.	49
6. Cinética de producción de QPI1 en cultivo agitado.	57
7. Efecto de enzimas proteolíticas sobre la actividad antimicrobiana del ELCC QPI1.	61
8. Comparación de sensibilidad al ELCC QPI1 por el método de difusión en agar.	64
9. Comparación de los halos de inhibición producido por la cepa QPI1 frente 2 cepas de <i>L. monocytogenes</i> .	64
10. Obtención de CMI utilizando como microorganismo indicador <i>L. monocytogenes</i> 7644.	68
11. Gráfica para la obtención de CMI utilizando como indicador a la <i>L. monocytogenes</i> Scott A.	69
12. Efecto del pH 5.0 sobre la actividad antimicrobiana en líquido de ELCC QPI1	79
13. Efecto del pH 6.0 sobre la actividad antimicrobiana en líquido de ELCC QPI1	79
14. Efecto del pH 7.0 sobre la actividad antimicrobiana en líquido de ELCC QPI1	80
15. Efecto del pH 9.0 sobre la actividad antimicrobiana en líquido de ELCC QPI1	80

16. Producto de PCR amplificado a partir de la cepa QPI1.	85
17. Secuencia de nucleotidos del fragmento amplificado de cepa QPI1	86
18. Comparación de la secuencia obtenida para QPI1 contra <i>E. faecium</i> y <i>E. durans</i> reportadas en el BLAST.	90

## 1. INTRODUCCIÓN

Debido a la intensa competencia, las bacterias han tenido que desarrollar mecanismos para asegurar su sobrevivencia en medios con diferentes tipos de microorganismos. En consecuencia, es posible encontrar una gran diversidad de compuestos antimicrobianos de origen microbiano. La producción de compuestos antimicrobianos parece ser un fenómeno bastante común entre las bacterias. Los antimicrobianos incluyen toxinas, enzimas bacteriolíticas, subproductos del metabolismo primario, antibióticos y bacteriocinas (Riley y Wertz, 2002; Van der Goot, 2003). La acción de los antimicrobianos producidos por microorganismos es incrementar las ventajas competitivas de la cepa productora ya sea para invasión de tejidos (*E. coli*, *St. mutans*), o con objeto de mantener la población en un habitat (bacterias lácticas). En la actualidad las bacteriocinas son de gran interés debido a su potencial antimicrobiano en la industria alimenticia y farmacéutica. Los estudios sobre el control biológico de microorganismos patógenos y deterioradores en alimentos utilizando bacterias lácticas se multiplica con rapidez. Las bacterias ácido lácticas (BAL), se han utilizado en la conservación de alimentos desde el año 6000 a 9000 a.C. La incorporación de bacteriocinas como ingrediente bioconservador dentro de alimentos modelo ha mostrado efectividad en el control de flora deterioradora y patógenos (O'Sullivan *et al.*, 2002). El estudio de los compuestos antimicrobianos producidos por BAL permitirá evaluar su potencial de utilización como bioconservadores en el mejoramiento de la calidad e inocuidad de los alimentos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 INFECCIONES DE ORIGEN ALIMENTARIO

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC), reportó un estimado de 76 millones de casos enfermedades de origen alimentario y alrededor de 5,000 muertes, para el año 1997. Los casos confirmados como enfermedades de origen alimentario en los siete centros vigilados por el CDC (1999), fueron 10,717, donde el 15% requirió hospitalización, de los cuales el 89% estaba infectado con cepas pertenecientes al género *Listeria*, (CDC, 1999).

En México la Secretaría de Salud informó que en 2001, el número de nuevos casos de enfermedades infecciosas intestinales que ameritaron consulta médica fue de 2,727,616 solamente superado por las infecciones respiratorias agudas. Sin embargo, solo en pocos casos se identificó el agente causal (SSA, 2002a). A pesar de que la mortalidad por enfermedades infecciosas intestinales se ha reducido en un 88.8% de 1980 a 1998 (SSA, 1999), todavía representa la décimo quinta causa de muerte en México (SSA 2002b). Las bacterias son la causa más frecuente de enfermedades transmitidas por los alimentos. (Giono *et al.* 1994). La industria alimentaria debe ofrecer mejores y diversas formas de garantizar la inocuidad de los alimentos, por lo cual, aún queda mucho por hacer en este aspecto.

Las fuentes de contaminación con microorganismos patógenos en productos de origen animal y vegetal son: aguas de riego, tierra, heces fecales, abono, manipulación humana, equipo de cosecha y/o procesamiento, contenedores de transporte, aire, hielo, empaque inapropiado, temperatura inapropiada y contaminación cruzada (Beuchat y Ryu, 1997).

La contaminación en los alimentos preparados proviene de los ingredientes, de la persona que prepara el alimento o de los utensilios con los que es elaborado. Al margen del tipo, procedencia y transformación de los productos, la contaminación ocurre desde la cosecha y el transporte hasta el almacenamiento y la

manipulación de los ingredientes. La incidencia de microorganismos en los alimentos refleja la calidad sanitaria en el campo, la cosecha y procesamiento (Jay, 2000).

Diversos estudios han evidenciado la deficiente calidad sanitaria de los alimentos que se expenden en las ciudades de México (López *et al.*, 2000, Arvizu *et al.*, 2001). La preferencia de los consumidores por platillos frescos y preparados de manera tradicional, con elaboradas maniobras que incluyen prácticas y utensilios que son reservorio de microorganismos (molcajete, tablas de madera), coadyuvan a la presencia de una gran cantidad de episodios diarreicos y otras enfermedades transmitidas por alimentos (Giono *et al.*, 1994).

Por otra parte los consumidores buscan alimentos naturales, frescos y saludables con mayor frecuencia, esto ante el conocimiento de que muchos conservadores y aditivos químicos ponen en riesgo la salud (Montville y Winkowski, 1997).

Existen diversas medidas que se toman para mantener la inocuidad de alimentos entre las que se encuentra el pH ácido y las bajas temperaturas. El pH de 5.5-6.5 pueden inhibir el crecimiento de muchos microorganismos e incluso comprometer su sobrevivencia, sin embargo no asegura la inocuidad del alimento ya que algunos microorganismos patógenos requieren dosis infectantes muy bajas y la sobrevivencia de algunas células es suficiente para causar enfermedad, como es el caso de los patógenos emergentes (Gibson *et al.*, 1990). Por otro lado las condiciones de refrigeración y congelación pueden ser superadas por microorganismos psicrótrofos como la *L. monocytogenes* (Nguyen y Carlin, 1994). Baste mencionar el retiro voluntario de circulación que Piltrim's Pride realizó de 12.4 millones de kg de pollo y pavo congelado y listo para comer, ante la sospecha de contaminación con *Listeria monocytogenes* entre mayo y octubre de 2002 (<http://www.fsis.usda.gov>).

Como puede apreciarse, los microorganismos han desarrollado mecanismos para crecer en ambientes adversos y cuando éstos son alimentos humanos corresponde a la industria alimentaria buscar alternativas para mejorar la calidad sanitaria de los mismos.

## 2.2 CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS

La conservación de alimentos se refiere a cualquier procesamiento o tratamiento que se aplique para retener las características naturales de los alimentos y prolongar su vida de anaquel (Kyzlink, 1990).

La necesidad del hombre por mantener los alimentos libres de deterioro originó el desarrollo de la conservación de alimentos. Los antropólogos consideran que el hombre conservaba alimentos rutinariamente desde 6000-9000 años a.C. El conocimiento cierto de la conservación de alimentos es más completo después del año 3000 a.C. por los escritos de la cultura sumeria, mesopotámica y asiria a cerca de la producción de vino, cerveza y productos lácteos fermentados. También se sabe que los egipcios consumían queso desde el año 3000 a.C. y los griegos y babilonios consumían embutidos para el año 500-1500 a.C (Dennis *et al.*, 1992).

La fermentación es uno de los métodos de conservación de alimentos más antigua de la historia del hombre. Es una compleja transformación química de sustancias orgánicas por acción catalítica de enzimas producidas por la flora microbiana que tiene impacto tanto en el sabor como en la producción de sustancias antimicrobianas que también alteran al alimento. Los alimentos fermentados autóctonos continúan ofreciendo diversidad de sabores, aromas y texturas que enriquecen la nutrición de las poblaciones (Steinkraus, 1992, 1993).

De manera general los conservadores pueden ser de tres tipos: Antimicrobianos, antioxidantes e inhibidores de oscurecimiento (Branen *et al.*, 1990). El presente trabajo tratará sobre los conservadores de tipo antimicrobiano.

Al empleo de compuestos antimicrobianos de origen natural para incrementar la vida de anaquel y mejorar la inocuidad de los alimentos se le denomina Bioconservación (Ray y Daeschel, 1992). El empleo de bacterias ácido lácticas (BAL) y/o sus productos han dado origen a una gran rama de la bioconservación (Montville y Winkowsky, 1997).

En particular la fermentación por BAL se caracteriza por la acumulación de ácidos orgánicos, etanol, y otras sustancias antimicrobianas de tipo protéico, con la consecuente disminución en el pH del medio y la protección de compuestos



propensos a la oxidación. La fermentación ácido láctica no es un proceso de conservación de alimentos en donde prodomine un solo conservador tal como lo es la fermentación alcohólica. En la fermentación láctica todo el conjunto de sustancias formadas actúan sinérgicamente para conservar los alimentos. Aparte del ácido láctico otros productos secundarios de la fermentación láctica incluye ácido acético (0.3-0.4%), pequeñas cantidades de ácidos fórmico, succínico, propiónico, valérico y caprónico, también se produce etanol, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y bacteriocinas (Kyzlink, 1990).

### 2.3 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)

Las BAL son un grupo de bacterias con características morfológicas, metabólicas y fisiológicas comunes entre sí.

Morfológicamente son cocos o bacilos Gram-positivo, no esporulados, carecen de citocromos, son anaeróbicos, aerotolerantes, ácido tolerantes, el principal producto metabólico resultado de la fermentación de azúcares es el ácido láctico, son quimiorganotrófos. Son catalasa negativo aunque se pueden encontrar en raros casos una pseudo-catalasa. Su capacidad biosintética es limitada y tienen requerimientos nutricionales complejos entre los que se encuentran aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas. Las BAL emplean los carbohidratos fermentables como fuente de energía. Degradan las hexosas a lactato (homofermentadoras) o a otros productos tales como acetato, etanol, CO<sub>2</sub>, formiato y succinato (heterofermentadoras) (Wood y Holzapfel, 1995; Madigan *et al.*, 1999).

Los géneros que se encuentran dentro de las BAL son: *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Wood *et al.*, 1995; Axelsson, 1998).

La fermentación ácido láctica es empleada en todo el mundo para la conservación de un amplio tipo de alimentos: vegetales como el repollo (sauerkraut, kimchi coreano) y el pepino (salmuera), maíz (pozol de México), yogurt de cereal (ogi nigeriano o uji de Kenia), panificación con masas fermentadas (idli y dosa indú,

puto Filipino), leches fermentadas (quesos y yogurts), fermentados de mezclas leche-trigo (Kishk Egipcio, trahanas Griego), sustitutos de carne con proteína de soya (tempeh de Indonesia), salsas y pastas producidas por fermentación de cereales y leguminosas (miso de Japón, salsa de soya China), fermentados de mezclas cereal-pescado-mariscos (balao balao y burong dalag de Filipinas), carnes (salami y chorizo) (Steinkraus, 1992; Ben *et al.*, 2000).

Los antimicrobianos producidos por BAL se utilizan en la industria alimenticia como bioconservadores con capacidad de mantener la frescura de los alimentos e incrementar su vida de anaquel, retardar el crecimiento de bacterias Gram-positivas y algunas Gram-negativas, levaduras y hongos y para retrasar la formación de acidez y gas en algunos alimentos (Cleveland *et al.*, 2001). Actualmente se ofrecen comercialmente diferentes ingredientes elaborados a partir de BAL para mantener la frescura o incrementar la vida de anaquel de una variedad de alimentos (yogurt, queso cottage, pasta, postres lácteos, helados suaves, productos cárnicos), tales como MicroGard™ (Rhodia) que es efectivo contra bacterias Gram-negativas, Gram-positivas, levaduras y algunos hongos (Hoover y Steenson, 1993). Otros ingredientes naturales producidos por fermentación son Alta™, Perlac™ y DuraFresh™ (Quest Internacional), que atacan principalmente bacterias Gram-positivas (Wessels *et al.*, 1998). Sin embargo, en ninguno de ellos se especifica actividad contra microorganismos patógenos, y su uso más bien se encamina a inhibir los microorganismos deterioradores.

Pueden considerarse varias estrategias para la aplicación de antimicrobianos producidos por BAL y dirigidos hacia la conservación de alimentos: inoculación de BAL como cultivo iniciador (producción *in situ*), adición de la bacteriocina pura o semi-pura (nisina), o bien en forma de producto fermentado libre de células como ingrediente en el procesamiento de alimentos (Schillinger *et al.*, 1996). Los alimentos donde se recomienda su empleo, incluyen productos lácteos, aderezos para ensalada, salsas, alimentos listos para su consumo, productos cárnicos y huevo (Cleveland *et al.*, 2001; Wessels *et al.*, 1998).

En 1969 la OMS recomendó el empleo de la nisina una bacteriocina obtenida de BAL como conservador de alimentos. En 1988 el organismo encargado de la regulación de aditivos en los alimentos de los Estados Unidos, la Food and Drug Administration (FDA por sus siglas en inglés) otorgó el status GRAS (generalmente reconocido como seguro) a algunas BAL así como a la nisina. Las legislaciones japonesa (FOSHU) y de la comunidad europea (EU) reconocen desde hace largo tiempo que las BAL son seguras cuando se les emplea dentro de los alimentos con cualquier fin (Feord, 2002).

En México el empleo de nisina así como algunos ácidos orgánicos derivados del metabolismo de las BAL (ac. propiónico) en la conservación de alimentos está permitido (Art. 674, Aditivos para Alimentos, Diario Oficial de la Federación, 18-I-88).

## **2.4 ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN NO PROTEICO PRODUCIDOS POR BAL**

### **2.4.1 Ácido Láctico**

El ácido láctico es el principal producto del metabolismo de los carbohidratos por las bacterias lácticas. Puede producirse en los dos tipos de fermentación: homofermentativo o heterofermentativo. En el metabolismo homofermentativo se fermentan azúcares por la vía glucolítica o de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). La enzima aldolasa escinde la molécula de hexosa (fructosa 1,6 bifosfato) en dos triosas (gliceraldehido 3 fosfato). Posteriormente se produce ácido pirúvico y finalmente ácido láctico como único producto de fermentación. La fermentación homoláctica rinde 2 moles de ácido láctico y una ganancia de 2 ATP por mol de glucosa consumido (Madigan *et al.*, 1998; Axelsson 1998).

Por otra parte en ausencia de aldolasa, las BAL heterofermentadoras emplean la vía del 6 fosfogluconato (figura 1). En ésta se oxida la glucosa a 6-fosfogluconato y descarboxila para obtener una pentosa (ribulosa 5 fosfato) más CO<sub>2</sub>. La enzima fosfocetolasa escinde la molécula en una cetosa (acetil-fosfato) y una triosa

(gliceraldehído-3-fosfato). La cetosa producirá acetaldehído y etanol, mientras que la triosa producirá ácido láctico. La fermentación heteroláctica rinde 1 mol de ácido láctico, etanol y CO<sub>2</sub> más una ganancia de 1 ATP por mol de glucosa consumido (Madigan *et al.*, 2000; Axelsson, 1998).

Durante el crecimiento bacteriano en medios de cultivo complejos, muchos otros compuestos presentes (aminoácidos, ácidos orgánicos), darán lugar a fermentaciones paralelas a la de los azúcares. Por tal motivo se producen muchos otros productos finales tal es el caso del ácido acético. Así mismo la presencia de O<sub>2</sub> tiene efectos en el metabolismo, en éste caso produciendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (Axelsson, 1998).

Las hexosas diferentes de la glucosa tal como manosa, galactosa y fructosa son también fermentadas por algunas BAL así como diversos disacáridos como la lactosa y la sacarosa. Dichos azúcares se incorporan a las vías fermentativas a nivel de glucosa-6-fosfato o fructosa-6-fosfato previa isomerización y fosforilación (Axelsson, 1998).

El ácido láctico tiene un pKa 3.1, muestra acción bacteriostática cerca del pH de 4.5. El ácido láctico alarga el tiempo de generación de *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Proteus spp.*, *Saccharomyces spp.* y *L. monocytogenes*.

#### 2.4.2 Acido acético

La fermentación de pentosas produce un patrón diferente de compuestos finales con respecto a la fermentación de hexosas. Las pentosas son metabolizadas por la vía de 6-fosfogluconato y se incorporan a nivel de la ribulosa 5 fosfato y xilulosa 5 fosfato, (figura 1).

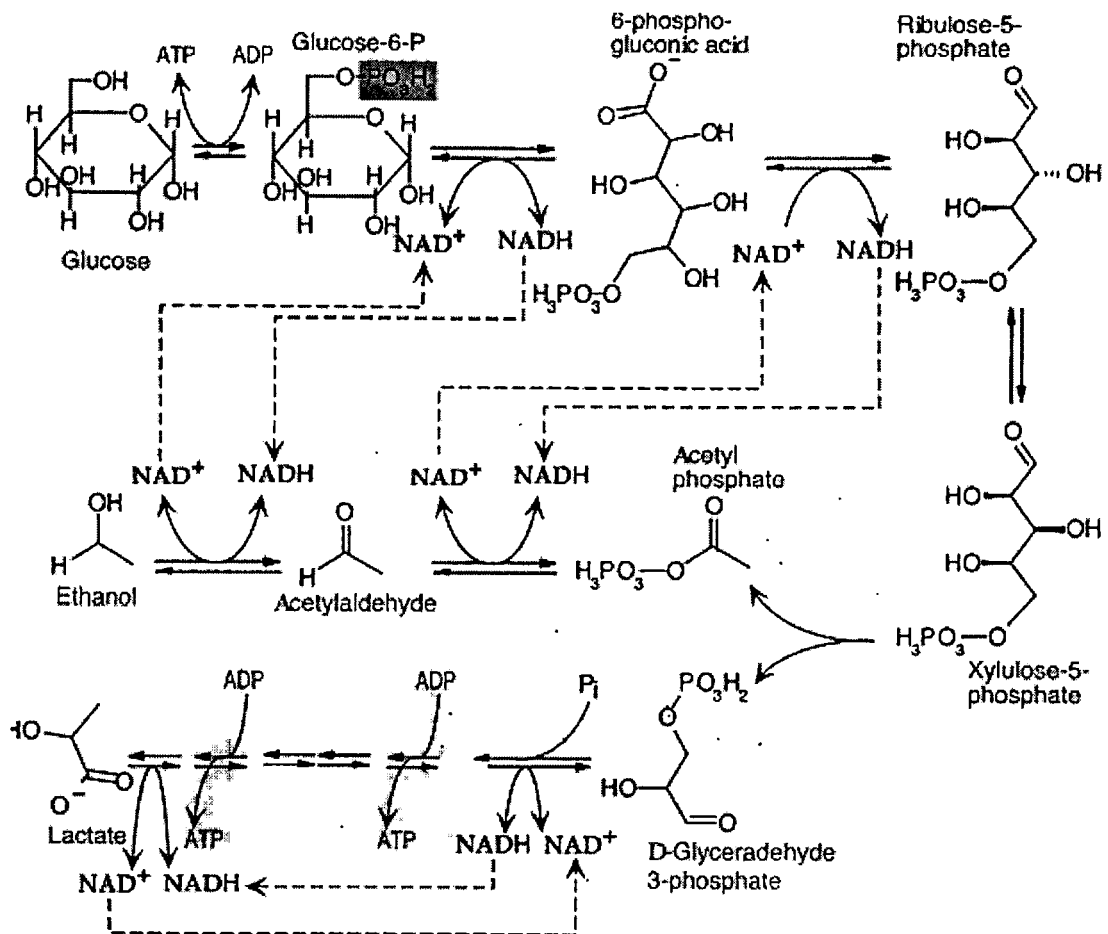


FIGURA 1. Metabolismo heterofermentativo de las BAL. Ruta del 6-fosfogluconato.

En ésta fermentación no se produce CO<sub>2</sub> ya que no es necesario el paso de deshidrogenación. Por otra parte el acetil-fosfato es empleado por la acetatocinasa para la fosforilación a nivel substrato, rindiendo ATP y ácido acético en vez de etanol. La capacidad de las BAL de utilizar pentosas se observa tanto para heterofermentadoras como para homofermentadoras, esto ocurre porque la fosfoacetolasa es inducida por pentosas. La fermentación de pentosas produce cantidades equimolares de ácido láctico y acético (Axelsson, 1998).

El pKa del ácido acético es 4.8, tiene efecto antimicrobiano principalmente contra bacterias, aunque también puede actuar contra levaduras y hongos. Se ha comprobado su efectividad contra *Bacillus spp.*, *St. aureus*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium spp.*, *L. monocytogenes*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium* (Ray y Daeschel, 1992; Cabo *et al.*, 2002).

#### 2.4.3 Acetaldehído

Se ha reportado que cepas de *Lactobacillus delbrueckii* producen acetaldehído por acción de la treonina aldolasa, mismo que se encuentra en el medio en concentraciones de alrededor de 25 ppm. Este compuesto tiene la capacidad de inhibir a microorganismos tales como *St. aureus*, *S. Typhimurium* y *E. coli* en productos lácteos (Yang, 2000).

El ácido pirúvico será transformado a ácido láctico durante la fermentación. Sin embargo la reacción del ácido pirúvico no es consistente, bajo condiciones apropiadas tal como aerobiosis, cantidades variables de acetaldehído pueden ser formadas, en cuyo caso se producirán una gran variedad de productos secundarios. Entre los posibles productos secundarios de la fermentación ácido láctica se encuentran el ácido acético (0.3-0.4%), ácido fórmico, succínico, propiónico, valérico y caproico, CO<sub>2</sub> (Kzlynk, 1990).

#### 2.4.4 Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es producido por numerosas bacterias incluyendo las BAL como mecanismo para eliminar el oxígeno que es sumamente tóxico. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es generado por reacciones tales como la reducción del ion superóxido y las reacciones mediadas por NADH oxidasas y por deshidrogenasas (Daeschel y Penner 1992; Salminen y von Wright, 1998).

El espectro de actividad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es muy amplio e incluye a bacterias Gram positivas y negativas. El efecto antimicrobiano del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resulta de la oxidación de los grupos sulfhidrilos de las proteínas, originando desnaturalización de enzimas esenciales y además peroxidación de los lípidos de la membrana celular. Su actividad ocurre a concentraciones menores de 0.5%. Adicionalmente en leche cruda el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activa al sistema lactoperoxidasa que tiene efecto inhibitorio sobre microorganismos contaminantes.

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un compuesto fuertemente oxidante que tiene diversas aplicaciones en la industria alimenticia incluyendo conservador y antimicrobiano. La (FDA) permite el empleo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en leche (0.05%), almidón (0.15%) y jarabe de maíz (0.15%) entre otros (Daeschel y Penner 1992).

#### 2.4.5 Diacetilo

Es el compuesto 2,3 butanodiona, PM 86.1 g/mol, punto de ebullición 88° C, compuesto volátil, soluble en aceite y agua. Imparte aroma característico deseado a los productos lácteos fermentados. Es producido por algunas especies y cepas de *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* y muchas otras bacterias diferentes a las BAL. Diversos estudios sugieren su aplicación en combinación con CO<sub>2</sub> para evitar el desarrollo de diversos deterioradores en carnes (Williams-Campbell y Jay 2002).

El diacetilo es producido por cepas BAL que fermentan citrato. La mayor producción ocurre en la fase estacionaria. La producción durante la fermentación láctica es de alrededor de 4mg/ml.

Posee propiedades antimicrobianas solo a concentraciones elevadas (500-2500 µg/mL) (Ray y Daeschel, 1992), a concentraciones más bajas (150 µg/mL) se observa efecto bacteriostático. Se ha reportado efecto contra *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica* entre otros. En general las bacterias Gram negativas y los hongos son más susceptibles que las bacterias Gram positivas. A bajas concentraciones no es efectivo ya que numerosos microorganismos deterioradores y patógenos pueden metabolizarlo (Yang, 2000; Ray y Daeschel, 1992).

La actividad antimicrobiana del diacetilo es máxima a un pH menor de 5.0. Por otra parte el pH del medio de crecimiento determina en gran medida la producción de diacetilo. Normalmente alrededor de un pH de 5.5 es cuando ocurre la acumulación de diacetilo. Las pérdidas de diacetilo por evaporación son mayores en cultivos agitados que en no agitados (Ray y Daeschel, 1992).

Dentro de las limitaciones del diacetilo es su baja producción por parte de los microorganismos fermentadores, sin embargo puede actuar sinérgicamente con otros factores antimicrobianos como se ha comprobado con tratamientos de calentamiento (Yang, 2000). Otra desventaja es su sabor intenso que solo permite el empleo en productos lácteos fermentados y finalmente su volatilidad impide utilizarlo en productos que no se almacenarán en refrigeración.

#### 2.4.6 Acidos grasos

Los lactobacilos y lactococos que muestran actividad lipolítica pueden, bajo ciertas condiciones, producir cantidades significativas de ácidos grasos, mismos que muestran actividad antimicrobiana. Adicionalmente ciertas mezclas de ácidos grasos también contribuyen a mejorar las cualidades sensoriales de los alimentos fermentados.

Los ácidos grasos en el rango de 12 a 16 átomos de carbono son los más efectivos y exhiben propiedades detergentes (Wood, 1999).



Los ácidos grasos insaturados son activos contra bacterias Gram positivas. Su actividad antifúngica depende de la longitud de la cadena alifática, de la concentración y del pH del medio. El efecto antimicrobiano de los ácidos grasos ha sido atribuido a la forma no disociada y no al anión, ya que el pH tiene efectos sobre su actividad, con efectos bactericidas más rápidos a bajos pH (Yang, 2000; Kyzlink, 1990).

#### 2.4.7 Reuterina

La reuterina (3-hidroxiopropanal), es un compuesto altamente soluble a pH neutro, PM=74 g/mol. En solución se encuentran en equilibrio las formas monomérica, monomérica hidratada y su dímero cíclico (figura 2). La reuterina es producida durante el crecimiento anaeróbico del *Lactobacillus reuteri* por la acción de la glicerol deshidratasa que cataliza la conversión del glicerol en reuterina.

La reuterina tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y negativas, levaduras, hongos y protozoarios.

Actúa sobre el grupo sulfhidrilo de las enzimas, interfiriendo en la síntesis de DNA mediante la inhibición del enlace del sustrato a la subunidad de la ribonucleótido-reductasa (Salminen y von Wright, 1998; Yang 2000).

#### 2.4.8 Acido piroglutámico

Acido 2 pirrolidón-5-carboxílico (ac. piroglutámico), tiene un pKa de 2.17, PM=129, es estable al calor. Es producido por las bacterias por conversión de glutamina. El ac. piroglutámico está relacionado funcionalmente con los residuos amino-terminales en muchos péptidos y proteínas de importancia biológica.

Se ha observado efecto inhibitorio del ac. piroglutámico en concentraciones de 0.5 a 2% contra *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *Klebsiella* y *Pseudomonas spp.* Las bacterias Gram negativas son más sensibles que las Gram positivas (Yang, 2000).

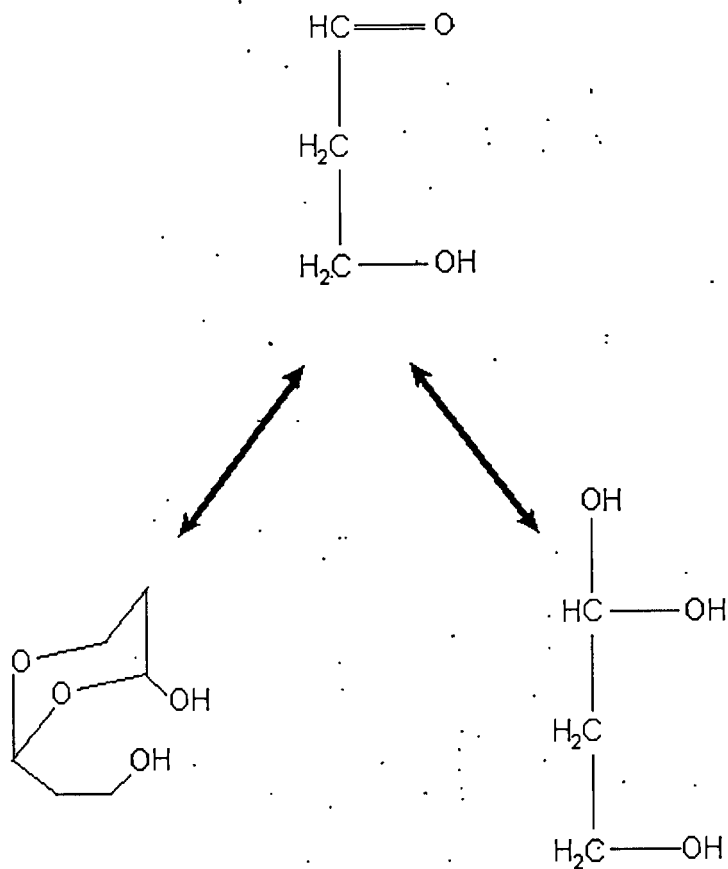


Figura 2. Reuterina en equilibrio con sus isoformas: monomérica, monomérica hidratada y dimero cíclico.

El ác. piroglutámico es efectivo como antimicrobiano a pH entre 1 y 3.5. Al parecer la actividad antimicrobiana del ac. piroglutámico puede ser dependiente de la forma no disociada del ácido. Yang (2000), encontró cepas de *Lactobacillus* y *Pediococcus* que producen ácido piroglutámico.

## 2.5 ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN PROTEICO PRODUCIDOS POR BAL: BACTERIOCINAS

### 2.5.1 Clasificación

Las bacteriocinas son péptidos o proteínas de origen bacteriano con actividad antimicrobiana que son sintetizadas a nivel ribosomal. Muchas bacteriocinas son producidas por bacterias ácido lácticas y dado el carácter GRAS de algunas de estas bacterias, el estudio de las bacteriocinas ha adquirido relevancia en el campo de los bio-conservadores para alimentos (Cleveland *et al.*, 2001).

Las bacteriocinas se han clasificado en base a su estructura primaria como se muestra en el cuadro 1.

- CLASE I: LANTIBIOTICOS.

Estas bacteriocinas son péptidos policíclicos pequeños (<5 kDa) de entre 19 a 50 aminoácidos, estables al calor, cuya principal característica es que contienen aminoácidos con modificaciones postraduccionales. Las modificaciones incluyen la deshidratación de los restos de serina y treonina produciendo dehidroalanina (DHA) y dehidrobutirina (DHB), respectivamente. Con estos aminoácidos se forman los ciclos o anillos de la lantionina (originado con DHA y cys) y  $\beta$ -metilantionina (originado con DHB y cys) (McAuliffe *et al.*, 2001; Twomey *et al.*, 2002).

La presencia del enlace tioeter de los anillos lantionina y  $\beta$ -metilantionina, le proporciona a la molécula estabilidad a la acidez, en contraste con los puentes disulfuro (Hechard y Shall, 2002). La conformación de los anillos es esencial para

mantener la rigidez del péptido, incrementa la resistencia contra enzimas proteolíticas y contra inactivación térmica. (Cintas *et al.*, 2001; McAuliffe *et al.*, 2001).

Los lantibióticos se subclasifican en dos tipos:

TIPO Ia: Moléculas flexibles

Péptidos catiónicos e hidrofóbicos que forman poros en las membranas celulares de los microorganismos blanco. Estas moléculas poseen estructuras más flexibles que las clase Ib. Dentro de esta clasificación se encuentran las siguientes: nisina, subtilisina, epidermina, lacticina 481, lactocina S (Cleveland *et al.*, 2001).

TIPO Ib: Moléculas globulares.

Péptidos globulares sin carga neta. Dentro de esta clasificación se encuentran las siguientes: mersacidina, cinnamicina, duramicina (Cleveland *et al.*, 2001).

- CLASE II: NO LANTIBIÓTICOS

Son péptidos pequeños (<10 kDa) de entre 20 a 60 aminoácidos, catiónicos, hidrofóbicos, estables al calor. (Héchar y Shall, 2002).

CLASE IIa: Familia de la pediocina, su representante es la pediocina PA-1. Tienen una actividad antimicrobiana especialmente fuerte contra *Listeria monocytogenes*. Presentan entre ellas un elevado porcentaje de secuencias conservadas, con 38-80% de aminoácidos en posición similar. El extremo N-terminal de esta clase de péptidos muestra la secuencia consenso YGNGVxC.

Tienen un elevado contenido de restos aminoácidos no polares así como aminoácidos pequeños como la glicina, lo que le confiere a la molécula, un alto grado de libertad conformacional. Otros de sus representantes son: leucocina A, mesentericina Y105, bavaricina A, sakacina P, enterocinas A y P (Cintas *et al.*, 2001; Ennahar *et al.*, 2000).

CUADRO 1. Clasificación de las Bacteriocinas.

*CLASE I. LANTIBIOTICOS*

Tipo Ia: Moléculas flexibles.

Tipo Ib: Moléculas globulares.

*CLASE II. NO LANTIBIOTICOS*

Clase IIa: Familia de la pediocina.

Clase IIb: Bacteriocinas con dos péptidos.

Clase IIc: Bacteriocinas sec-dependientes.

Clase IId: Otras bacteriocinas.

*CLASE III. PROTEÍNAS MAYORES*

CLASE IIb: Bacteriocinas compuestas de 2 péptidos diferentes para tener acción óptima. Si bien se requieren de ambos péptidos para lograr mayor actividad, los péptidos individuales eventualmente presentan actividad antimicrobiana moderada. Ejemplos de éstas son: lactocina 705, lactococcina G, lactacina F y plantaricina S (Cuozzo *et al.*, 2003; Nes y Holo, 2000).

CLASE IIc: Bacteriocinas que contienen una extensión N-terminal denominada tipo sec-dependiente o péptido señal a diferencia de las demás bacteriocinas Clase II que contienen una secuencia líder tipo doble glicina para su secreción. Estas bacteriocinas se adhieren proteolíticamente y se exportan por medio de la vía general de secreción (GSP). Otra característica del péptido señal es que contiene entre 15-30 restos aminoácidos con muy pocas secuencias similares entre sí. Ejemplos de éstas son: acidocina B, divergicina A, bacteriocina 31 y lactococcina 972 (Cintas *et al.*, 2001).

CLASE IIId: Bacteriocinas que no caen en las clasificaciones anteriores, principalmente son péptidos que no presentan secuencias similares ni requieren secuencia líder, ni péptido señal para ser secretadas. Ejemplos son: enterocina L50 y Q (Cintas *et al.*, 2001; Nes y Holo, 2000).

- CLASE III. PROTEÍNAS MAYORES

Bacteriocinas grandes (>30 kDa). A diferencia de las bacteriocinas Clase I y II, estas se inactivan con tratamientos térmicos de entre 60-100° C por 10-15 min. Ejemplos de estas son: helveticina J, lactacina A y B, caseicina 80 (Cintas *et al.*, 2001; Cleveland *et al.*, 2001)

Klaenhammer (1993), propuso una cuarta clase de bacteriocinas que requieren grupos lipídicos y glucosídicos unidos a la fracción proteínica para lograr su actividad biológica. Sin embargo estudios recientes parecen mostrar que las estructuras no proteicas son un artefacto debido a las características catiónicas e

hidrofóbicas que originan la formación de complejos en los extractos crudos (Cleveland *et al.*, 2001; Cintas *et al.*, 2001).

### 2.5.2 Mecanismo de acción

Las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas son péptidos altamente catiónicos a pH 7.0, presentan altos puntos isoeléctricos (8.6-11.3) y cuentan con regiones hidrofóbicas e hidrofílicas. Tanto lantibióticos como no-lantibióticos muestran en su estructura mayor carga positiva a pH menor de 5.0 que a pH 6, por tal motivo la actividad antibacteriana es mejor a pH inferior a 5 que a pH fisiológico. En las moléculas de bacteriocina se observan plegamientos o estructuras secundarias tipo  $\alpha$  hélice y hojas plegadas  $\beta$ . Dichas estructuras son las que le dan funcionalidad como antimicrobiano (Cintas *et al.*, 2001; Jack *et al.*, 1995).

Las bacteriocinas dañan a las bacterias permeabilizando o despolarizando su membrana celular mediante disipación de la fuerza protón motriz (FPM), figura 3.

La FPM tiene la siguiente fórmula:

$$FPM = \Delta\Psi - Z \Delta pH$$

En donde  $\Delta\Psi$  representa el componente eléctrico o potencial de membrana y  $Z \Delta pH$  el componente químico.

Las bacteriocinas pueden interrumpir uno o ambos componentes de la FPM. Como la FPM juega un papel central en la síntesis de ATP, el transporte activo y el movimiento bacteriano, su disipación depleta las concentraciones de ATP intracelular y origina la salida de aminoácidos y iones de la célula como se muestra en la figura 3. El efecto sobre la FPM origina poros en la membrana citoplásmica, salida de los componentes intracelulares y eventualmente la muerte celular (Montville y Chen, 1998; Martínez *et al.*, 2002).

En particular las enterocinas (bacteriocinas producidas por *Enterococcus spp.*) originan pérdida del potencial de membrana:  $\Delta\Psi$ , pero no del componente  $\Delta pH$  (Herranz *et al.*, 2001a, b).

Estudios con mutantes conformacionales han comprobado la importancia del carácter polar en la actividad de las bacteriocinas. Se ha reportado que las

variantes de sakacina P más catiónicas tienen mayor afinidad por las células blanco que las menos catiónicas, demostrando la importancia de las interacciones electrostáticas para la unión al tejido blanco (Kazazic *et al.*, 2002).

Se han propuesto dos mecanismos mediante los cuales la bacteriocina forma poros en la membrana citoplásmica: el modelo de acomodo en forma de tambor y el modelo de cuña. Sin embargo, los aportes realizados por estudios de resonancia magnético nuclear y cristalografía de Rayos-X parecen mostrar que el acomodo en forma de cuña tiene más apoyo (Wiedemann *et al.*, 2001; van Heusden *et al.*, 2002; Zakharov y Kramer, 2002).

Las bacteriocinas no actúan vía receptor específico y su actividad se observa desde un rango micromolar. El efecto que ejercen las bacteriocinas sobre la membrana celular fue elucidado inicialmente en la nisina y posteriormente se confirmó para otras bacteriocinas (Breukink *et al.*, 1999; Wiedemann *et al.*, 2001). La nisina y la epidermina utilizan al transportador lipídico: lípido II como sitio de reconocimiento o blanco para su anclaje a la célula. Este transportador lipídico denominado también bactoprenol, es un alcohol isoprenoide de C<sub>55</sub> que está unido através de un enlace fofodiéster al ácido N-acetilmurámico al que se une un pentapéptido. La función del bactoprenol es transportar al precursor del peptidoglicano desde el citoplasma y a través de la membrana hasta el punto de crecimiento de la pared celular y ensamblarlo. El bactoprenol es también el blanco del antibiótico vancomicina y aunque el mecanismo de acción es diferente, gracias a este hallazgo se logró entender el mecanismo de acción de la nisina (Madigan *et al.*, 1998; Wiedemann *et al.*, 2001).

La nisina tiene una elevada afinidad por el lípido II. Estudios en membranas modelo con diferentes concentraciones de lípido II y otros lípidos, mostraron que existe un notable incremento de la actividad de la nisina cuando las membranas tienen alto contenido de lípido II. La nisina requiere concentraciones de lípido II del orden de 0.001 a 0.1 mol % en la membrana celular bacteriana para poder ejercer acción antimicrobiana. Esto sugiere que la variación en susceptibilidad hacia nisina mostrada por diferentes bacterias puede estar causada bien por las diferencias en concentración de lípido II de las membranas, o bien por diferencias



en la accesibilidad de la nisina por el lípido II (Breukink *et al.*, 1999; van Heusden *et al.*, 2002).

En la actualidad se considera que la actividad total de las bacteriocinas se logra por un mecanismo de acción múltiple que además depende de la concentración en que se encuentre la bacteriocina. Por ejemplo, la nisina y la epidermina en concentraciones nanomolares utilizan el lipido II para su acción, originando formación de un poro y paralelamente bloqueo de la biosíntesis de la pared celular por arresto de su precursor en la membrana. Sin embargo a concentraciones micromolares la nisina es capaz de formar poros sin necesidad de molécula blanco y además puede activar enzimas que producen autólisis de la pared celular. Por su parte la mersacidina y actagardina también utilizan al lipido II para anclarse a la membrana celular, pero su acción se debe al bloqueo de la transglicosilación en la síntesis de peptidoglicano (figura 4) (Hécharde y Sahl, 2002; Weidemann *et al.*, 2001).

## **2.6 ALIMENTOS FERMENTADOS MEXICANOS**

Por acción microbiana es posible enriquecer los alimentos con vitaminas, y aminoácidos esenciales, mejorar su digestibilidad, destruir factores antinutricionales y crear texturas, aromas y sabores agradables, pero también representa una forma de conservación.

México es un país con una gran riqueza alimentaria que incluye la preparación de alimentos fermentados, cuyo arte ha sido transmitido de generación en generación. Actualmente se producen y consumen habitualmente alimentos fermentados de origen prehispánico y mestizo. Entre los productos fermentados de origen indígena se encuentran alimentos no alcohólicos como el pozol, y bebidas alcohólicas como pulque, tepache, colonche, tesguino y blaché. El mestizaje alimentario ha heredado productos tales como yogurt, leches agrias y quesos frescos (Herrera, 1993; Mijares, 1993).

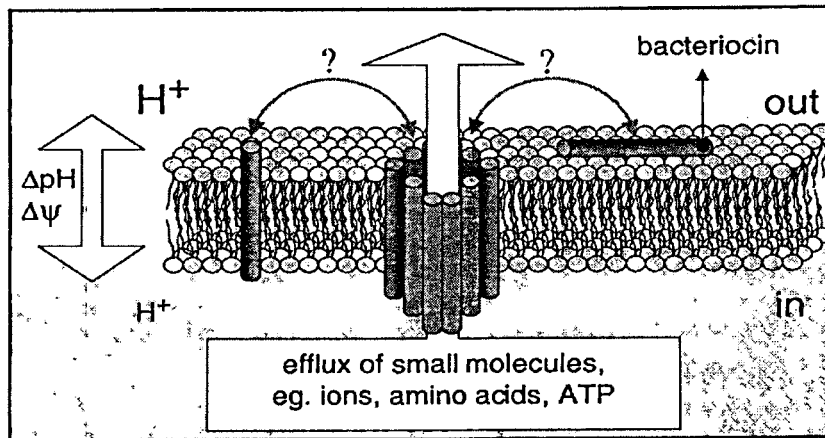


Figura 3. Mecanismo de acción de las bacteriocinas. Disipación de los componentes de la FPM originando permeabilización de la membrana y flujo de iones, moléculas, aminoácidos, etc.

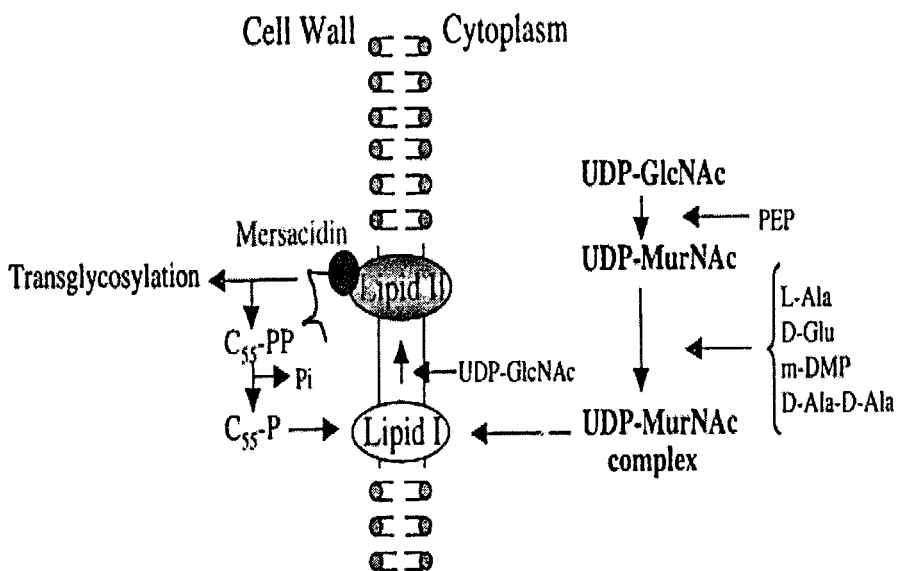


Figura 4. Mecanismo de acción de la mersacidina sobre el lipido II. Bloqueo de la transglicosilación en la pared celular.

El pulque es una bebida alcohólica, blanca y viscosa obtenida de la fermentación de la savia de maguey (género *Agave*). Actualmente es consumida en las zonas rurales del centro y sur de México con relativamente alta frecuencia. Diversos estudios microbiológicos del pulque han reportado la presencia de muy diversa flora microbiana entre la que destaca: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia carsonii*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Torulopsis aguamellis*, *Rhodotorula incarnata*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus major*, *Pediococcus minor*, *Zymomonas mobilis*, *Sarcina corrosa*, *Sarcina flava*, *Bacillus teres*, *Termiobacterium mobile*, *Escherichia sp.*, *Micrococcus candidus*, *Micrococcus roseus*. Se sabe que las especies de *Leuconostoc* son las responsables de la viscosidad de la bebida, los lactobacilos homofermentativos y heterofermentativos son responsables de la producción de ácido láctico y acético, y *Zymomonas mobilis* y *S. cerevisiae* son los productores del alcohol (Lappe *et al.*, 1993; Steinkraus, 1992).

El tesgüino es una cerveza de maíz que elaboran los grupos indígenas del norte, oeste y sur de México. En él se han encontrado diversas especies de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Brettanomyces*, *Pichia*, *Geotrichum* y *Penicillium* (Escamilla *et al.*, 1993).

El pozol es una bebida refrescante que se consume en el sureste de México y que se prepara con maíz nixtamalizado (maíz hervido en agua con cal), posteriormente se envuelve en hojas de plátano y se fermenta entre 8 h y 4 días. Se prepara suspendiendo una bola de masa de nixtamal fermentado en agua y se puede adicionar sal, azúcar, miel, chocolate o chiles secos. En el pozol se han encontrado *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbruekii*, *Bifidobacterium sp.* y *Enterococcus saccharolyticus*, entre los más destacados (Cañas *et al.*, 1993; Omar y Ampe, 2000).

Los tibicos son macrocolonias consistentes en masas compactas y gelatinosas de color amarillento, translúcidas de forma irregular. Están compuestas de una matriz de dextrana insoluble en donde se encuentran embebidas diversas bacterias y levaduras que constituyen una asociación simbiótica. Se utilizan popularmente en México para producción de vinagre o como agua medicinal, mediante la inoculación de los tibicos a agua con piloncillo. Se han encontrado levaduras: *Brettanomyces claussenii*, *Candida guilliermondii*, *Candida valida*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula rubra* y *Saccharomyces cerevisiae*. Dentro de las bacterias aisladas se han encontrado especies de *Bacillus* (*B. brevis*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. macerans*, *B. pumilus*, *B. polymyxa*), *E. aerógenes* y diversas bacterias lácticas homo y heterofermentativas (Rubio *et al.*, 1993).

El estudio de los alimentos fermentados autóctonos mexicanos permitiría conocer sus propiedades para su reevaluación y mejora. El cultivo de bacterias lácticas haría posible mejorar la calidad nutricional de un alimento incrementando niveles de vitaminas y aminoácidos esenciales y por otro incrementar la calidad e higiene de los productos. El conocimiento científico de los procesos de fermentación tradicionales permitiría ofrecer procedimientos más controlados, de mejor calidad y más rentables.

Se cuenta con ejemplos exitosos de alimentos que han sido adaptados y modificados para su producción industrial, tal es el caso del yogurt, originario de los Balcanes y que era consumido solo en pequeñas regiones de Inglaterra. El alimento tradicional se modificó en azúcares y grasas y adicionó con pulpa de frutas, leche en polvo y colorantes y actualmente su consumo se ha extendido a todo el mundo.

Así mismo deben desarrollarse nuevos productos acordes a los cambios en los hábitos alimentarios de la población, que tiendan a incrementar el valor nutritivo y mejoren la salud aprovechando las cualidades de la diversidad microbiana autóctona.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades gastrointestinales son un problema de salud pública a nivel mundial, simplemente en los Estados Unidos se estimó que en 1997 existieron cerca de 76 millones de casos de enfermedades transmitidas por alimentos, resultando en 5000 muertes. En México, la Secretaría de Salud informó que durante el año de 1999 se atendieron 2,727,616 casos de infecciones gastrointestinales, aunque no siempre se identificaron los microorganismos causales. Por otro lado, brotes recientes de patógenos emergentes como *Listeria monocytogenes* y *Aeromonas spp.* así como *Salmonella spp.*, *Clostridium spp.* y *Staphylococcus aureus* han provocado reacciones de la industria, gobierno y público en general con el fin de revisar la eficacia de los métodos actuales de conservación de alimentos.

Paralelamente el empleo de conservadores químicos en los alimentos, ha aumentado la preocupación del consumidor por su salud incrementando la demanda de alimentos más naturales y frescos.

En éste contexto de exigencia de las autoridades por inocuidad y búsqueda de los consumidores de alimentos naturales se propone el presente protocolo que tiene como finalidad estudiar los antimicrobianos producidos por bacterias lácticas aisladas de alimentos tradicionales de la región. Estos compuestos se evaluarán contra patógenos encontrados en alimentos, proporcionados por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Querétaro. También se probarán contra microorganismos patógenos y deterioradores de colección con el fin de determinar su potencial de antagonismo.

## 4. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

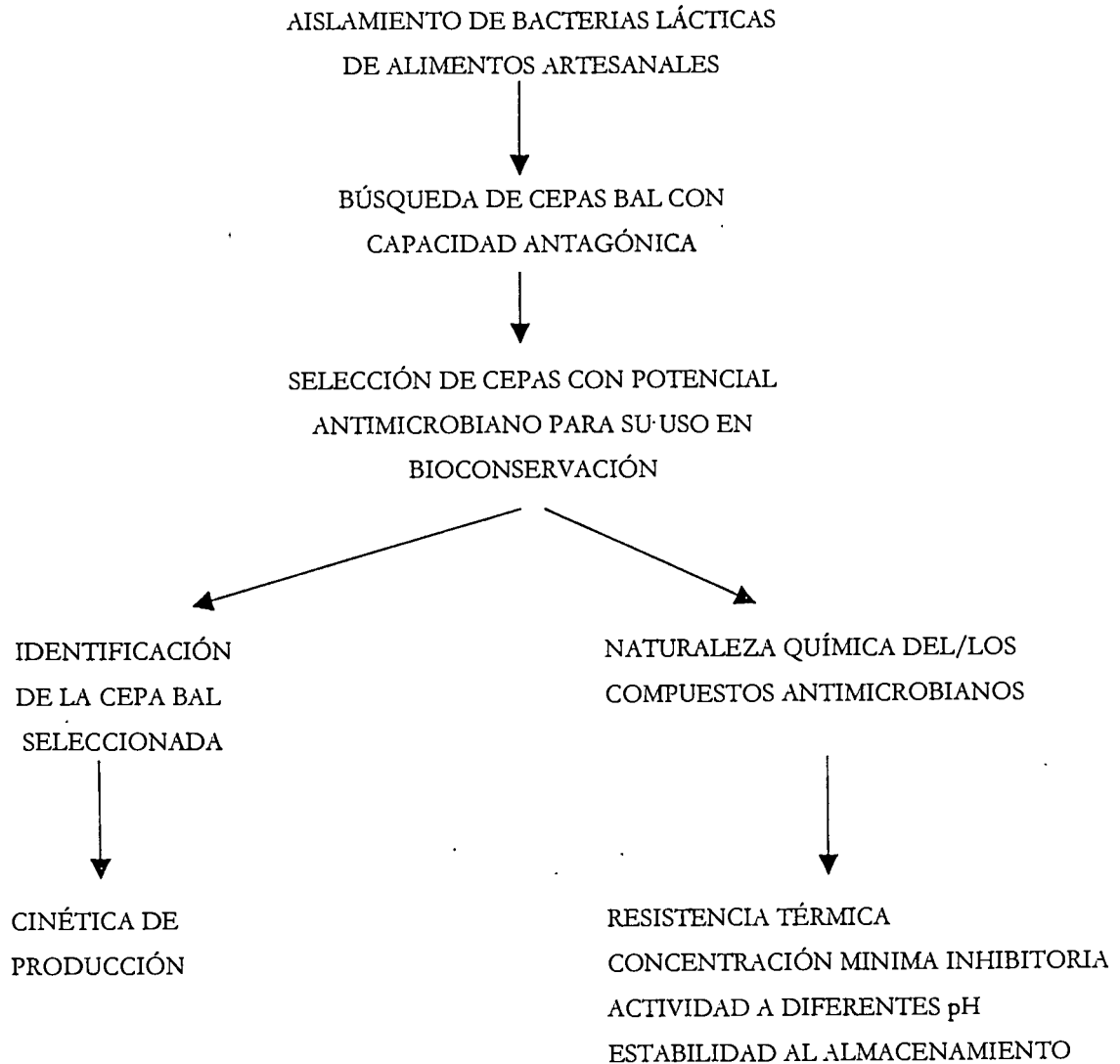
Identificar el potencial antimicrobiano de los compuestos producidos por bacterias lácticas aisladas de alimentos de la región contra microorganismos patógenos, para evaluar su utilización como bioconservadores.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Aislar cepas de BAL a partir de alimentos artesanales mexicanos.
- ✓ Evaluar la capacidad de las BAL aisladas para inhibir microorganismos patógenos y deterioradores proporcionados por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Querétaro, así como cepas de colección.
- ✓ Seleccionar una cepa BAL con potencial de producción de compuestos antimicrobianos y determinar la naturaleza química de los mismos.
- ✓ Conocer la cinética de producción del compuesto antimicrobiano.
- ✓ Determinar la concentración inhibitoria mínima del antimicrobiano contra la cepa más resistente y la más susceptible de un microorganismo patógeno de alimentos.
- ✓ Evaluar el efecto de diferentes condiciones de temperatura y tiempo de almacenamiento así como diferentes pH sobre la actividad del compuesto.
- ✓ Identificar la cepa BAL productora de antimicrobiano seleccionada.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Esquema general de la metodología empleada.



## 5.2 Aislamiento de cepas BAL de alimentos.

Las cepas productoras de compuestos antimicrobianos han sido aisladas a partir de diversos ambientes. Productos lácteos fermentados (Elotmani *et al.*, 2002), productos fermentados de granos (Moreno *et al.*, 2002), frutos, verduras y alimentos crudos (Franz *et al.*, 1996), tejidos de animales (Morovsky *et al.*, 2001), muestras clínicas humanas (Del Campo *et al.*, 2001) y colecciones de microorganismos (Ray y Daeschel, 1992). En el presente estudio se seleccionaron alimentos con pasos de fermentación tales como quesos frescos típicos mexicanos, cesina curada con cítricos, tepache, pulque y curados de tuna por mencionar solo algunos.

El protocolo utilizado se describe a continuación (Ray y Daeschel 1992, Franz *et al.*, 1996, Van den Berg *et al.*, 1993):

1. Se hizo una suspensión del alimento al 10% en NaCl (0.85%, pH=6.5) de la manera siguiente: se pesaron 10 g del alimento y se mezclaron con 90 ml de la solución de NaCl en un frasco de dilución estéril. Cuando el alimento era suave se trituró en cápsula de porcelana estéril, si era de consistencia firme se licuó en vaso estéril para obtener un producto homogéneo.
2. Se prepararon diluciones seriadas del alimento en 0.85% de NaCl, pH=6.5 hasta  $10^{-6}$ .
3. Se sembraron por extensión en superficie, 0.1 ml de las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  en placas de agar De Man Rogosa Sharpe (MRS, Oxoid) adicionados de Pimaricina 10  $\mu\text{g/ml}$  (Sigma, USA).
4. Se incubó a 30° C, durante 48 h en atmósfera de CO<sub>2</sub> mediante jarra de anaerobiosis con GasPack (Becton Dickinson, USA).
5. Al final de la incubación se seleccionó la dilución en donde las colonias estaban aisladas y se numeraron los diferentes tipos coloniales. Se realizó tinción de Gram.
6. Las colonias Gram positivas, catalasa negativo se resembraron para aislamiento en MRS y se cultivaron a 30° C, 24 h.



7. Se verificó pureza del aislamiento por medio de morfología microscópica con tinción de Gram.
8. Se conservaron las cepas mezclando un cultivo de 18 h en caldo MRS a 30° C 1:1 (v/v) con glicerol al 20%(v/v). La mezcla se distribuyó en alícuotas de 2 ml por triplicado, se etiquetó y se almacenó a -70° C (Van den Berg *et al.*, 1993; Franz *et al.*, 1996).
9. Se prepararon cultivos de trabajo sembrando las BAL en MRS semisólido (0.1% de agar) a 30° C por 24 h y manteniéndose en refrigeración hasta por 1 semana.

### **5.3 Búsqueda de cepas BAL con capacidad antimicrobiana.**

El antagonismo directo es una técnica para buscar microorganismos capaces de inhibir el crecimiento de otros. Este consiste en proveer condiciones para el desarrollo simultáneo de la cepa productora y la sensible y representa la forma más simple de realizar pruebas cruzadas. El organismo sensible puede inocularse dentro del agar de cultivo o por estriado sobre la superficie del gel. El organismo productor es aplicado directamente en forma de 1 a 3 µL de cultivo líquido sobre el agar o sobre una superficie que será recubierta con medio (Daeschel, 1992).

- ❖ Antagonismo por el método del botón (Lewus y Montville, 1991; Salminen y Von Wright, 1998).

Se prepararon cajas petri con agar soya tripticasa más extracto de levadura 5% (TSYE). Este medio no contenía glucosa para evitar la sobreproducción de ácido láctico. Se ajustó a pH 6.5. El microorganismo se propagó en caldo MRS a 30° C por 16 hrs. Se ajustó la concentración de BAL midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm y realizando diluciones con peptona 0.1% hasta obtener una absorbancia de 0.8-1.0. Se depositaron sobre el agar TSYE, 2 µl de la suspensión ajustada de BAL y se incubaron anaeróbicamente 24 h a 30° C. La atmósfera de anaerobiosis impide la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Salminen y Von Wright, 1998).

Se prepararon tubos con 9 ml de medio suave (agar 1%) de acuerdo al cuadro 2. Este medio se mantuvo a 40° C y se le adiciona un volumen del cultivo indicador que asegure  $10^5 - 10^6$  ufc/ml. Se sacaron de la incubadora las placas con el cultivo de BAL y se cubren con el agar mezclado con indicador. Se incubaron 18 h a 37° C, a excepción de que el indicador fuera BAL, en cuyo caso fue a 30° C.

Se consideró probable producción de compuestos antimicrobianos mediante la observación de zonas translúcidas alrededor de las colonias de las BAL. Los microorganismos empleados para las pruebas de antagonismo se muestran en el cuadro 2.

Posterior a la evaluación de antagonismo, se seleccionaron aquellas cepas con mayor potencial de producir compuestos antimicrobianos.

#### **5.4 Preparación del Extracto Libre de Células (ELC).**

La producción del extracto libre de células se realizó cultivando las 3 cepas seleccionadas al 2% en caldo MRS, 12 h, en agitación orbital (250 rpm) a 30°C.

El ELC se preparó centrifugando a 10,000 rpm, 15 min a 4° C. El líquido sobrenadante libre de células se esterilizó por filtración con membrana de 0.45µm.

El extracto libre de células concentrado (ELCC) se preparó 5x y 20x.

ELCC 5x se preparó mediante evaporación con evaporador DyNA Vap (Labnet), (Corsetti y col., 1996).

El ELCC 20x se preparó mediante liofilización con el liofilizador Freeze dryer (LABCONCO), (Yang 2000).

#### **5.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana mediante difusión en agar.**

Se prepararon cajas petri con 9 ml de Brain Heart Infusión (BHI) o Agar Soya Triplicasa (TSA) con una concentración final de 1.5% de agar para el medio de soporte (cuadro 2). Se colocó sobre el medio anterior, una sobrecapa de 9 ml del mismo medio con una concentración de agar 0.8%, previamente inoculado con una suspensión del microorganismo indicador equivalente a  $10^6$  ufc/ml.

CUADRO 2. Lista de bacterias indicadoras y medios de cultivo utilizadas en las pruebas de antagonismo.

**INDICADORES PROPORCIONADOS POR EL LABORATORIO ESTATAL DE SALUD PÚBLICA DE QUERÉTARO**

MICROORGANISMOS Gram-positivo	CALDO DE ACTIVACIÓN	MEDIO 1%
<i>Staphylococcus aureus</i> 8943 (leche bronca)	BHI	BHI
<i>Staphylococcus aureus</i> 8855 (queso Oaxaca)	BHI	BHI
<i>Staphylococcus aureus</i> 9993 (queso ranchero)	BHI	BHI
<i>Listeria innocua</i> 10193 (crema lactea)	BHI	BHI

MICROORGANISMOS Gram-negativo	CALDO DE ACTIVACIÓN	MEDIO 1%
<i>Salmonella sp.</i> 02 (carne molida)	BHI	BHI
<i>Enterobacter aerogenes</i> 9476 (pastel envinado)	BHI	BHI
<i>Citrobacter freundii</i> 9473 (queso ranchero)	BHI	BHI
<i>Vibrio cholerae</i> no 01 5921 (pulpo cocido)	BHI	BHI
<i>Vibrio parahemoliticus</i> 10691	BHI	BHI

**INDICADORES PATÓGENOS DE COLECCIÓN (BIOTECNOLOGÍA DIPA)**

	CALDO DE ACTIVACIÓN	MEDIO 1%
<i>Bacillus cereus</i> ATCC11778	BHI	BHI
<i>Escherichia coli</i> EPEC	BHI	BHI
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	BHI	BHI
<i>Listeria monocytogenes</i> G19 (guacamole)*	BHI	BHI

**INDICADOR OFICIAL PARA CUANTIFICAR NISINA**

	CALDO DE ACTIVACIÓN	MEDIO 0.8%
<i>Micrococcus luteus</i> NCIB8166	Assay	Assay

**BACTERIAS LÁCTICAS COMO INDICADOR**

	CALDO DE ACTIVACIÓN	MEDIO 1%
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5T	MRS	TSYE
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> NCDO523	MRS	TSYE
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC8092	MRS	TSYE
<i>Lactococcus lactis</i> NCDO496	MRS	TSYE

DIPA: División de Investigación y Posgrado en Alimentos, UAQ.

ATCC: American Type Culture Collection

NCDO: National Collection of Dairy Organisms.

\* Microorganismo proporcionado por el Laboratorio de Microbiología Sanitaria del PROPAC.

El indicador se seleccionó en base a los resultados de la evaluación de antagonismo y fue *L. innocua* o *L. monocytogenes*. Una vez gelificado, se hicieron fosas en el agar. Se prepararon diluciones seriadas al doble del ELCC, hasta dilución 1:128, diluyendo con H<sub>2</sub>O estéril. Se adicionaron 40 μL a fosas de 4mm o bien 20 μL a fosas de 3 mm, del extracto concentrado y sus diluciones correspondientes. Se dejaron las placas en la campana de flujo laminar para permitir que la preparación se absorbiera en el agar. Se incubaron las placas 18-24 h a 37° C. También se hicieron experimentos sin fosa adicionando sobre la capa de agar suave 10 μL del ELCC.

La actividad antimicrobiana se definió como el recíproco de la más alta dilución que causa una clara zona de inhibición en la capa del microorganismo indicador multiplicada por el factor de dilución. Se expresó en unidades arbitrarias por ml (UA/ml). Los factores utilizados para convertir a UA/ml fueron 25 cuando se adicionaron 40 μL, 50 cuando se adicionaron 20 μL y 100 cuando fueron 10 μL del ELCC o su dilución. Paralelamente se tomó el diámetro de inhibición (Harris *et al.*, 1989, Bhunia *et al.*, 1988).

## **5.6 Cinética de producción del antimicrobiano.**

La producción de compuestos antimicrobianos por las BAL y en particular de bacteriocinas está íntimamente ligado a la composición del medio de cultivo dado que las BAL son bacterias que tienen altos requerimientos nutricionales. Dentro de los nutrientes que más se ha reportado como importantes en la producción de bacteriocinas se encuentran el extracto de levadura, la triptona o tripticaseína, carbohidratos, Tween 80 y sales de Mn. El pH inicial del medio ligeramente ácido (6.5-7.0) juega un papel importante para obtener buenos rendimientos de bacteriocina (Yang y Ray 1994; Nel *et al.*, 2001; García-Almendárez *et al.* 2002; Moreno *et al.*, 2003a).

#### ❖ Obtención del extracto libre de células (ELC).

Se inoculó al microorganismo al 2% en caldo MRS. Se incubó en agitación orbital a 250 rpm, 30°C por 12 hrs. El ELC se preparó centrifugando a 10,000 rpm, 15 min, a 4° C y se esterilizó por filtración con membrana de 0.45 µm.

Se tomaron alícuotas a las 0, 2, 4, 5, 6, 7, 10, 13, 16 y 19 h de cultivo. Se hizo un recuento de bacterias lácticas por la técnica de Miles Misra y se reportó en UFC/ml. Se midió densidad óptica a 600 nm con espectrofotómetro, pH con potenciómetro y actividad antimicrobiana mediante difusión en agar expresada en UA/ml.

El experimento se realizó por duplicado.

#### **5.7 Determinación de la naturaleza proteica del compuesto antimicrobiano.**

Se evaluó la inhibición de la actividad antimicrobiana adicionando por separado cada una de 4 proteasas: tripsina, quimotripsina, pepsina y proteinasa K al ELCC proveniente de la cepa BAL QP11.

##### TRIPSINA EC. 3.4.21.4 (Sigma T8253)

Enzima de tipo proteasa serínica, cataliza la hidrólisis del enlace peptídico entre el grupo carboxilo de la arginina o lisina y el grupo amino de otro aminoácido. El pH de reacción recomendado por el fabricante es de 7.6, con un amplio intervalo de temperatura entre 10° a 75° C.

##### PEPSINA A EC. 3.4.23.1 (Sigma P6887).

Enzima de tipo proteasa aspártica o carboxipeptidasa, cataliza la hidrólisis del enlace peptídico enseguida de los restos aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano. Las condiciones recomendadas por el fabricante para efectuar la reacción son pH 2.5 y 37° C.

#### $\alpha$ -QUIMOTRIPSINA EC. 3.4.21.1 (Sigma C-4129)

Enzima del tipo proteasa serínica que cataliza la hidrólisis de tirosina, fenilalanina, triptófano y leucina. Una hidrólisis secundaria puede ocurrir en el extremo C-terminal de metionina, isoleucina, serina, treonina, valina, histidina, glicina y alanina. El pH de prueba fue 7.8.

#### PROTEINASA K EC. 3.4.21.64 (Sigma P 6556).

Enzima de tipo proteasa serínica, pertenece a la familia de la subtilisina. Se caracteriza porque su sitio catalítico activo está constituido por Asp 39-His 69-Ser 224. El sitio de ataque es el enlace peptídico adyacente al carboxilo de aminoácidos alifáticos o aromáticos con grupos alfa-amino bloqueados. Se recomienda efectuar la reacción a pH de 7.5.

Se evaluó inicialmente la actividad de las enzimas proteolíticas frente a caseína mediante el método de Kunitz con control de calidad tanto de las condiciones de reacción como la actividad de las enzimas (Laskowski, 1955).

#### ❖ Acción de enzimas proteolíticas.

Se mezcló el ELCC con las enzimas proteolíticas en una concentración final de 1 mg/ml (Harris *et al.*, 1989; Franz *et al.*, 1996; Herranz *et al.*, 2001c). Se colocan a pH y temperatura óptima para cada enzima por espacio de 2 h de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Sigma). El protocolo general de adición de enzimas proteolíticas se muestra en el cuadro 3.

Al final de la incubación se ajusta el pH a 6.5 para descartar la acción de los ácidos orgánicos. Se evaluó la actividad antimicrobiana residual por el método de difusión en agar utilizando *L. innocua* como microorganismo indicador.

CUADRO 3. Protocolo para adición de enzimas proteolíticas al ELCC .

	PROBLEMA (muestra)	BLANCO 1 (Control Positivo)	BLANCO 2 (Control Negativo)
AMORTIGUADOR CORRESPONDIENTE (ml)	0.4	0.5	0.4
ENZIMA PROTEOLÍTICA 10X (ml)	0.1	--	0.1
ELCC (ml)	0.5	0.5	--
MRS (ml)	--	--	0.5

## 5.7 Espectro de actividad anti-*Listeria monocytogenes*

Se analizaron patrones de sensibilidad al ELCC proveniente de la cepa BAL QP11 para 8 diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* del laboratorio del Dr. Scott E. Martin del Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, departamento Food Sciences and Human Nutrition, Universidad de Illinois, USA. Las diferencias en la sensibilidad se evaluaron mediante el método de difusión en agar. La sensibilidad de la bacteria fue definida como el recíproco de la más alta dilución del ELCC que causa una clara zona de inhibición en la capa del indicador expresada en UA/ml. Por consiguiente, un valor alto de sensibilidad en UA/ml reflejará en el ensayo un diámetro de inhibición grande en el ELCC sin diluir, o bien una dilución grande del antimicrobiano que todavía logra una visible zona de inhibición (Ennahar *et al.*, 2000a). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Las características de las cepas utilizadas para el espectro de inhibición anti-*Listeria monocytogenes* se muestran en el cuadro 4.

Las cepas de *L. monocytogenes* 19112, 7644 y 15313 fueron obtenidas de la ATCC en Rockville, Maryland; la cepa 10403S y SLCC 5764 fueron donadas por Daniel A. Portnoy de la Universidad de Pennsylvania, Philadelphia; la cepa Scott A fue donada por Larry Beuchat, de la estación experimental de la Universidad de Georgia; la cepa 1370 fue donada por J.T. von Dissel, Departamento de Enfermedades Infecciosas y Medicina General Interna, Hospital Universitario de Leiden, Suecia (Fisher *et al.*, 2000).

La *L. monocytogenes* 10403S tiene la capacidad de producir catalasa y superóxidodismutasa (CA<sup>+</sup>, SOD<sup>+</sup>) y *L. monocytogenes* 1370 no tiene capacidad para producir catalasa (CA<sup>-</sup>, SOD<sup>+</sup>), (Fisher *et al.*, 2000).



CUADRO 4. Características de las cepas utilizadas para el espectro anti-*Listeria monocytogenes*.

CEPA	FUENTE	ORIGEN .
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	Muestra Clinica	Universidad de Georgia
<i>L. monocytogenes</i> 19112	Humano	ATCC
<i>L. monocytogenes</i> 7644	Humano	ATCC
<i>L. monocytogenes</i> LCDC	Alimento	Universidad de Georgia
<i>L. monocytogenes</i> 15313	Conejo	ATCC
<i>L. monocytogenes</i> SLCC 5764	Desconocida	Universidad de Pennsylvania
<i>L. monocytogenes</i> 1370	Desconocida	Suecia
<i>L. monocytogenes</i> 10403S	Raton	Universidad de Pennsylvania

ATCC: American Type Culture Collection

## 5.9 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La determinación de CMI se realizó en caldo soya tripticasa (TSB), para la cepa más sensible (*L. monocytogenes* 7644) y la más resistente (*L. monocytogenes* Scott A). Se prepararon diluciones del ELCC QPI1 en TSB de acuerdo a los esquemas de los cuadros 5 y 6. Se preparó una dilución de *L. monocytogenes* que asegurara un recuento inicial de entre  $10^4$ - $10^5$  UFC/ml. Se incubó las preparaciones a 37° C por 18 h. La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó mediante el recuento de colonias de *L. monocytogenes* viables al finalizar el tiempo de incubación. El recuento de viables se llevó a cabo por el método de extensión en superficie en placas de TSA, previa neutralización del antimicrobiano mediante lavado de células con 10 ml de NaCl 0.85% y centrifugado 15 min a 7000 rpm. Los recuentos se realizaron por duplicado.

La información obtenida de éste experimento se analizó mediante el paquete estadístico Graph Pad software (Inc. San Diego, California). Para obtener la CMI se realizó una regresión no lineal para una curva sigmoideal dosis respuesta.

## 5.9 Evaluación de estabilidad térmica del antimicrobiano

El estudio de la resistencia térmica del antimicrobiano permite hacer inferencias sobre la estabilidad del compuesto a los procesos industriales, así como su potencial de utilización en la industria alimenticia.

Se colocaron 300  $\mu$ L del ELCC reconstituido en microtubos estériles en baño María a la temperatura de prueba. En el caso de 100° C se colocaron a baño de aceite y en caso de 121° C y 15 lb de presión en autoclave. El esquema para tiempos y tratamiento se muestran en el cuadro 7. Al final de cada tiempo se retiró el tubo y se cuantificó la actividad residual utilizando *L. innocua* como microorganismo indicador.

CUADRO 5. Protocolo para determinación de CMI del ELCC QP11 empleando como indicador *L. monocytogenes* 7644.

	<u>CONTROL</u>	<u>40 AU/ml</u>	<u>20 AU/ml</u>	<u>10 AU/ml</u>	<u>5 AU/ml</u>	<u>2.5AU/ml</u>
ELCC QP11 400 UA/ml* (ml)	0.0	0.5 ml	+2.5 ml dilución 40 AU/ml	+2.5 ml dilución 20 AU/ml	+2.5 ml dilución 10 AU/ml	+2.5 ml dilución 5 AU/ml
CST (ml)	2.5	4.5	2.5	2.5	2.5	2.5
<i>L.monocytog</i> 7644 10 <sup>7</sup> UFC/ml	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

\* Actividad antimicrobiana determinada frente a *L. monocytogenes* Scott A

CUADRO 6. Protocolo para determinación de CMI del ELCC QP11 empleando como indicador a *L. monocytogenes* Scott A

	<u>CONTROL</u>	<u>2400</u> <u>AU/ml</u>	<u>1600</u> <u>AU/ml</u>	<u>1200</u> <u>AU/ml</u>	<u>800</u> <u>AU/ml</u>	<u>600</u> <u>AU/ml</u>	<u>400</u> <u>AU/ml</u>	<u>300</u> <u>AU/ml</u>
ELCC QP11 3200 UA/ml*	0.0	1.5	1	1 de dil. 2400	1 de dil. 1600	1 de dil. 1200	1 de dil. 800	1 de dil. 600
CST (ml)	1.0	0.5	1	1	1	1	1	1
<i>L. monocyt</i> Scott A 10 <sup>7</sup> UFC/ml	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

\* Actividad antimicrobiana determinada frente a *L. monocytogenes* Scott A

CUADRO 7. Tratamientos para la evaluación de resistencia térmica del ELCC QPI1.

TEMPERATURA	Tiempo		
	1 min	2 min	3 min
60° C	10	20	30
70° C	5	10	20
80° C	5	10	20
100° C	15	30	---
121° C, 15 lb	15	----	---

### **5.11 Evaluaciones de estabilidad en condiciones de almacenamiento**

Se colocaron 300µL del ELCC QPI1 reconstituido en microtubos estériles. Las temperaturas de almacenamiento fueron 4° C y 20° C. Se cuantificó la actividad residual por medio del método de difusión en agar a los 2, 4, 7, 10, 14, 18 y 25 días, utilizando *L. innocua* como microorganismo indicador.

### **5.12 Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana**

Se prepararon tubos estériles con 1 ml de TSB adicionado de 1580 UA/ml de ELCC QPI1. Se preparó 1 tubo ajustado a cada uno de los pH 5, 6, 7 y 9. El ajuste se realizó con ácido cítrico 1M, Tris 1M y NaOH 1M. Para cada pH se contó con un control al mismo pH sin ELCC. Los tubos se inocularon con un cultivo de 12 h de crecimiento de *L. monocytogenes* que aseguraba  $10^3 - 10^4$  UFC/ml. Se colocaron los tubos problema y control en incubación a 37° C y se removieron 200 µl de caldo a los tiempos 0, 1, 3, 5 y 7 h para determinar recuento de colonias por el método de extensión en superficie.

### **5.13 Identificación de la cepa BAL seleccionada.**

Se realizaron estudios genotípicos y fenotípicos en virtud de que las recomendaciones para la identificación de bacterias lácticas son los enfoques polifásicos (Vandamme *et al.*, 1996; Stiles y Holzapfel, 1997).

Inicialmente se intentó una identificación fenotípica por medio del equipo semiautomatizado BIOLOG. Escencialmente consta de una placa con 96 pozos con diferentes sustratos, se aplica una dilución del cultivo fresco del microorganismo a evaluar y se incuba 24 h en condiciones óptimas. La incubación se llevó a cabo en atmósfera de anaerobiosis. El equipo contiene un lector de placas capacitado para distinguir cuando existe, una reacción de fermentación. Se utilizaron placas GP2 de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El equipo

cuenta con una base de datos que permite identificar el microorganismo basándose en el patrón de fermentación de carbohidratos.

Por otra parte se intentó también la identificación genotípica enviando la cepa al laboratorio MIDI Labs Inc. Delaware, USA. Esta compañía realiza la identificación bacteriana basada en el análisis de la secuencia de las primeras 500 pares de bases del gen que codifica para la subunidad 16S rRNA.

Ante la inespecificidad de los resultados arrojados por la débil fermentación de los substratos en las placas del BIOLOG, y un reporte incompleto enviado por la casa comercial MIDI Labs, quienes no obtuvieron producto de PCR, se decidió realizar más exámenes fenotípicos y genotípicos.

Aparte de la tinción de Gram y prueba de catalasa, se realizaron estudios fenotípicos clásicos de acuerdo a lo sugerido por Schillinger y Lucke, (1987): producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa, tolerancia a 6.5% NaCl, crecimiento a 8° C y 45° C .

#### PRODUCCIÓN DE CO<sub>2</sub> A PARTIR DE GLUCOSA.

Se prepararon tubos de vidrio con caldo MRS conteniendo viales invertidos adentro. Se requiere que el MRS no contenga citrato ni algún otro carbohidrato diferente de glucosa. Una vez inoculados se incuban a 30° C por 2-5 días.

#### TOLERANCIA A 6.5% NaCl.

Se prepararon viales con caldo MRS suplementado con 6.5% de NaCl total. Se inoculan con la bacteria y se incuban a 30° C por 2 a 5 días.

#### CRECIMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS

Se inocularon viales con caldo MRS y se colocan a 45° C y a 8° C por 7 días.

También se realizó la secuenciación del gen que codifica para la subunidad 16S rRNA empleando los iniciadores 1RL y 2RR específicos para el gen 16S rRNA de bacterias lácticas, de acuerdo a lo recomendado por Pu *et al.* (2002). Los oligonucleótidos fueron adquiridos en SIGMA.

Las secuencias de los oligonucleótidos (5' → 3') con una longitud de 19 bases fue la siguiente:

1RL TTTGAGAGTTTGATCCTGG

2RR TCTACGCATTTACCGCTA

### PREPARACIÓN DE LA PLANTILLA

Se toma una colonia fresca de una placa de agar y se dispersa en 10 µl de una solución 0.02% (w/v) de docecil sulfato de sodio (SDS).

### MEZCLA DE REACCIÓN PARA LA AMPLIFICACIÓN

Takara <i>LA Taq</i> <sup>TM</sup> Polymerase	0.5 µl
10x <i>LA Taq</i> buffer (Takara)	5.0 µl
dNTP Mixture (Takara)	8.0 µl
Plantilla	2.0 µl
1RL iniciador (100 ng/µl)	10.0 µl
2RR iniciador (100 ng/µl)	10.0 µl
H <sub>2</sub> O nanopura	<u>13.5 µl</u>
TOTAL	50 µl

### PROGRAMA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para la amplificación por PCR se utilizó el Peltier Thermal Cycler MJ Research DNA (Engine DYZA<sup>TM</sup>).

1. 5 min a 94° C Lisis celular y desnaturalización
2. 30 seg 94° C Desnaturalización inicial
3. 30 seg 50° C Alineamiento
4. 2 min 72° C Elongación
5. Se repitieron del paso 2 a 4 por 30 ciclos.

6. 7 min 72° C Terminación

7. 4° C al terminar el programa

La reacción se llevó a cabo en microtubos de polipropileno de 200 µL.

#### ELECTROFORESIS DEL PRODUCTO DE PCR

Se corre una electroforesis para DNA al producto de amplificación en gel de 1% Agarosa (Amresco<sup>®</sup>).

Se trabajó en una camara para electroforesis Fisher Biottech Mini-Horizontal Unit FB-SB-710 marca Fisher Scientific. Se dejó correr entre 2.5-3 h, a 100mV.

Se tiñió 15 min con bromuro de etidio. Se lavó con H<sub>2</sub>O destilada 15 min.

Se observó en un transiluminador.

#### CLONACIÓN DEL SEGMENTO DEL GEN 16S rRNA AMPLIFICADO

Se utilizó el Kit comercial TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit for sequencing (INVITROGEN) para la secuenciación. Dicho kit utiliza el plasmido pCR 4-TOPO de 3957 pares de bases (pb), para transformar *E. coli*.

Para cada transformación se utiliza un vial de células electrocompetentes y 2 placas de agar Luria Bertani Ampicilina 100 µg/ml (LB-ampi) .

Se preparan 6 µl de la mezcla de clonación por cada transformación en viales en baño de hielo:

Producto fresco de PCR	4 µl
Solución de sal diluida	1 µl
Agua estéril	0.5 µl
TOPO <sup>®</sup> vector	0.5 µl

La mezcla se agita e incuba 5 min a temperatura ambiente (22-23° C).

Se adiciona 2 µl de mezcla de clonación a 50 µl de *E. coli* electrocompetente (TOP10 One Shot<sup>®</sup> Electrocomp<sup>™</sup>) en una celda de 0.2 cm y se mezcla cuidadosamente. Se somete a tres descargas de 2.5 KV (12.5 KV/cm total) por 4-5 milisegundos a 200 ohms de resistencia. Se utilizó un Electroporador Gene-Pulser de Bio Rad.



Se adiciona 250  $\mu$ l de medio SOC y se vierte el contenido dentro de un tubo con tapa. Se deja en incubación con agitación por 1 h a 37° C para permitir la expresión de los genes de resistencia a antibióticos.

Sembrar por extensión 10 a 50  $\mu$ l de cada transformación en 2 placas de agar LB-ampicilina. Incubar a 37° C durante toda la noche.

Una eficiente clonación producirá cientos de colonias. Tomar 10 colonias aisladas, deben seleccionarse colonias sin satélites.

Cada colonia seleccionada se coloca en tubos con 10 ml de medio LB-ampicilina y se cultiva por 18-24 hrs.

### AISLAMIENTO DEL DNA PLASMÍDICO

El aislamiento del DNA del plásmido se realiza con el kit comercial "Wizard<sup>R</sup> Plus Minipreps DNA purification system" de Promega.

Centrifugar los tubos de cultivo a 4000 rpm durante 10 min. Decantar el sobrenadante e invertir los tubos sobre papel secante para remover el exceso de medio.

Resuspender el paquete celular en 400  $\mu$ l de "Solución de resuspensión celular". Transferir la suspensión a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.

Adicionar 400  $\mu$ l de "Solución de lisis" y mezclar por inversión 4 veces. La suspensión debe volverse clara.

Adicionar 400  $\mu$ l de la "Solución neutralizante" y mezclar por inversión varias veces.

Centrifugar el lisado a 10 000 xg en microcentrífuga por 20 min.

Por otra parte, por cada muestra se prepara una minicolumna: Unir en un lado de la minicolumna un barril de jeringa y por el otro lado a una extensión de la unidad de vacío "vacuum manifold Promega's Vac-Man<sup>R</sup>".

Pipetear 1 ml de la resina en cada uno de los barriles. Cerrar la válvula de conexión al vacío.

Remover cuidadosamente el sobrenadante y transferirlo al barril de la jeringa que contiene la resina.

Abrir la válvula y aplicar vacío a 15 pulgadas de Hg para jalar la resina con lisado, mezclados dentro de la minicolumna. Cuando el contenido de la jeringa haya pasado a través de la columna, romper el vacío.

Adicionar 2 ml de solución de lavado de columna al barril de jeringa. Reaplicar el vacío para drenar la solución a través de la minicolumna.

Lavar la resina mediante drenado continuo a vacío hasta que toda la solución limpiadora haya pasado. Remueva el barril de la jeringa y transfiera la minicolumna a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml.

Centrifuge la minicolumna a 10,000 xg en la microcentrifuga durante 2 min y remueva cualquier residuo de la solución de lavado.

Transfiera la minicolumna a un nuevo tubo de microcentrifuga. Adicione 50 µl de agua libre de nucleasas a la minicolumna y espere un min. Centrifuge el tubo a 10,000 xg en una microcentrifuga por 20 s para eluir el DNA.

Remueva y descarte la minicolumna. Para almacenar el DNA en buffer Tris-EDTA (TE) a 4° C, adicione 5 µl de 10X buffer TE a los 50 µl de DNA eluido.

Analizar los insertos del plásmido mediante tamizaje de PCR. Se utiliza uno de los 4 iniciadores en el Kit (M13 Forward, M13 reverse, T3 o T7) en combinación con un primer del inserto.

Una vez que se confirmó la presencia del clon amplificado, se envió a secuenciar al W.M. Keck Center for Comparative and Functional Genomics de la Universidad de Illinois, USA.

La secuencia se compara con la base de datos del GenBank utilizando BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; 09-02-2003).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Aislamiento de BAL con actividad antimicrobiana

Se analizaron en total 25 productos. Tres alimentos cárnicos entre los que se encontraban chorizos y una muestra de cesina. Nueve alimentos de origen lácteo entre los que se encontraban quesos molido y panela de manufactura artesanal elaborados con leche no pasteurizada y yogurt casero. Once productos de origen vegetal entre los que se encontraba cacahuates en salmuera, pulque, tepache y curado de tuna. Y dos productos diversos, uno fue madre para producción de vinagre, una muestra de ensilado. Todos los productos se caracterizaron por ser de fabricación artesanal y expendirse en mercados públicos en los estados de Querétaro, Hidalgo, Estado de México y San Luis Potosí.

De los 25 alimentos analizados se obtuvieron 62 cepas presumiblemente BAL. En tres productos no se aislaron cepas BAL: dulce de tamarindo, cacao con harina de maíz en polvo para hacer atole y queso manchego.

El 56% de las cepas BAL aisladas mostró algún tipo de inhibición contra microorganismos patógenos o deterioradores (Cuadro 8).

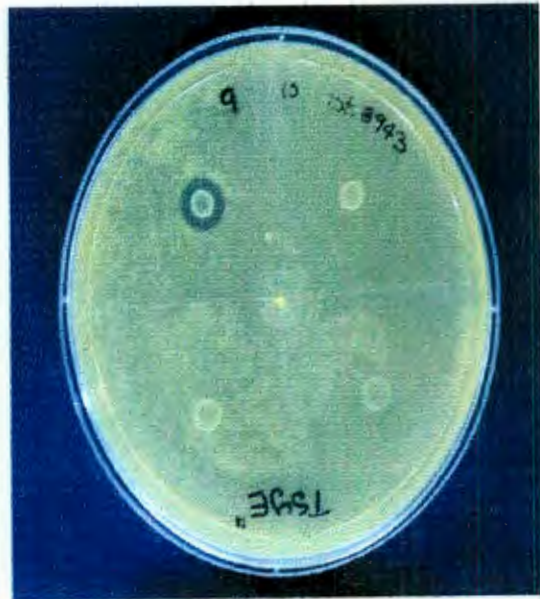
Existen grandes diferencias en la frecuencia con que se encuentran BAL con capacidad de producir compuestos antimicrobianos. Algunos autores reportan porcentajes muy bajos: 5% Hoover y Steenson, (1993); 1.4% Van den Berg *et al.*, (1993); mientras que otros reportan porcentajes de hasta el 99% (Onda *et al.*, 2002). En general, para la búsqueda de microorganismos productores de antimicrobianos, deben proveerse las condiciones para el crecimiento tanto del microorganismo probable productor como el sensible. De esta forma se evidencian aquellos microorganismos capaces de causar inhibición. El método del botón empleado en el presente estudio, es uno de los métodos más reproducibles y ampliamente difundidos ( Lewus y Montville, 1991; Corsetti *et al.*, 1996; Franz *et al.*, 1996).

Cuadro 8. Espectro de actividad antimicrobiano de las cepas BAL aisladas, frente a microorganismos patógenos y deterioradores.

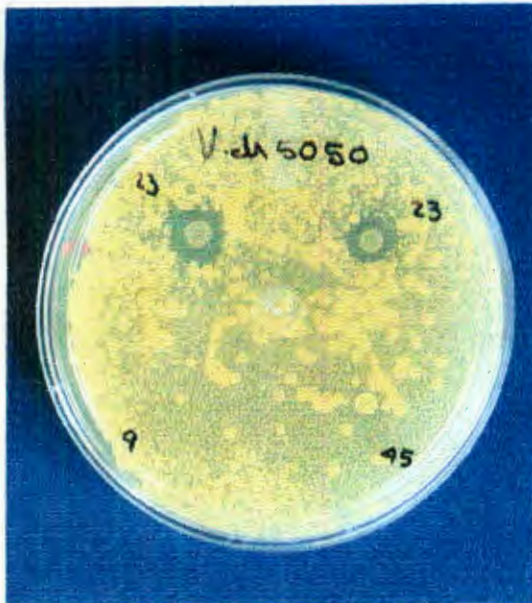
FUENTE	CLAVE	<i>M. luteus</i>	<i>St. aureus</i> 8943	<i>St. aureus</i> 8855	<i>Enterobacter</i> 9476	<i>Salmonella</i> 02	<i>St. aureus</i> 9993	<i>Vibrio cholerae</i> 9921	<i>Listeria monocytogenes</i> G19	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Listeria innocua</i> 10193	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	<i>E. coli</i> EP6C	<i>L. lactis</i> NCDO 523	<i>L. mesenteriae</i> NCDO 523	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>Lactobacilli plantarum</i> 5T	<i>Pedococcus acidilactici</i> ATCC8092
CACIÑA	CHI	-	-	-	-	-	-	-	6.5	-	4.0	-	4.6	-	-	-	-	-	4.0
PULQUE	PI1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PULQUE	PI2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PULQUE	PI4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PULQUE	PI7	4.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PULQUE	PI8	12.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PULQUE	PII2	10.0	-	-	-	-	-	-	5.0	-	3.0	-	4.0	-	-	-	-	-	4.0
QUESO PANELA	QPI1	-	9.0	8.0	-	-	-	-	4.1	-	5.0	1.0	4.0	-	-	-	-	-	4.0
QUESO PANELA	QPI3	-	-	-	-	-	-	-	4.2	-	5.0	-	5.0	-	-	-	-	-	4.0
QUESO PANELA	QPI4	-	-	-	-	-	-	-	4.4	-	5.0	-	4.3	-	-	-	-	-	4.0
QUESO PANELA	QPII6	12.0	-	-	-	-	-	-	4.8	-	4.0	-	4.0	-	-	-	-	-	4.0
QUESO PANELA	QPII8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0	5.0	-	-	-
QUESO MOLIDO	QMI3	-	-	-	-	-	-	-	4.0	-	5.0	-	4.3	-	-	-	-	-	4.0
QUESO MOLIDO	QMI4	-	-	-	-	-	-	-	4.0	-	5.0	-	4.0	-	-	-	-	-	4.0
QUESO MOLIDO	QMI5	16.5	-	-	-	-	-	-	4.0	-	3.0	-	4.0	-	-	-	-	-	4.0
QUESO MOLIDO	QMI6	-	-	-	-	-	-	-	4.2	-	4.0	3.0	4.0	-	-	-	4.0	-	-
QUESO MOLIDO	QMI7	-	-	-	-	-	-	-	4.1	-	3.0	3.0	4.4	-	-	-	-	-	-
CHORIZO	CHI2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CHORIZO	CHI4	-	-	-	-	-	-	-	5.0	-	-	-	5.0	-	-	-	-	-	4.0
CHORIZO	CHI8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0	-	-	-	-	-	-
CHORIZO	CHI6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0	-	-	-	-	-	4.0
CHORIZO	CHI10	11.2	7.0	1.0	4.0	-	5.7	8.4	5.2	3.0	5.0	4.5	4.0	-	-	5.0	-	-	-
CHORIZO	CHI11	7.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CAMOTE	CA14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TEPACHE	TP18	4.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TEPACHE	TP11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TEPACHE	TP12	8.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TEPACHE	TP13	14.0	-	-	-	-	-	5.0	4.5	3.0	5.0	4.3	4.0	-	-	-	-	-	4.0
TEPACHE	TP15	11.4	-	-	-	-	-	4.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0
TEPACHE	TP16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0
TEPACHE	TP18	13.3	-	-	-	-	-	5.1	4.0	-	4.0	-	4.0	-	-	-	-	-	4.0
TEPACHE	TP19	13.0	-	-	-	-	-	4.0	4.4	3.0	4.2	-	-	-	-	-	-	-	4.0
TEPACHE	TP20	6.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0
TEPACHE	TP21	8.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0
TEPACHE	TP22	6.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0
TEPACHE	TP23	8.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0
MADRE PARA VINAGRE	VN1	6.4	-	-	-	-	-	-	-	4.0	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0
MADRE PARA VINAGRE	VN2	4.0	-	-	-	-	-	5.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0
MADRE PARA VINAGRE	VN4	7.0	-	-	-	-	-	5.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0
MADRE PARA VINAGRE	VN5	7.0	-	-	-	-	-	5.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0
MADRE PARA VINAGRE	VN7	14.0	-	-	-	-	-	5.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0
CACAHUATES EN SALMUERA	CC8	10.0	-	-	-	-	-	-	-	4.0	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0
CACAHUATES EN SALMUERA	CC9	11.0	-	-	-	-	-	-	3.0	6.5	10.0	-	4.2	-	-	-	3.0	-	-
CACAHUATES EN SALMUERA	CC10	11.0	-	-	-	-	-	4.0	4.1	5.2	5.5	3.1	4.0	-	-	3.0	3.0	-	-
CACAHUATES EN SALMUERA	CC11	4.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CACAHUATES EN SALMUERA	CC12	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENBLADO	EN2	6.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENBLADO	EN5	2.0	-	-	-	-	-	-	-	5.0	-	-	4.0	-	-	-	-	-	-
ENBLADO	EN6	8.0	-	-	-	-	-	-	-	5.0	-	-	4.0	-	-	-	-	-	-
ENBLADO	EN7	6.0	-	-	-	-	-	-	-	4.1	-	-	4.0	-	-	-	-	-	-
CASCARA MAIZ FERMENTADA	MM2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CASCARA MAIZ FERMENTADA	MM7	4.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CASCARA MAIZ FERMENTADA	MM8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CASCARA MAIZ FERMENTADA	MM9	5.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
YERBA MATE	Y	9.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
YERBA MATE	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KEPIR	K10	7.0	-	-	-	-	-	-	-	-	5.0	3.4	-	-	-	-	-	-	4.0
KEPIR	K11	8.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.4	-	-	-	-	-	-
KEPIR	K13	8.0	-	-	-	-	-	-	-	4.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CURADO DE TUNA	CTU	4.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CURADO DE TUNA	CTU	8.0	-	-	-	-	-	-	-	-	6.0	-	4.1	-	-	-	4.0	-	4.0
CURADO DE TUNA	CTU	9.0	-	-	-	-	-	-	-	3.0	6.5	6.0	5.0	-	-	-	2.0	-	-



a)



b)



c)



d)

FIGURA 5. Halos de inhibición originados por cepas BAL con el método del botón. a) BAL CHII10 vs. *St. aureus* 8943, b) BAL QPI1 vs. *St. aureus* 8943, c) BAL CHII10 vs. *V. cholerae* 5050, d) BAL QPI1 vs. *L. monocytogenes* 7644.

Los diámetros de inhibición mostrados en el presente estudio deberán considerarse solamente como indicador cualitativo, ya que el método no está diseñado para fines cuantitativos (Figura 5).

El análisis de los resultados muestra que cuando se presente el efecto antagónico de las BAL, se dirige preferentemente sobre patógenos Gram positivos: *St. aureus* y *L. monocytogenes* (cuadro 8). Este espectro de inhibición recuerda al producido por bacteriocinas. Prácticamente todos los estudios que reportan el hallazgo de cepas bacteriocinogénicas han encontrado inhibición de varias cepas de *L. monocytogenes* en sus resultados (Cintas *et al.*, 1998; Herranz *et al.*, 2001; Elotmani *et al.*, 2002; Franz *et al.*, 1996).

*Micrococcus luteus* es el microorganismo indicador que se emplea para la cuantificación de nisina en quesos por el método de difusión en agar (British standards, 1974), por lo que se decidió incluirlo en el antagonismo. El *M. luteus* resultó ser un microorganismo altamente sensible a las BAL, aproximadamente el 86% de las cepas evaluadas mostraron tener efecto inhibitorio sobre él. En un estudio que incluyó como microorganismos indicadores bacterias lácticas, patógenos y deterioradores frente a bacteriocinas y antibióticos, *M. luteus* resultó ser el microorganismo más sensible de todos (Mota *et al.*, 2000). Por tal motivo no se considera que sea un buen candidato para seleccionar cepas con potencial de producción de antimicrobianos ya que produciría muchos falsos positivos. Sin embargo, en vista de su carácter no patógeno, podría considerarse para exámenes rutinarios de cuantificación de actividad bacteriocinogénica, una vez que el antimicrobiano implicado sea completamente identificado y estandarizado.

Con respecto a bacterias Gram negativas, ninguna BAL ha mostrado antagonismo contra *Salmonella* ni contra *E. coli* EPEC. En el presente estudio 8 cepas mostraron un discreto halo de inhibición (3.6 mm diámetro promedio) contra *Citrobacter freundii* y 1 cepa mostró solo efecto bacteriostático contra *Enterobacter sp.*

Diversas publicaciones sobre el aislamiento de BAL en alimentos fermentados concuerdan con el hallazgo sobre no inhibición de Gram negativos como *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Proteus vulgaris* (Moreno *et al.*, 2002; Elotmani *et al.*,

2002; Corsetti *et al.*, 1996). Esto sugiere un mecanismo de acción similar entre los compuestos antimicrobianos producidos por BAL.

Un grupo de cepas BAL aisladas en nata para vinagre (cuadro 8 VN en color azul cielo), otro en tepache (cuadro 8) TP y TI en color verde claro y la cepa CHII10 aislada de chorizo (figura 5c), mostraron inhibición variable (4 a 6.5 mm diámetro) contra *V. cholerae* no O1 y *V. parahemoliticus*. El efecto puede estar mediado por la producción de ácidos ya que el *Vibrio* es muy sensible a ambientes ácidos y notablemente tolerante a ambientes alcalinos (Jay, 2000). La identificación de los compuestos implicados en la inhibición de éste patógeno sería útil para entender el mecanismo de acción y proponer aplicaciones.

Las BAL aisladas de productos cárnicos (cesina y chorizo) y que mostraron actividad inhibitoria (cuadro 8, CH en color naranja y CS en mamey), tuvieron la característica de inhibir a las cepas de *Listeria* (figura 5a). Cintas *et al.* (1998) y Herranz *et al.* (2001c) reportaron también el aislamiento de BAL bacteriocinogénicas a partir de embutidos españoles, Stecchini *et al.* (1992) a partir de jamón italiano y Noonpakdee *et al.* (2003) en embutidos tailandeses.

El grupo de BAL aisladas de quesos de manufactura artesanal (cuadro 8, QP y QM en rosa), se destacó por mostrar actividad antimicrobiana contra las cepas de *Listeria monocytogenes* (figura 5d). Los resultados concuerdan con hallazgos similares en productos lácteos marroquíes (Elotmani *et al.*, 2002; Benkerroum *et al.*, 2000), suizos (Jung y Paik, 2000), canadienses (Daba *et al.*, 1991) y argentinos (Farias *et al.*, 1994).

El empleo de leche bronca y la inconsistencia en el procesamiento y distribución de quesos frescos artesanales origina productos de dudosa calidad sanitaria. Este tipo de productos provee las condiciones favorables para el crecimiento de patógenos. De aquí la importancia de encontrar bioconservadores para productos lácteos. Los compuestos producidos por BAL han demostrado su utilidad en la manufactura de quesos frescos (Benkerroum *et al.*, 2000).

Se ha reportado que el *St. aureus* está implicado en infecciones gastrointestinales originadas por quesos frescos en los países latinoamericanos (Díaz y González, 2001). Este microorganismo es capaz de producir diversas toxinas termoestables

causantes de intoxicaciones alimentarias que se caracterizan por diarrea aguda líquida, náusea y vómito (Valdespino *et al.*, 1994). Las cepas QPI1 (queso panela) y CHII10 (chorizo) incluyen en su espectro de inhibición a *St. aureus* (figura 5a y 5b), Cintas *et al.* (1998) y Herranz *et al.* (2001) aislaron cepas de embutidos que inhibieron también a *St. aureus*. Otros reportes de aislamiento de cepas bacteriocinogénicas no han encontrado sensibilidad a *S. aureus* (Moreno *et al.*, 2002b; Elotmani *et al.*, 2002; Corsetti *et al.*, 1996).

La cepa CC10 logró inhibir el desarrollo de *B. cereus*. Onda *et al.* (2002) y Elotmani *et al.* (2002) reportan cepas con ésta misma capacidad.

Tres de las cepas evaluadas mostraron los mejores perfiles de antagonismo, (cuadro 8, marca de amarillo). La cepa QPI1 aislada de queso panela mostró diámetros de inhibición de entre 3 a 8 mm, en microorganismos como: *St. aureus* (figura 5b), *L. monocytogenes* (figura 5d) y *P. acidilactici*.

La cepa CHII10 encontrada en chorizo muestra diámetros de inhibición de entre 4 a 8.7 mm. Entre los microorganismos inhibidos destacan *St. aureus* (figura 5a), *L. monocytogenes*, *V. cholerae* (figura 5c) y *V. parahemoliticus* y *L. mesenteroides*.

Y la cepa CC10 encontrada en cacahuates en salmuera cuenta entre las bacterias que inhibió a *V. cholerae* y *V. parahemoliticus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* y *L. mesenteroides*.

Los resultados sugieren que las BAL aisladas partiendo de alimentos artesanales producen antimicrobianos contra bacterias Gram positivas principalmente. Estos antimicrobianos tienen potencial de inhibición contra *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus* y contra el género *Vibrio* que es Gram-negativo.

Los antimicrobianos producidos por BAL podrían actuar también contra Gram negativas si se emplean de manera conjunta con otro agente como EDTA, NaCl y ácidos como lo ha sugerido Ganzle *et al.* (1999).

Cada microorganismo desarrolla mecanismos para asegurar su sobrevivencia, la producción de antimicrobianos de origen bacteriano es el resultado de la lucha entre especies. La producción de antibióticos y bacteriocinas son ejemplos de ello. Numerosos compuestos de origen microbiano son actualmente estudiados para evaluar su potencial de uso. Desde esta perspectiva, aquellas BAL que sobreviven



ante flora microbiana constituida por deterioradores y patógenos podrían estar produciendo inhibidores o antimicrobianos naturales con potencial uso en alimentos (Daeschel, 1989; Hoover, 1993; Riley y Wertz, 2002). Las BAL también podrían emplearse para mejorar la inocuidad de los alimentos fermentados sin dañar los cultivos empleados como iniciadores en la producción de alimentos fermentados.

Los resultados aquí presentados sugieren que los compuestos antimicrobianos producidos por las BAL tienen la capacidad de limitar el crecimiento de microorganismos y es posible que su mezcla con otros agentes sea efectiva como bioconservador.

Es importante detectar la naturaleza química de los compuestos con actividad antimicrobiana y evaluar la posibilidad de emplearlos en la industria alimenticia.

Los resultados sugieren que las bacterias productoras de antimicrobianos pueden estar jugando un papel importante en la prevención de crecimiento de microorganismos indeseables en los alimentos de manufactura artesanal.

## **6.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana por difusión en agar.**

Basados en el perfil de inhibición, las cepas seleccionadas inicialmente fueron:

QPI1: Cocobacilo Gram positivo, catalasa negativo.

CHII10: Bacilo Gram positivo, catalasa negativo.

CC10: Bacilo curvo Gram positivo, catalasa negativo.

El cuadro 9 muestra los resultados de los estudios sobre inhibición contra *L. monocytogenes* utilizando ELC y ELCC tanto por difusión en agar como en caldo. No se observó actividad antimicrobiana contra *S. aureus* como microorganismo indicador para ningún ELC a excepción del extracto CC10 concentrado por evaporación (resultados no mostrados). Las evaluaciones se realizaron con pH sin ajuste.

CUADRO 9. Selección de los extractos con mayor potencial como antimicrobianos de 3 cepas BAL utilizando *L. monocytogenes* Scott A como indicador.

	QPI1	CHII10	CC10
ELC (difusión en agar)	4.7 mm	0	0
ELCC 5X evaporación (difusión en agar)	9.0 mm	0	4.0 mm
ELCC 20X liofilización (difusión en agar)	10.5 mm	----	7.0 mm
ELCC evaporado 2.5X* (medio líquido)	turbidez negativa	turbidez +	turbidez +

\* El control sin extracto tuvo un desarrollo a las 18 h calificado como : +++

CUADRO 10. Espectro de actividad antimicrobiana<sup>a</sup> de la cepa QP11.

Microorganismo indicador	Procedencia	Diámetro de inhibición (mm)
<i>S. aureus</i> 8943	Leche bronca	8.0
<i>S. aureus</i> 8855	Queso Oaxaca	8.0
<i>S. aureus</i> 9993	Queso ranchero	0.0
<i>L. monocytogenes</i> G19	Guacamole	4.1
<i>L. innocua</i> 10193	Crema láctea	5.5
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	Muestra clínica	4.6
<i>Enterobacter</i> spp. 9476	Pastel envinado	0.0
<i>Escherichia coli</i> EPEC	Colección	0.0
<i>Salmonella</i> spp. 02	Carne molida	0.0
<i>Citrobacter freundii</i> 9473	Queso ranchero	3.0
<i>Vibrio cholerae</i> no 01 5921	Pulpo cocido	0.0
<i>V. parahemoliticus</i> 10691	Camarón cocido	0.0
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5T	Colección	0.0
<i>L. mesenteroides</i> NCDO523	NCDO	0.0
<i>P. acidilactici</i> ATCC8092	ATCC	6.8
<i>L. lactis</i> NCDO496	NCDO	0.0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC11778	ATCC	0.0

NCDO: National Collection of Dairy Organisms.

ATCC American Type Culture Collection

<sup>a</sup>Actividad antimicrobiana evaluado por el método del botón sección 5.3.

Basados en la actividad antimicrobiana observada tanto del ELC y del ELCC, se decidió continuar sólo con la investigación del extracto QP11. El Cuadro 10 muestra el espectro de actividad antimicrobiana de la cepa seleccionada QP11.

### 6.3 Cinética de producción de QP11 en cultivo agitado

La producción del antimicrobiano QP11 empezó durante la fase exponencial, alcanzando su máximo al inicio de la fase estacionaria en donde permaneció constante (Figura 6, Cuadro 11). De esta manera refleja un comportamiento de metabolito (Madigan *et al.*, 1998).

Diferentes estudios concuerdan con reportar el inicio de la producción de bacteriocinas durante etapas temprana e intermedias de la fase exponencial aún cuando la BAL involucrada sea de diferentes especies: *Streptococcus macedonicus* (Georgalaki *et al.*, 2002), *Enterococcus faecium* (Moreno *et al.*, 2003b), *Lactococcus lactis* WNC 20 (Noonpakdee *et al.*, 2003), *Lactobacillus curvatus* (Messens *et al.*, 2003). De esta manera se muestra su carácter de metabolito primario. Sin embargo, reportes recientes muestran la presencia de un mecanismo complejo ya que puede presentarse la producción en dos diferentes etapas, una durante la fase exponencial y otra en la fase estacionaria (Krier *et al.*, 1998; Neysens *et al.*, 2003), asociándose a esta bacteriocina como un metabolito tanto primario como secundario, dependiendo de la manipulación del pH.

Se ha observado que el máximo de actividad puede presentarse durante el máximo de biomasa. En el presente estudio la máxima producción de bacteriocina se alcanzó antes del máximo de biomasa (Figura 6). Las condiciones ambientales que estimulan el crecimiento celular generalmente permiten una buena producción de bacteriocinas. No obstante elevadas velocidades de crecimiento no aseguran elevados niveles de producción de bacteriocinas (Krier *et al.*, 1998; Leroy *et al.*, 2002).

CUADRO 11. Cinética de producción del compuesto QPI1 en matraz agitado a 30° C en MRS.

Tiempo H	pH	Abs 600 nm	Recuento UFC/ml	Actividad UA/ml
0	6.35	0.0478	4.50E+05	0
2	6.16	0.1492	1.50E+07	0
4	5.95	0.6554	4.40E+07	25
5	5.63	1.2678	2.30E+08	50
6	5.39	1.6795	3.20E+08	50
7	5.22	1.8800	4.60E+08	50
10	4.88	1.9871	4.00E+08	50
13	4.72	2.0133	1.90E+09	50
16	4.67	2.0014	8.80E+08	50
19	4.61	1.9931	5.20E+08	50

El recuento representa el promedio de dos determinaciones.

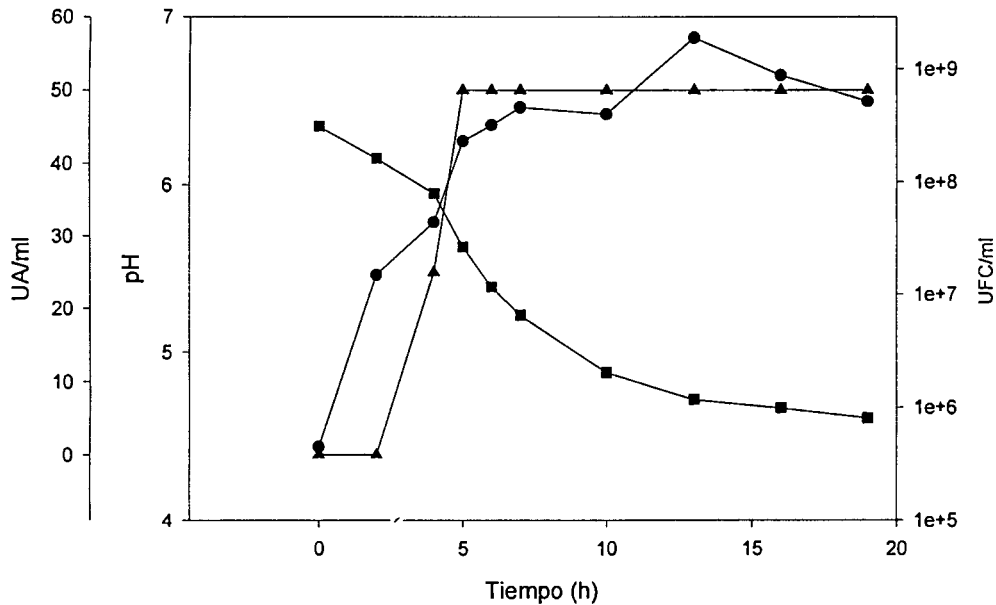


FIGURA 6. Cinética de producción de QPI1 en cultivo agitado. ■ pH; ▲ actividad (UA /ml); ● recuento de *E. faecium* QPI1 (UFC/ml).

En algunos casos la producción de bacteriocina permanece constante una vez que se ha producido (Georgalaki *et al.*, 2002), y en otros declina (Noonpakdee *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2003b; Leroy *et al.*, 2003). En el caso del extracto QPI1, la producción se mantuvo constante una vez que se alcanzó el máximo a las 5 h y durante las 19 h que se llevó a cabo la fermentación a 30° C (figura 7). Cintas *et al.* (1997) reportaron para la enterocina P, un descenso en la producción de bacteriocina a medida que sube la temperatura de fermentación (más notablemente a partir de los 37° C) una vez que se llega a la fase estacionaria. De tal modo que a los 45° C hay un pico de producción de bacteriocina que desciende subitamente a las 12 h. Teniendo en cuenta que las especies de *Enterococcus* tienen la capacidad de crecer a 45° C, este hallazgo sugiere que a temperaturas mesofílicas la producción de bacteriocinas es un mecanismo de defensa indispensable, ya que hay muchos competidores. Sin embargo, arriba de 37° C la capacidad de sobrevivencia de los competidores disminuye notablemente por lo que la producción de bacteriocina no es indispensable.

Se ha insistido en la importancia del efecto del pH sobre la producción de bacteriocina. Mortvedt *et al.* (1995), Krier *et al.* (1998), Leroy *et al.* (2002), Marekova *et al.* (2003), Messens *et al.* (2003) y Moreno *et al.* (2003b) trabajando con diferentes bacteriocinas coinciden en afirmar que se presenta un máximo en la producción de bacteriocina cuando el pH se encuentra alrededor de 5.5 (5.0-6.0), mismo que coincide con la fase logarítmica de crecimiento, pero no con el pH óptimo de crecimiento o máxima producción de biomasa (normalmente entre 6-7.5). Un claro ejemplo es la sakacina K, cuya producción está ligada al crecimiento bacteriano, sin embargo el pH óptimo de crecimiento para *Lactobacillus sakei* es de 6.0 y no corresponde al óptimo para producción de sakacina K de 5.0 (Leroy y De Vuyst 1999, 2000).

La cinética de producción del compuesto QPI1 (figura 6) coincide en presentar un máximo de producción cuando el pH desciende a 5.6, actividad que se mantiene cuando el pH baja hasta 4.0.

Estos hechos sugieren que en una fermentación el descenso del pH originado por la producción de ácidos de las cepas BAL, favorece la producción de bacteriocina

como ha sido mencionado por Leroy y De Vuyst (1999). Messens *et al.*, (2003) reportaron un punto óptimo en la producción de curvacina A a temperatura de 22° C y un pH de 5.4. Leroy y De Vuyst (1999) reportaron 20-25° C y pH 5.0 para sakacina K por mencionar solo dos ejemplos. En general, la producción de bacteriocinas coincide con las condiciones en las que normalmente se llevan a cabo la producción de quesos frescos, chorizos y chistorras tradicionales en México.

Se ha atribuido la disminución en la actividad bacteriocinogénica a la mayor absorción de bacteriocina por la membrana celular de las bacterias productoras cuando el pH se incrementa (Moreno *et al.*, 2003b), cualquiera que sea el caso, la actividad antimicrobiana se ve incrementada por debajo de pH=5.0.

#### **6.4 Determinación de la naturaleza proteica del compuesto antimicrobiano.**

Las enzimas pepsina y tripsina tuvieron un efecto parcial sobre la actividad antimicrobiana del ELCC QPI1. La proteinasa K no mostró ningún efecto sobre el ELCC QPI1, probablemente por no disponer del enlace peptídico susceptible de ataque por esta proteasa. La  $\alpha$ -quimotripsina logró inhibir por completo la acción del compuesto antimicrobiano, (Cuadro 12 y Figura 7 ).

La pérdida de la actividad antimicrobiana mediante la adición de enzimas proteolíticas es una prueba determinante de la naturaleza proteica del antimicrobiano en cuestión (Ray, 1992).

La nisina es inactivada por la pancreatina, la  $\alpha$ -quimotripsina, la proteinasa K y la subtilopeptidasa, mientras que es resistente a tripsina y pepsina (Thomas *et al.*, 2000; Noonpakdee *et al.*, 2003; Elotmani *et al.*, 2002).

La pediocina es sensible a la proteólisis de  $\alpha$ -quimotripsina, tripsina, ficina, papaina y proteasas IV, IX, X, XIV, XV y XIX (Ray y Miller 2000).

La macedocina (*Streptococcus macedonicus*) es sensible a  $\alpha$ -quimotripsina y proteinasa K y proteasa tipo VIII es parcialmente sensible a renina y tripsina, mientras que la pepsina no afecta la actividad (Georgalaki *et al.*, 2002).

CUADRO 12. Efecto de diferentes enzimas proteolíticas sobre la actividad antimicrobiana del ELLC QP11 evaluadas frente a *L. innocua*.

ENZIMA	HALO DE INHIBICIÓN		
	BLANCO 1 (Control Positivo)	PROBLEMA ELCC QP11+ENZIMA	BLANCO (2) (Control Negativo)
PEPSINA	8.5	7.5	0.0
TRIPSINA	4.5	3.4	0.0
$\alpha$ -QUIMOTRIPSINA	3.0	0.0	0.0
PROTEINASA K	7.6	7.5	0.0



Jung y Paik, (2000) reportaron inactivación de la lacticina JW3 solamente con la proteasa IV, de entre 11 enzimas proteolíticas ensayadas. Entre las enzimas que no tuvieron efecto contra la lacticina se encuentran las 4 empleadas en el presente estudio.

Las pentocinas L y S (*Pediococcus pentosaceus*) son inactivadas por pepsina,  $\alpha$ -quimotripsina, pronasa y bromelaína completamente (Yin *et al.*, 2003).

Dentro de las enterocinas reportadas en la bibliografía, todas pierden actividad con  $\alpha$ -quimotripsina, y exhiben resistencia variable a proteinasa K, tripsina y pepsina.

El compuesto QPI1 difiere del patrón de inhibición observado para nisina, pediocina, macedocina, lacticina JW3, pentocinas L y S, ni enterocinas R18, R69 y JCM5804. La bacteriocina

La bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* A14 (Elotmani *et al.*, 2002) presenta el mismo patrón de inhibición ante las enzimas proteolíticas evaluadas en nuestro estudio. No se encontró ningún reporte de enterocinas con el mismo patrón de inhibición por enzimas proteolíticas que el presente estudio.

Particularmente en el caso de las bacteriocinas de *Enterococcus spp.* se ha reportado la producción simultánea de 2 enterocinas en varios casos (Eijsink *et al.*, 1998; Vancanneyt *et al.*, 2002). Debe considerarse la posibilidad de que la cepa QPI1 del presente estudio suceda la misma situación.

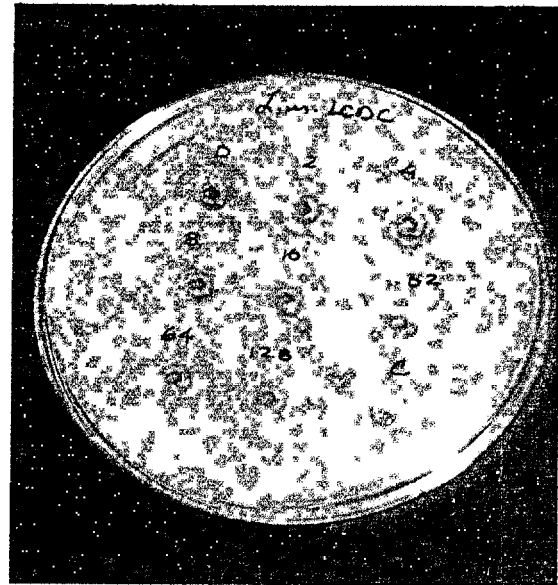
#### **6.4 Espectro de actividad anti-*Listeria monocytogenes* del ELCC QPI1.**

El cuadro 13 muestra la gran variabilidad en la sensibilidad de las diferentes cepas de *L. monocytogenes* frente al ELCC QPI1. En la figura 8 se observa un ejemplo de las diferencias en la sensibilidad de las cepas 7644 (a) y LCDC (b) evaluadas por difusión en agar. La figura 9 contrasta los diámetros de los halos de inhibición de las cepas 7644 y la Scott A mediante el método del botón.

*L. monocytogenes* 7644 de origen humano fue la cepa más susceptible, mientras que otra cepa de origen humano *L. monocytogenes* Scott A fue la más resistente (cuadro 13 y figura 9).



a



b

FIGURA 8. Comparación de sensibilidad de 20  $\mu$ L de ELCC QP11 por el método de difusión en agar frente a: a) *L. monocytogenes* 7644, halo de inhibición en la dilución 1:128. b) *L. monocytogenes* LCDC, halo de inhibición en la dilución 1:16.

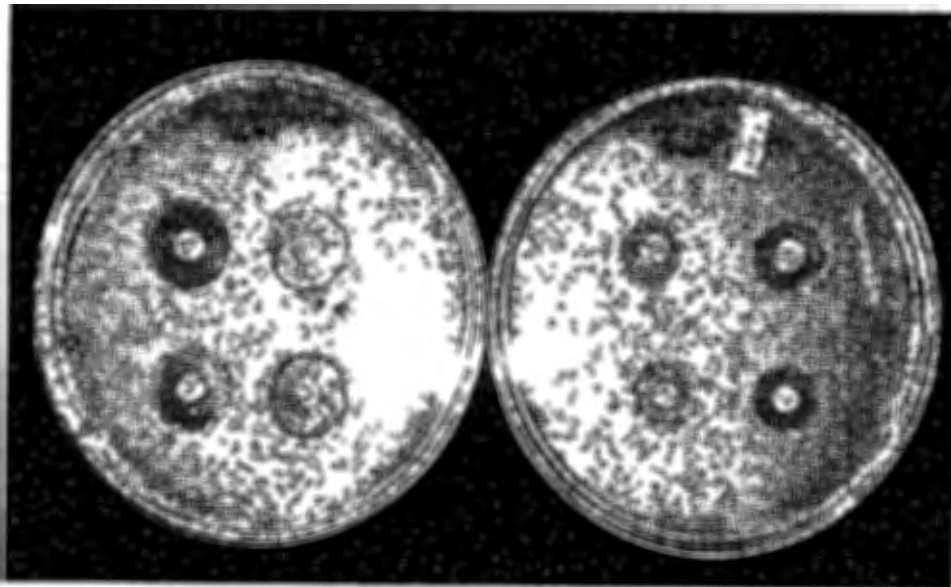


FIGURA 9. Comparación de los halos de inhibición producidos por la cepa QP11 frente a 2 cepas de *L. monocytogenes*, la cepa más sensible a la izquierda (7644) y la más resistente a la derecha (Scott A).

Rasch y Knochel (1998), evaluaron diferentes concentraciones de nisina y pediocina en una colección de 381 cepas de *L. monocytogenes*, y observaron una gran variación su la sensibilidad. El 14% de las cepas fueron resistentes a pediocina (1600 UA/ml) y solo el 0.5% fue resistente a nisina (500 UI/ml).

Todas las cepas de *L. monocytogenes* evaluadas en el presente estudio mostraron ser inhibidas a diferentes concentraciones del compuesto QPI1. Georgalaki *et al.* (2002) ha reportado actividad anti-listeria de macedocina (*Streptococcus macedonicus*) hacia cepas de *Listeria innocua* y *Listeria ivanovii*, sin embargo no encontraron actividad anti-*Listeria monocytogenes*.

Dentro de las bacteriocinas que han mostrado actividad anti-*Listeria monocytogenes* se encuentran: lacticina 3147, nisina A, sakacina P, pediocina Ach, divercina V41, enterocina A, mesentericina Y105, carnobacteriocina A y B, curvacina A, enterocina 1146, leucocina A, piscicolina 61, lactactina B (McAuliffe *et al.*, 1999; Naidu y Clemens, 2000; Ennahar *et al.*, 2000; Vignolo *et al.*, 2000; Katla *et al.*, 2002).

Ennahar *et al.* (2000) realizaron una comparación de los patrones de inhibición de *L. monocytogenes* basándose en el tipo de bacteriocina y encontraron que todas las bacteriocinas clase IIa tuvieron un patrón similar entre sí. El patrón de inhibición fue diferente al de la nisina A (clase Ia). Este hallazgo sugiere que las bacteriocinas clase IIa tienen un proceso de reconocimiento específico diferente al de la nisina.

Diversos autores coinciden en reportar a *L. monocytogenes* Scott A como una cepa altamente resistente a bacteriocinas con respecto a otras cepas de *Listeria monocytogenes*. McAuliffe *et al.* (1999) reportaron este hallazgo comparando el desarrollo en caldo de diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de ambientes donde se producen alimentos lácteos, y enfrentándolas a lacticina 3147. Vignolo *et al.* (2000) trabajó con 10 cepas de diferentes especies de *Listeria*, reportó también que *L. monocytogenes* Scott A posee una elevada resistencia a nisina, mientras que no parece ser susceptible ni a lactocina 705 (*L. casei*) ni a enterocina CRL35 (*E. faecium*). Así mismo Ennahar *et al.* (2000) reportaron que *L. monocytogenes* Scott A es una de las cepas con menor sensibilidad a nisina y al

grupo de bacteriocinas clase IIa (pediocina AcH, divercina V41, enterocina A y mesentericina Y105).

*L. monocytogenes* ha sido rutinariamente aisladas a partir de los ambientes donde se fabrican quesos y productos lácteos (McAuliffe *et al.*, 1999). *L. monocytogenes* es un patógeno implicado en brotes alimentarios que ha demostrado ser altamente tolerante a condiciones ambientales que limitarían el crecimiento o matarían a otros microorganismos patógenos, tal como bajos pH y temperaturas de refrigeración y congelación. Van Shaik *et al.* (1999) mostró que la elevada adaptabilidad de la *L. monocytogenes* a la acidez está acompañada de elevada tolerancia a bacteriocinas, en particular a nisina. Esto plantea un conflicto, ya que muchos autores consideraban a las bacteriocinas como una alternativa incluso para su empleo a nivel clínico, dado el surgimiento de cepas patógenas resistentes a antibióticos pero aparentemente susceptibles a bacteriocinas (Enserink *et al.*, 1999). Sin embargo, conforme aparecen más estudios resulta evidente que la aparición de cepas resistentes a bacteriocinas es un proceso factible. De emplearse éstas como bioconservador en alimentos deberá ser solo en el sistema de barreras múltiples o bien junto con las condiciones ambientales que impidan el surgimiento de cepas resistentes (Gravesen *et al.*, 2002).

Diversos factores ambientales como pH, NaCl y temperatura están involucrados en el desarrollo de resistencia de *L. monocytogenes* a bacteriocinas, aparte de los factores inherentes a la cepa y tipo de bacteriocina (Gravesen *et al.*, 2002).

Con respecto al mecanismo de resistencia de *Listeria* a bacteriocinas, van Schaik *et al.* (1999) reportaron que la composición de los ácidos grasos de la membrana celular de las cepas que muestran mayor resistencia contiene significativamente más ácidos grasos saturados (C14:0 y C16:0) y menos C18:0 que las cepas no resistentes. Por otra parte la resistencia también ha sido asociada al sistema de fosfotransferasa manosa-específico (PTsS)(Dalet *et al.*, 2001). Se ha observado la ausencia de la subunidad IIAB del PTsS en cepas resistentes a leucocina A (Ramnath *et al.*, 2000) y también la sobreexpresión de  $\beta$ -glucosidasa del PTsS, en cepas resistentes a pediocina (Gravesen *et al.*, 2002).

## 6.5 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se obtuvo una CMI para la cepa más susceptible (*L. monocytogenes* 7644), de 11.5 UA/ml. El cuadro 14 muestra que la CMI se encontraba experimentalmente entre 10 y 20 UA/ml y el paquete estadístico, figura 10 determinó la concentración exacta. Para la cepa más resistente (*L. monocytogenes* Scott A) la CMI fue de 1583 UA/ml (cuadro 15 y figura 11). La concentración requerida para inhibir a la cepa más resistente fue 130 veces mayor que la necesaria para inhibir la cepa más vulnerable del mismo género y especie. Resulta comprensible esperar grandes diferencias en la capacidad antimicrobiana en géneros diferentes.

Diferentes autores coinciden en reportar grandes variaciones en la susceptibilidad y resistencia de las bacteriocinas sobre *L. monocytogenes*. McAuliffe *et al.*, (1999); Ennahar *et al.*, (2000); Katla *et al.*, (2002) reportaron una CMI de 0.612 ng/ml para la *Listeria monocytogenes* más resistente y 0.011 ng/ml (55 veces menor) para la cepa más susceptible de entre un grupo de cepas de *L. monocytogenes* evaluado por microtitulación en placa.

Si bien el método empleado afecta la expresión de los resultados de CMI, es posible establecer comparaciones entre la CMI obtenida por el mismo método.

Existen dos grandes grupos de ensayos para obtener la CMI, uno basado en la difusión en agar y otro que está basado en la inhibición del crecimiento en caldo (Davidson y Parish 1989). Los resultados para ambos tipos de metodología se muestran en el cuadro 16. En términos muy generales se obtiene información más o menos similar con ambas metodologías, sin embargo los métodos basados en la inhibición del crecimiento en caldo aportan información más precisa sobre el mecanismo de acción del antimicrobiano y al parecer por los reportes más recientes, la tendencia es hacia el empleo de ésta última (Mota *et al.*, 2000; Kazazic *et al.*, 2002; Katla *et al.*, 2002).

Se ha señalado la importancia de que la potencia de inhibición del compuesto frente a cultivos iniciadores para producción de alimentos fermentados sea muy baja (CMI alta) y al mismo tiempo hacia microorganismos indeseables sea alta, para que pueda considerarse su empleo en la industria alimenticia.

CUADRO 14. CMI del ELCC QP11, empleando como microorganismo indicador *Listeria monocytogenes* 7644.

	<u>CONTROL</u>	<u>40 UA/ml</u>	<u>20 UA/ml</u>	<u>10 UA/ml</u>	<u>5 UA/ml</u>	<u>2.5 UA/ml</u>
INICIAL UFC/ml	$2.2 \times 10^7$	$2.2 \times 10^7$	$2.2 \times 10^7$	$2.2 \times 10^7$	$2.2 \times 10^7$	$2.2 \times 10^7$
FINAL UFC/ml	$2.1 \times 10^9$	0	0	$4.0 \times 10^1$	$2.2 \times 10^4$	$5.5 \times 10^7$

El resultado representa el promedio de dos repeticiones.

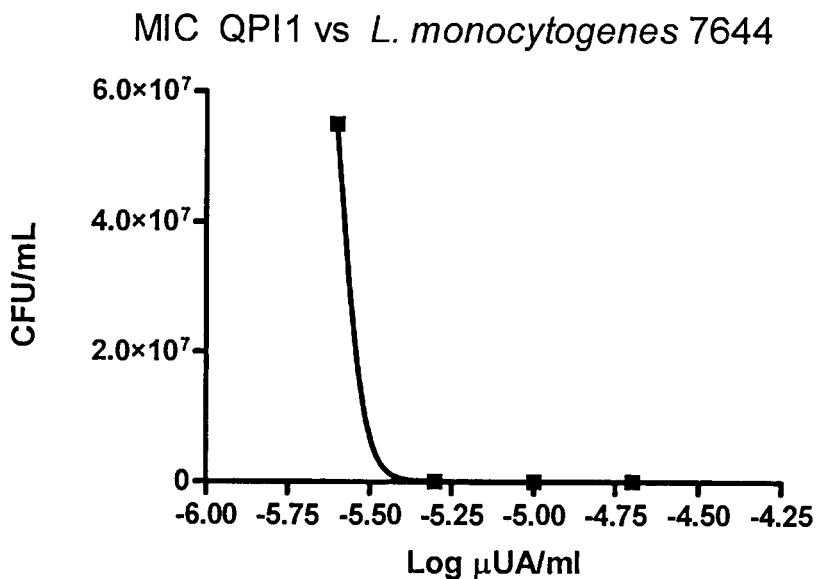


FIGURA 10. Gráfica para la obtención de CMI utilizando como indicador *L. monocytogenes* 7644. El programa estadístico usado fue GraphPad PRISM 4.

CUADRO 15. CIM del ELCC QP11, empleando como microorganismo indicador *Listeria monocytogenes* Scott A.

	<u>CONTROL</u>	<u>1600</u> <u>AU/ml</u>	<u>1400</u> <u>AU/ml</u>	<u>1200</u> <u>AU/ml</u>	<u>1100</u> <u>AU/ml</u>	<u>1000</u> <u>AU/ml</u>	<u>900 AU/ml</u>	<u>800 AU/ml</u>	<u>600 AU/ml</u>
INICIAL UFC/ml	$9.4 \times 10^5$	$9.4 \times 10^5$	$9.4 \times 10^5$	$9.4 \times 10^5$	$9.4 \times 10^5$	$9.4 \times 10^5$	$9.4 \times 10^5$	$9.4 \times 10^5$	$9.4 \times 10^5$
FINAL UFC/ml	$5.7 \times 10^9$	0	$3.5 \times 10$	$7 \times 10$	$1.2 \times 10^2$	$1.8 \times 10^2$	$3 \times 10^2$	$2.8 \times 10^2$	$4.4 \times 10^2$

El resultado representa el promedio de dos repeticiones.

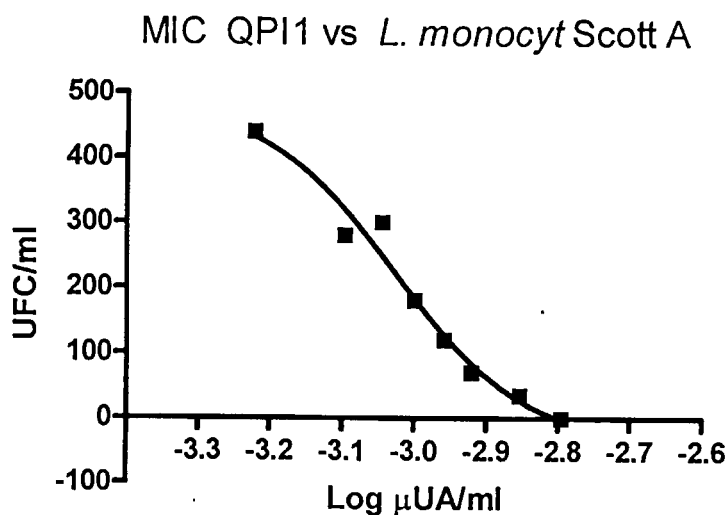


FIGURA 11. Gráfica para la obtención de CMI utilizando como indicador a la *L. monocytogenes* Scott A. El programa estadístico usado fue GraphPad PRISM 4.

CUADRO 16. Resultados para la CMI de ELCC QPI1 frente a dos cepas de *L. monocytogenes*. La dilución crítica indica la susceptibilidad. La inhibición del crecimiento en caldo indica la resistencia del microorganismo al antimicrobiano de prueba.

CEPA	SENSIBILIDAD	CMI (UA/ml)
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	200	1583
<i>Listeria monocytogenes</i> 7644	6400	11.5



Mota *et al.* (2000), señalaron que la acción bactericida de las bacteriocinas es selectiva. Las CMI obtenida para la nisina frente a patógenos Gram-positivos fue: *Staphylococcus spp.* 4.2 µg/ml, *Streptococcus spp.* 8.4 µg/ml, *Listeria spp.* 4.2 µg/ml y *Bacillus spp.* 4.2 µg/ml, a diferencia de otros microorganismos Gram-positivos no patógenos fue: *Lactococcus lactis* subs. *lactis* biovar *diacetylactis* 33.4 µg/ml, *Staphylococcus epidermidis* 83.6 µg/ml y *Streptococcus mutans* 32K 83.6 µg/ml (Mota *et al.*, 2000). Diversas bacteriocinas poseen esta selectividad en la capacidad antimicrobiana, tal es el caso de enterocina P (Cintas *et al.*, 1997), nisina (Mota *et al.*, 2000), pediocina PA-1, sakacina P, enterocina A, curvacina A (Eijsink *et al.*, 1998) y piscicolina 126 (Wan *et al.*, 1997). Con lo cual crece su espectro de posible uso en el área de manufactura de alimentos.

Mota *et al.*, (2000) reportaron CMI mutacina B-Ny266 y nisina frente a patógenos tales como *Listeria spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria spp.* en rangos comparables a las CMI de vancomicina y oxacilina, antibióticos ampliamente empleados en el área clínica. Remarcando el potencial de uso de los péptidos de origen bacteriano.

Cintas *et al.*, (1998), reporta que la pediocina PA-1 y la enterocina L50 fueron las bacteriocinas más eficientes contra *Listeria monocytogenes*, con CMI entre 30-187 ng/ml y 151-475 ng/ml, respectivamente de entre un grupo de bacteriocinas estudiadas que incluyó nisina A. De las cepas estudiadas, la *L. monocytogenes* Scott A fue la cepa más resistente frente a la enterocina L50 y la más susceptible a pediocina PA-1.

Los resultados encontrados para el compuesto QP11 muestran inhibición completa del desarrollo frente a una variedad de cepas de *Listeria monocytogenes*, incluyendo la cepa Scott A que ha sido consistentemente señalada como resistente.

Los estudios sobre bacteriocinas utilizadas directamente en alimentos modelo han logrado solo el control del crecimiento pero no la completa erradicación de *Listeria monocytogenes* (Katla *et al.*, 2002; Loessner *et al.*, 2003; Richard *et al.*, 2003). Por

lo que deben realizarse más estudios con el compuesto QPI1, si bien los resultados sugieren interesantes propiedades.

## 6.6 Estabilidad térmica del ELCC QPI1

El cuadro 17 muestra los resultados obtenidos para la estabilidad del compuesto QPI1 a los diferentes tratamientos térmicos frente a *L. innocua*. Se observó que hasta 80° C no hubo alteración de la actividad. Los tratamientos de 100° C la redujeron 50%, mientras que el tratamiento en autoclave produjo una reducción del 75% en la actividad sin lograr eliminarla por completo.

Estos resultados fueron similares a los reportados por Jung y Paik, (2000) para la lacticina JW3 producida por *L. lactis*, los tratamientos térmicos de hasta 70° C no mostraron disminución de la actividad residual, mientras que los tratamientos superiores a 80° C mostraron descenso en la actividad. Esto mismo ocurrió cuando se aplicaron tratamientos térmicos a la nisina a pH 5 de acuerdo a Noonpakdee *et al.* (2003); la actividad resistió el 50% a 100° C por 30 min y 30% a 121° C por 15 min. La resistencia fue muy similar a la observada para QPI1 al mismo pH.

Marekova *et al.*, (2003) mostraron que las enterocinas A y P también resisten tratamientos térmicos de 60, 80 y 100° C hasta por 1 hora.

La nisina (bacteriocina clase Ia) que es la bacteriocina más ampliamente estudiada, puede resistir tratamientos térmicos de 115° C por 20 min solo cuando el pH se encuentra alrededor de 3. A pH inferiores y superiores ocurre un marcado descenso en la actividad. Por ejemplo, el mismo tratamiento térmico a pH 2 origina la pérdida del 28% de su actividad, a pH 4 un 21.4% y a pH 5 un 50% de pérdida, (Thomas, 2000). La pediocina (bacteriocina clase IIa) es estable después de un tratamiento térmico de 80° C por 60 min; la inactivación parcial ocurre a 121° C por 15 min.

CUADRO 17. Efecto de tratamientos térmicos sobre la actividad del compuesto QPI1 a pH 5.0.

TRATAMIENTO TEMP(°C)/TIEMPO (min)	ACTIVIDAD RESIDUAL AU/ml	DIÁMETRO INHIBICIÓN (mm)
Control	400	12.0
60/10	400	11.0
60/20	200	10.5
60/30	400	11.0
70/5	400	11.0
70/10	400	10.2
70/20	400	10.8
80/5	400	11.0
80/10	200	10.5
80/20	400	11.0
100/15	200	14.0
100/30	200	13.0
121/15	100	10.0

El grado de inactivación por tratamientos térmicos es menor entre los pH de 5 a 6, aunque en general la pediocina retiene su actividad bactericida en un rango de pH entre 3 y 9 (Ray y Miller, 2000). Otra de las bacteriocinas más ampliamente estudiadas, la sakacina (clase IIa) ha mostrado una elevada resistencia al calentamiento y a la acidez. Se ha reportado que todas las variantes de sakacina resisten los 100° C por 20 min y 150° C por 9 min a pH entre 2 y 9 (Leroy *et al.*, 2000).

De acuerdo con Yin *et al.* (2003), las pentocinas L y S pierden más del 80% de su actividad con tratamientos de 100° C por más de 15 min, y completamente a 121° C. Siendo el pH más estable fue entre 4 y 6.

### **6.7 Estabilidad del ELCC QPI1 a condiciones de almacenamiento**

El cuadro 18 muestra la actividad residual del compuesto QPI1 después de almacenamiento a 5° C y 20° C. A 5° C no se observó disminución de la actividad residual del compuesto QPI1 después de 25 días de almacenamiento. A 20° C actividad del ELCC QPI1 se mantuvo constante hasta el día 10, y se redujo un 50% hasta el día 25.

El incremento observado de actividad al segundo día del almacenamiento fue atribuido a una concentración por efecto de condensación de agua y ambientación de la muestra.

La nisina concentrada permanece estable por largos periodos siempre y cuando se encuentre seca, en oscuridad y a una temperatura inferior a 25° C (Thomas *et al.*, 2000).

La evaluación de la actividad en QPI1 fue llevada a cabo después de la rehidratación en solución acuosa a pH 5.5, condiciones que simularían más su incorporación a un alimento. Sin embargo se realizaron evaluaciones después de un almacenamiento del liofilizado después de 2, 3, 4 y 5 meses a -2° C y la actividad permaneció al 100% (datos no presentados).

Katla *et al.*, (2002) reportaron haber encontrado actividad residual de la sakacina P hasta 42 días posteriores a su aplicación sobre cortes de pollo refrigerados (10° C), comprobando así su elevada estabilidad.

CUADRO 18. Estabilidad del ELCC QP11 en solución durante diferentes condiciones de almacenamiento.

DIAS	20° C		5° C	
	ACTIV RESIDUAL UA/ml	DIAMETRO mm	ACTIV RESIDUAL UA/ml	DIAMETRO mm
0	400	12.5	400	12.5
2	800	10.5	800	13.0
4	400	11.5	400	12.0
7	400	12.0	400	12.0
10	400	9.0	400	9.5
14	200	10.0	400	11.0
25	200	8.0	400	10.0

Marekova *et al.* (2003) reportaron que la enterocina A y P resiste el almacenamiento a 4 y -20° C durante hasta 1 año sin descenso significativo de la actividad.

Georgalaky *et al.*, (2002), reportan para macedocina producida por *Streptococcus macedonicus* que el almacenamiento por 4 semanas a -70, -20, 4 y 30° C a diferentes pH entre 4 y 9 no afectó su actividad.

Las bacteriocinas han mostrado ser altamente estables al almacenamiento cuando se encuentran liofilizadas y el compuesto evaluado en el presente estudio no es la excepción.

### **6.8 Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana del ELCC QPI1**

El extracto concentrado QPI1 en concentración de 1580 UA/ml mostró una inhibición sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* Scott A a todos los pH evaluados de diferente magnitud en comparación con un cultivo a los mismo pH sin adición de QPI1, (Cuadro 19 y Figuras 12 a 15).

A pH 6 el cultivo control de *L. monocytogenes* tuvo un crecimiento de 2 logaritmos (Figura 13) y a pH 7 de 3 (Figura 14), mientras que a pH 5 y 9 la cuenta viable se mantuvo constante (Figuras 12 y 15). Este fenómeno es debido al efecto de pH extremo en el crecimiento de la *Listeria*. Se realizó el ajuste del pH con ác. cítrico porque este ácido, el clorhídrico y fosfórico tienen menor efecto inhibitorio sobre *L. monocytogenes* que los ácidos acético, láctico y propiónico a la misma concentración, y lo que se buscaba era la menor interferencia del ácido de ajuste para evaluar solamente el efecto de QPI1 (Jay, 2000; Branen *et al.*, 1990).

La actividad de las bacteriocinas se ha reportado estrechamente influenciada por factores ambientales tales como pH, tamaño del inóculo e interacciones con componentes alimenticios. En términos generales la actividad incrementa cuando hay un descenso en el pH y/o en el recuento del inóculo inicial. La mayoría de las bacteriocinas tanto lantibióticos como no-lantibióticos son péptidos catiónicos a pH 7, ya que sus puntos isoeléctricos están entre 8.5 y 11.

CUADRO 19. Efecto del pH sobre la adición de 1580 UA/ml de ELCC QP11 a un cultivo inicial de  $10^3$  UFC/ml de *Listeria monocytogenes* Scott A , en 7 h, a 37° C.

pH	Logaritmos de reducción respecto del control	UFC/ml al final del experimento
5	3	5
6	4	42
7	4	850
9	2.5	20

Poseen mayor carga positiva a pH menor de 5 que a pH mayor de 6, por lo que se considera tienen mayor actividad antibacterial a pH inferior de 5 que a pH fisiológico. Sin embargo la lacticina 3147 es un lantibiótico que ha mostrado mayor actividad a pH 7 que a 5 (Van Schaik *et al.*, 1999).

El pH tiene un gran impacto sobre la actividad de las bacteriocinas. El pH afecta la estabilidad del compuesto toda vez que afecta la estructura terciaria y la carga neta de las proteínas. Por otra parte el pH puede actuar sinérgica o antagónicamente con el antimicrobiano, de tal manera bajos pH mejoran el efecto antimicrobiano de las bacteriocinas en cultivos de *L. monocytogenes* (Branen, 1998).

El ELCC QPI1 mostró reducción del crecimiento de *L. monocytogenes* entre los pH 5 y 7 similares (entre 3 y 4 log figuras 12, 13 y 14). Por otra parte, tomando en cuenta en número de bacterias viables al final del experimento, se observó que a pH 5 se logró una inhibición casi total del recuento (5 UFC/ml) al cabo de 7 horas, a diferencia de lo obtenido a otros pH, (cuadro 19). Por lo tanto a pH 5 QPI1 muestra un efecto bactericida. Debe considerarse que probablemente sea el resultado de un efecto combinado con el pH ácido.

A pH 7 se tuvo la mayor cuenta viable tanto en el cultivo control como la muestra adicionada con bacteriocina,  $4.2 \times 10^6$  CFU/ml, 850 CFU/ml, respectivamente. Dichas condiciones de pH son muy favorables para el crecimiento de *L. monocytogenes* Scott A. Ésto sugiere que el compuesto antimicrobiano se enfrentó a bacterias en óptimas condiciones, y como se observa tiene capacidad para inhibirlas. Cabe hacer el señalamiento que de acuerdo a la tendencia mostrada por la figura 14, a pH 7 ya no se esperaría mayor efecto antimicrobiano del compuesto QPI1. En éste contexto el compuesto QPI1 estaría presentando un efecto bacteriostático solamente.

Diferentes estudios sobre el efecto inhibitorio de bacteriocinas contra *L. monocytogenes* han confirmado su capacidad de limitar el crecimiento pero no de eliminar por completo al microorganismo cuando son aplicadas en alimentos (Katla *et al.*, 2002; Loessner *et al.*, 2003; Richard *et al.*, 2003).



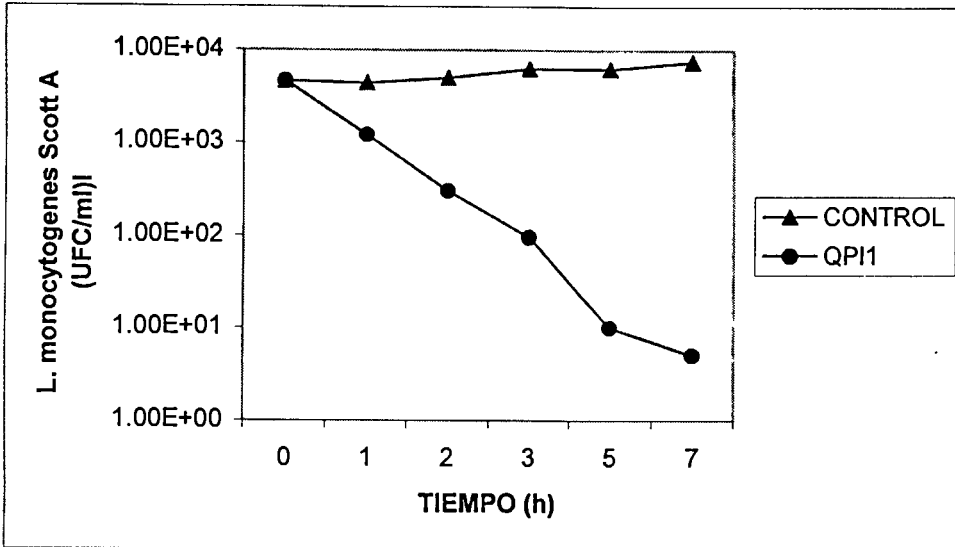


FIGURA 12. Efecto del pH 5.0 sobre la actividad antimicrobiana en líquido de ELCC QP11, utilizando *L. monocytogenes* Scott A como indicador.

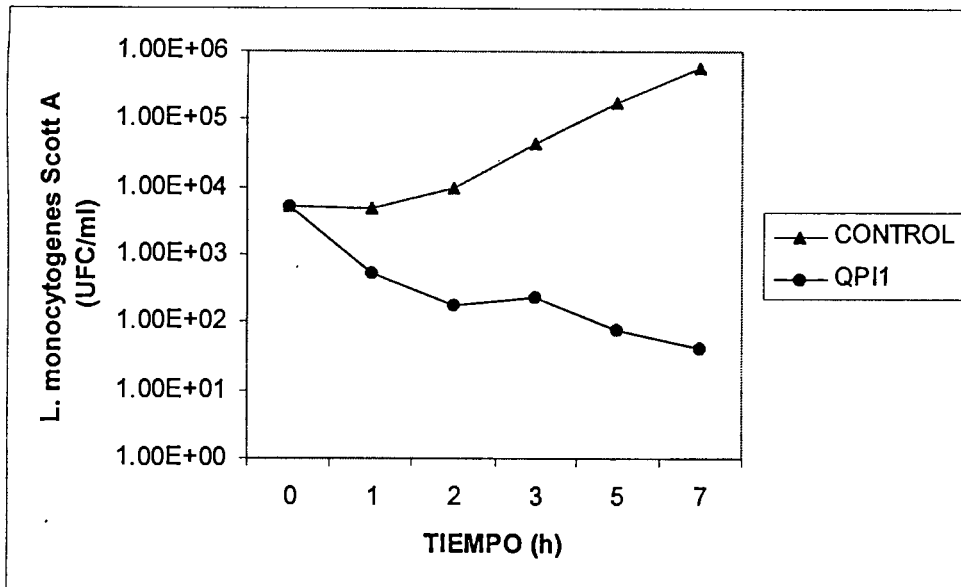


FIGURA 13. Efecto del pH 6.0 sobre la actividad antimicrobiana en líquido de ELCC QP11, utilizando *L. monocytogenes* Scott A como indicador.

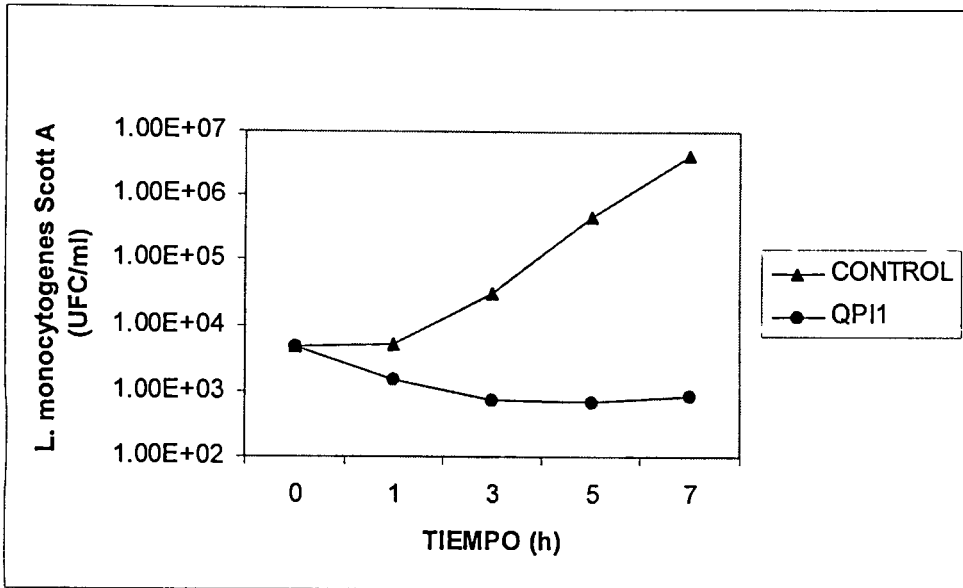


FIGURA 14. Efecto del pH 7.0 sobre la actividad antimicrobiana en líquido de ELCC QP11, utilizando *L. monocytogenes* Scott A como indicador.

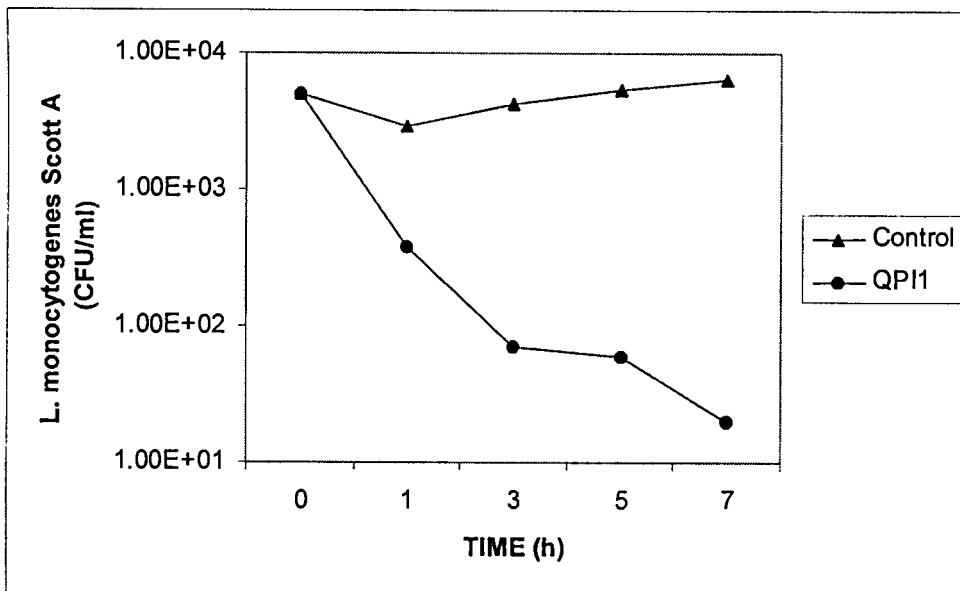


FIGURA 15. Efecto del pH 9.0 sobre la actividad antimicrobiana en líquido de ELCC QP11, utilizando *L. monocytogenes* Scott A como indicador.

Wan *et al.*(1997) con piscicolina 126, Vignolo *et al.* (2000) con nisina, lactocina 705 y enterocina CRL35 y Mathieu *et al.* (1994) con carnocina CP5, reportan un efecto anti-*L.monocytogenes* dependiente del tiempo. Inicialmente observaron una reducción significativa en la cuenta viable, pero al cabo de 24 h el recuento volvió a elevarse, aunque cabe aclarar que dichos autores trabajaron en matrices de alimentos y algunos componentes pueden interferir la acción de las bacteriocinas. Por otra parte, McAuliffe *et al.*(1999), lograron una completa inhibición de *L. monocytogenes* Scott A aplicando lacticina 3147 durante 2 h a pH 7, en queso cottage.

Van Schaik *et al.* (1999), trabajando con *L. monocytogenes* Scott A como bacteria indicadora, mostraron que a las 2 h, la nisina tiene un pronunciado efecto antimicrobiano a pH ácido (5.5) mientras que la lacticina 3147 tiene mayor efecto a pH neutro (7.0), (cuadro 20). Ambos comportamientos difieren del observado para el compuesto QPI1 a las mismas condiciones.

Por otra parte el cuadro 20 muestra los resultados para la enterocina A (Ennahar *et al.*,2000), que disminuyó el crecimiento de *L. monocytogenes* prácticamente en la misma proporción entre los pH 4 a 7.5, con un efecto ligeramente superior a pH 6.5. El compuesto QPI1 mostró un patrón de inhibición similar a pH 5 y 7 a las 5 h de incubación. Este hecho llama la atención debido a que también se trata de una enterocina

También se ha señalado que la carga de inóculo bacteriano es importante en la efectividad de las bacteriocinas. Wan *et al.*, (1997) lograron una completa inhibición de *Listeria monocytogenes* con 512 UA/ml de piscicolina 126 y carga inicial de  $10^2$  UFC/ml. Pero cuando la carga fue de entre  $10^4$ - $10^6$  UFC/ml, una administración de 8192 UA/ml solo disminuyó la cuenta viable en 4 logaritmos, pero no la completa erradicación del patógeno. Incluso a las 24 h se observó un incremento en *L. monocytogenes*.

*L. monocytogenes* ha sido aislada de ambientes donde se procesan lácteos (Loncarevic *et al.*, 1998; McAuliffe *et al.*, 1999) y en alimentos de origen vegetal

(Arvizu-Medrano *et al.*, 2001). También se ha confirmado la sobrevivencia del patógeno a diferentes procesos incluyendo la pasteurización en la elaboración de quesos mexicanos y de otras nacionalidades (Solano-López *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2001). La elevada resistencia de *L. monocytogenes* a condiciones ambientales adversas para otros microorganismos, permite la colonización una vez que los competidores han muerto. Este hecho es preocupante sobre todo ante el aumento progresivo en la demanda de alimentos refrigerados, congelados y mínimamente procesados. También se ha señalado que la acidez de los quesos logró detener el crecimiento de *L. monocytogenes*, pero éstas condiciones no son suficientes para la completa erradicación del microorganismo.

La efectividad de otros antimicrobianos como el citrato, sorbato y lactato como agentes antilisteriales se ha investigado y no tienen efecto a temperaturas de refrigeración. Por otra parte los sorbatos reducen marcadamente su efectividad a temperatura ambiente (25° C), muy probablemente por el impacto de la temperatura sobre el pKa, (McAuliffe *et al.*, 1999).

Las bacteriocinas representan una importante alternativa como bioconservador. Poseen interesantes ventajas sobre los antimicrobianos existentes: alta estabilidad al almacenamiento, no tóxicas, naturales, actúan a bajas concentraciones, no alteran notablemente las propiedades sensoriales y económicas. Sin embargo una desventaja importante es su baja efectividad contra Gram-negativos, microorganismos que en México se presentan con altas frecuencias en toxi-infecciones de origen alimentario. Un conocimiento más profundo del mecanismo de acción de las bacteriocinas permitiría conocer alternativas para poder mejorar la acción antimicrobiana de bacteriocinas contra Gram-negativos, como sugieren estudios de Ganzle *et al.*, (1999), quien ha reportado un significativo incremento en la efectividad de nisina, sakacina P y curvacina A contra *E. coli* y *Salmonella spp.* mediante adición de EDTA, propil-parabeno o NaCl.

CUADRO 20. Comparación de actividad antimicrobiana expresada como pérdida de viabilidad en logaritmos frente a *L. monocytogenes*, para diferentes bacteriocinas.

ANTIMICROBIANO	CONCENTRACIÓN	Cepa de <i>L. monocytogenes</i>	Tiempo de incubación (h)	Logaritmos de reducción pH 5- 5.5	Logaritmos de reducción pH 7
QPI1	1580 UA/ml	Scott A	2	1	1.3
Nisina <sup>1</sup>	100 UI/ml	Scott A	2	3	0.8
Lacticina 3147 <sup>1</sup>	650 UA/ml	Scott A	2	2	3
QPI1	1580 UA/ml	Scott A	5	2.8	2.8
Enterocina A <sup>2</sup>	640 UA/ml	Lm6	5	3.5	3.0

UI Actividad exhibida por 1 µg de nisina comercial Aplin en solución.

1. Van Schaik *et al.*, (1999).
2. Ennahar *et al.*, (2000).

## 6.9 Identificación de la cepa QPI1

Los resultados de las evaluaciones fenotípicas se muestran a continuación.

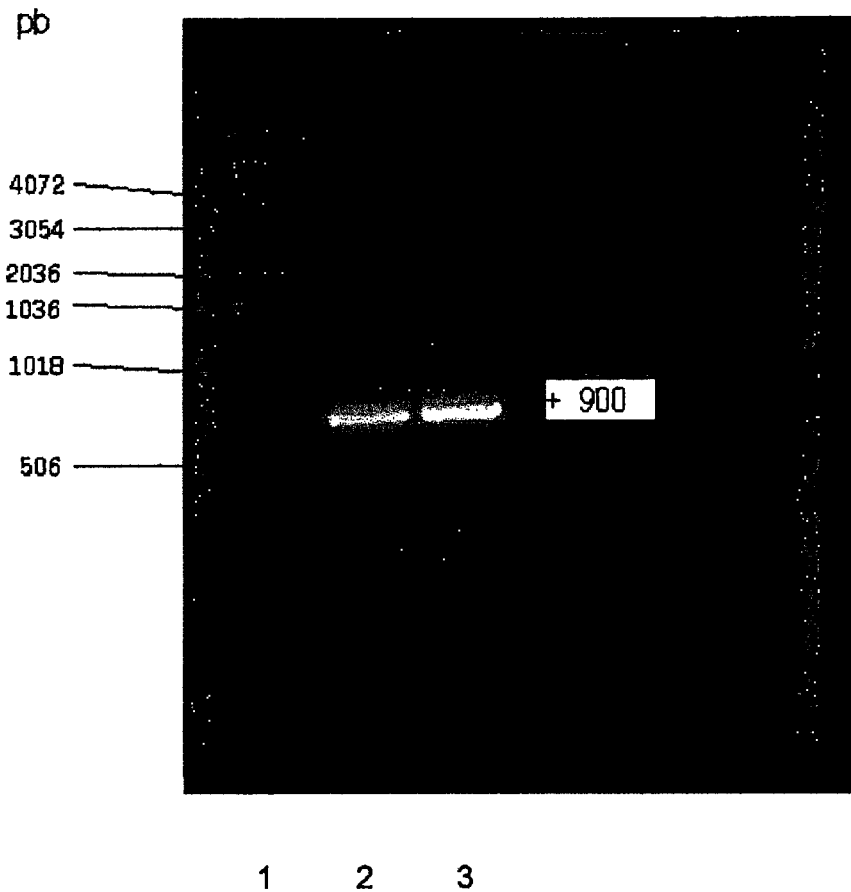
GRAM	Positivo
MORFOLOGÍA	Coco pleomórfico
CATALASA	Negativa
PRODUCCIÓN DE CO <sub>2</sub> A PARTIR DE GLUCOSA	Negativa
TOLERANCIA A 6.5% NaCl	Positiva
CRECIMIENTO A 10° C	Positiva
CRECIMIENTO A 45° C	Positiva

Basados en el esquema de clasificación para bacterias lácticas sugerido por Schillinger y Lucke, (1987), la cepa QPI1 pertenece al género *Enterococcus*.

En virtud de que no se logró la amplificación del gen 16S rRNA con primers universales (reporte Midilabs no mostrado), se utilizaron los primers específicos para el gen que codifica para la subunidad 16S rRNA de bacterias lácticas sugeridos por Pu *et al.*,(2002). Se obtuvo un producto de aproximadamente 900 pb que se procedió a clonar para posterior secuenciación (Figura 16).

La secuenciación del producto clonado tuvo 957 nucleótidos (Figura 17). La comparación de la secuencia obtenida mostró homología con genes que codifican para la subunidad 16S rRNA del *Enterococcus faecium* y *Enterococcus durans* de acuerdo al banco de secuencias del BLAST. El cuadro 21 muestra las mayores homologías obtenidas.

La figura 18 muestra la comparación de la secuencia obtenida para QPI1 con *E. faecium* y *E. durans* reportadas con mayor homología por el BLAST. Puede apreciarse que el segmento que logró alinearse es de 630 nucleótidos, desde el 49 al 679. Con *E. durans* el único nucleótido de QPI1 que no alineó fue la t en posición 575. Con *E. faecium* el único nucleótido de QPI1 que no alineó fue la t 664.



**FIGURA 16.** Banda de producto de PCR amplificado a partir de la cepa QP11. El producto se muestra en el carril 2 y 3 en gel de agarosa (aproximadamente 900 pb). El carril 1 es el marcador de peso molecular.

TCCCTCACTAAAGGGACTAGTCCTGCAGGTTTAAACGAAT  
TCGCCCTTTCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCC  
ACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGA  
CCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTA  
AGAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGG  
ACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCA  
CGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAAGG  
GATGAACAGTTACTCTCATCCTTGTTCTTCTCTAACAACAG  
AGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTT  
GCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACT  
GCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCA  
ATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTG  
GCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCAC  
CGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTC  
AAATCAAACCATGCGGTTTTGATTGTTATACGGTATTAG  
CACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTGATGGGCAGGTT  
ACCCACGTGTTACTACCCGTTCCGCACTCTTCTTTTTCC  
GGTGGA AAAAGAAGCGTTCCGACTTGCATGTATTAGGCAC  
GCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGGATCAA ACTCTCAA  
AAANGGCGAATTCGCGGCCGCTNAATTCAATTCGCCCTA  
TAGTGAGCGTATTACAATCACTGGGCGTCGNTTTACAAC  
GTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTTCCA ACTTAATCGC  
CTTGNAGCACATCCCCNTTTCAGCTGGNGTAATAACGN  
AANAGGCCCGAACCGATCGCCCTTNCCAACAGTTGCGCA  
GCCTATACGT

FIGURA 17. Secuencia de nucleotidos del fragmento amplificado de la cepa QPI1.



El *E. faecium* está ampliamente distribuido en el ambiente. Después del *E. faecalis*, *E. faecium* es la especie más frecuentemente aislada con el 5-10% de los aislamientos por *Enterococcus*. Se ha recuperado a partir de alimentos fermentados principalmente quesos, suele ser la población dominante en alimentos con procesamiento térmico ya que sobreviven al calentamiento a 60° C por 30 min. Por otra parte se la ha identificado en infecciones nosocomiales y está asociado a animales como los gatos, perros y puercos (Stiles *et al.*, 1997; Tyrrell *et al.*, 1997; Vancanneyt *et al.*, 2002).

El *E. durans* ha sufrido una historia de cambios taxonómicos. Inicialmente se encontraba en el grupo D *Streptococci*, posteriormente se sugirió colocarlo dentro de *E. faecium* patógeno y actualmente está como especie *E. durans* genéticamente relacionado con *E. hirae* (Stiles *et al.*, 1997).

La identificación no solo del género *Enterococcus spp.* sino también de las bacterias lácticas suele tener dificultades. Los métodos fenotípicos convencionales han mostrado frecuentes errores de identificación con cepas atípicas. La utilización de técnicas moleculares se convierte en indispensable para su correcta identificación.

Patel *et al.*, (1998), haciendo agrupaciones con 1,322 nucleótidos de la secuencia del gen que codifica para la subunidad 16S rRNA, señala que existe el 99.8% de homología entre las especies *E. faecium* y *E. durans*, confirmando la dificultad que se tiene en el presente estudio por diferenciar éstas dos especies mediante el gen 16S rRNA.

El género *Enterococcus spp.* tiene un rango de 37-45% molar de (G+C) (Ennahar *et al.*, 2003). Existen diferentes estudios en la búsqueda de herramientas moleculares para discriminar entre especies de *Enterococcus spp.* (Tyrrell *et al.*, 1997) enzimas de restricción. Dentro del grupo II se colocó a *E. faecium*, mientras que en el III a *E. durans*. Monstein *et al.*, (1998) agruparon a los *Enterococcus spp.* en 12 diferentes grupos, *E. faecium* grupo b y *E. durans* en el grupo e, de acuerdo a análisis por RAPD de un fragmento de 440 pb del 16S rRNA. Ambos sugieren sutiles diferencias genéticas entre dichas especies.

CUADRO 21. Homologías representativas entre el fragmento de la cepa QP11 y las secuencias depositadas en la base de datos del BLAST.

SECUENCIA BLAST	MICROORGANISMO	HOMOLOGÍA	CONCORDANCIA DE NUCLEÓTIDOS
AY172570	<i>Enterococcus faecium</i>	99%	630/631
AJ420800	<i>Enterococcus faecium</i>	99%	630/631
AF061000	<i>Enterococcus durans</i>	99%	630/631
Y18359	<i>Enterococcus durans</i>	99%	630/631
AJ276354	<i>Enterococcus durans</i>	99%	630/631
AF039901	<i>Enterococcus faecium</i>	99%	629/631
AJ420801	<i>Enterococcus durans</i>	99%	629/631
AF070223	<i>Enterococcus faecium</i>	99%	629/631

(1997) clasifica las diferentes especies en 3 grupos de acuerdo a los perfiles de amplificación del espacio intergénico 16S-23SrRNA y posterior digestión con La utilización de los genes 16S y 23S rRNA que han sido los más empleados para identificación de bacterias y hongos, en el caso particular de *Enterococcus spp.* se ha señalado que muestran mínima variabilidad entre especies lo que dificulta la diferenciación. Por tal motivo se han sugerido otros genes como los genes asociados a resistencia a vancomicina, gen *tuf*, y el espacio intergénico 16S – 23S rRNA, o bien otras metodologías moleculares como RAPD y RFLP (Dutka *et al.*, 1995; Monstein *et al.*, 1998; Tyrrell *et al.*, 1997; Ke *et al.*, 1999; Vancanneyt *et al.*, 2002). Sin embargo éstas metodologías requieren de mayor inversión e infraestructura, no están completamente estandarizadas y ni ampliamente difundidas.

La importancia en la identificación en particular de la cepa QPI1 es debido a que el género *Enterococcus spp.* ha asociado a cepas patógenas resistentes a antibióticos cada vez con mayor frecuencia. Los estudios de Vancanneyt *et al.*, (2002) muestran que existen diferencias en los perfiles genéticos obtenidos mediante AFLP y RAPD de cepas provenientes de origen humano y animal comparado con las provenientes de alimentos. Esta especificidad por nicho ecológico se le llama ecovar.

Es indispensable encontrar los ecovares específicos que nos permitan saber cuales de las bacterias lácticas son patógenas y cuales se pueden emplear como cultivo iniciador o probiótico. Con respecto a la producción de antimicrobiano, es probable que la simple separación de las células permitan el empleo en el área de alimentos.

FIGURA 18. Comparación de la secuencia obtenida para QP11 contra *E. faecium* y *E. durans* reportadas con mayor homología por el BLAST.

*E. faecium*  
 Query: 49 tctacgcatttcaccgctacacatggaattccactctcctcttctgactcaagtctccc 108  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 718 tctacgcatttcaccgctacacatggaattccactctcctcttctgactcaagtctccc 659

*E. durans*  
 Query: 49 tctacgcatttcaccgctacacatggaattccactctcctcttctgactcaagtctccc 108  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 686 tctacgcatttcaccgctacacatggaattccactctcctcttctgactcaagtctccc 627

*E. faecium*  
 Query: 109 agtttccaatgaccctccccggttgagccgggggctttcacatcagacttaagaaaccgc 168  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 658 agtttccaatgaccctccccggttgagccgggggctttcacatcagacttaagaaaccgc 599

*E. durans*  
 Query: 109 agtttccaatgaccctccccggttgagccgggggctttcacatcagacttaagaaaccgc 168  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 626 agtttccaatgaccctccccggttgagccgggggctttcacatcagacttaagaaaccgc 567

*E. faecium*  
 Query: 169 ctgctgctcgctttacgccaataaatacggacaacgcttgccacctacgtattaccgcgg 228  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 598 ctgctgctcgctttacgccaataaatacggacaacgcttgccacctacgtattaccgcgg 539

*E. durans*  
 Query: 169 ctgctgctcgctttacgccaataaatacggacaacgcttgccacctacgtattaccgcgg 228  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 566 ctgctgctcgctttacgccaataaatacggacaacgcttgccacctacgtattaccgcgg 507

*E. faecium*  
 Query: 229 ctgctggcacgtagttagccgtggctttctggtagataccgtcaagggatgaacagtta 288  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 538 ctgctggcacgtagttagccgtggctttctggtagataccgtcaagggatgaacagtta 479

*E. durans*  
 Query: 229 ctgctggcacgtagttagccgtggctttctggtagataccgtcaagggatgaacagtta 288  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct: 506 ctgctggcacgtagttagccgtggctttctggtagataccgtcaagggatgaacagtta 447

*E. faecium*

Query: 289 ctctcatccttggtcttctctaacaacagagttttacgatccgaaaaccttcttactca 348  
|  
Sbjct: 478 ctctcatccttggtcttctctaacaacagagttttacgatccgaaaaccttcttactca 419

*E. durans*

Query: 289 ctctcatccttggtcttctctaacaacagagttttacgatccgaaaaccttcttactca 348  
|  
Sbjct: 446 ctctcatccttggtcttctctaacaacagagttttacgatccgaaaaccttcttactca 387

*E. faecium*

Query: 349 cgcggcggttgctcggtcagactttcgtccattgccgaagattccctactgctgcctcccg 408  
|  
Sbjct: 418 cgcggcggttgctcggtcagactttcgtccattgccgaagattccctactgctgcctcccg 359

*E. durans*

Query: 349 cgcggcggttgctcggtcagactttcgtccattgccgaagattccctactgctgcctcccg 408  
|  
Sbjct: 386 cgcggcggttgctcggtcagactttcgtccattgccgaagattccctactgctgcctcccg 327

*E. faecium*

Query: 409 taggagtttgggccgtgtctcagtcccaatgtggccgatcacctctcaggctcggtatg 468  
|  
Sbjct: 358 taggagtttgggccgtgtctcagtcccaatgtggccgatcacctctcaggctcggtatg 299

*E. durans*

Query: 409 taggagtttgggccgtgtctcagtcccaatgtggccgatcacctctcaggctcggtatg 468  
|  
Sbjct: 326 taggagtttgggccgtgtctcagtcccaatgtggccgatcacctctcaggctcggtatg 267

*E. faecium*

Query: 469 catcgtggccttggtgagccgttacctcaccaactagctaatagcaccgcggtccatcca 528  
|  
Sbjct: 298 catcgtggccttggtgagccgttacctcaccaactagctaatagcaccgcggtccatcca 239

*E. durans*

Query: 469 catcgtggccttggtgagccgttacctcaccaactagctaatagcaccgcggtccatcca 528  
|  
Sbjct: 266 catcgtggccttggtgagccgttacctcaccaactagctaatagcaccgcggtccatcca 207

*E. faecium*

Query: 529 tcagcgacaccgaaagcgcctttcaaatcaaaacatgcggttttgattggtatacgg 588  
|  
Sbjct: 238 tcagcgacaccgaaagcgcctttcaaatcaaaacatgcggttttgattggtatacgg 179

*E. durans*

Query: 529 tcagcgacaccgaaagcgcctttcaaatcaaaacatgcggttttgattggtatacgg 588  
|  
Sbjct: 206 tcagcgacaccgaaagcgcctttcaaatcaaaacatgcggtttcgattggtatacgg 147

\*

*E. faecium*

Query: 589 attagcacctgttccaagtgttatccccttctgatgggcagggtaccacgtgttactc 648  
|||||  
Sbjct: 178 attagcacctgttccaagtgttatccccttctgatgggcagggtaccacgtgttactc 119

*E. durans*

Query: 589 attagcacctgttccaagtgttatccccttctgatgggcagggtaccacgtgttactc 648  
|||||  
Sbjct: 146 attagcacctgttccaagtgttatccccttctgatgggcagggtaccacgtgttactc 87

*E. faecium*

Query: 649 acccgttcgccactcttctttttccggtgga 679  
|||||  
Sbjct: 118 acccgttcgccactcttctttttccggtgga 88

\*

*E. durans*

Query: 649 acccgttcgccactcttctttttccggtgga 679  
|||||  
Sbjct: 86 acccgttcgccactcttctttttccggtgga 56

\* Señala la posición que no alinea entre el segmento secuenciado de QP11 y los microorganismos referidos por el BLAST.

## 7. CONCLUSIONES

- Se encontró que más de la mitad de las cepas BAL aisladas de alimentos mexicanos estudiados, poseen la capacidad de inhibir el desarrollo de microorganismos. Es necesario ampliar el conocimiento sobre la diversidad microbiana de BAL en alimentos mexicanos para obtener cepas potencialmente útiles como bioconservadores de alimentos o bien antimicrobianos en clínica.
- La cepa QPI1 produjo un compuesto de naturaleza protéica con actividad antimicrobiana contra Gram-positivos.
- Estudios sobre la actividad antimicrobiana de QPI1 para inhibir el crecimiento de diferentes cepas de *L. monocytogenes* mostraron que existe gran variación en la sensibilidad de las cepas de *Listeria*: *L. monocytogenes* Scott A (MIC= 1582 UA/ml), *L. monocytogenes* 7644 (MIC= 11.5 UA/ml).
- El compuesto QPI1 mostró inhibir el crecimiento de la cepa más resistente de *L. monocytogenes* evaluada en todos los pH evaluados (5, 6, 7 y 9). La actividad lograda por 1580 UA/ml de QPI1 se observó en un amplio rango de pH entre 5 a 7.
- El extracto concentrado de QPI1 mantuvo la actividad antimicrobiana después de tratamientos térmicos de 100° C 30 min y 121° C por 15 min, así como por periodos de almacenamiento prolongados a 4 y 20° C.
- La cepa productora del compuesto QPI1 pertenece al género *Enterococcus* de la especie *faecium* o *durans*.
- El compuesto QPI1 muestra características de estabilidad y potencia interesantes para considerarse como bioconservador de alimentos.

## 8. REFERENCIAS

- Arvizu-Medrano, S, Iturriaga, M, Escartín, E. 2001. Indicator and pathogenic bacteria in guacamole and their behavior in avocado pulp. *J Food Safety* 21:233-244.
- Axelsson L. 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology en: Salminen y Von Wright (editores), *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker New York, pp. 1-60.
- BAM, Bacteriological Analytical Manual. 1999. 8a. ed. FDA, AOAC International, Arlington. Ap 3:69-70.
- AOAC, 1995. International bacteriological analytical manual. Food and Drug Administration. 8<sup>th</sup> ed, Gaithersburg, USA:
- Ben, N, Ampe, F. 2000. Microbial community dynamics during production of the mexican fermented maize dough pozol. *Appl Environ Microbiol*. 66:3664-3673.
- Benkerroum N, Oubel H, Zahar M, Dlia A, Filali S. 2000. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. *J Appl Microbiol* 89:960-968.
- Beuchat LR, Ryu JH. 1997. Produce handling and processing practices. *Emerging Infect Dis* 3:459-465.
- Bhunja AK, Johnson MC, Ray B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J Appl Bacteriol* 65:261-268.
- Branen L, Davidson M, Salminen S. 1990. *Food Additives*. Marcel Dekker. New York. pp. 2-80, 570, 639.
- Breukink E, Wiedemann I, van Kraaij C, Kuipers OP, Sahl H, de Kruijff B. 1999. Use of the cell wall precursor Lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286:2361-2364.
- British Standards. 1974. *Technical Indexes*, Bracknell, Berks, England. BS 4020.
- Cabo, ML, Braber, A, Koenraad, P. 2002. Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the médium. *J Food Prot*;65:1309-1316.
- Cañas A, Bárzana E, Owens J, Wachter M. 1993. Estudio de la variabilidad en los métodos de producción de pozol en los altos de Chiapas. En: : Wachter M, Lappe P. *Alimentos fermentados indígenas de México*. UNAM. México. Pp. 69-74.
- CDC, 1999. *Foodborne diseases active surveillance network (FoodNet): population survey atlas of exposures: 1998-1999*. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, GA.
- Cintas L, Casaus M, Herranz C, Nes I, Hernández P. 2001. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci Tech Int* 7:281-305.
- Cintas L, Casaus P, Fernández, MF., Hernández P. 1998. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol* 15:289-298.



- Cintas L, Casaus P, Havarstein LS, Hernández P, Nes I. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl Environ Microbiol* 63:4321-4330.
- Cleveland J, Montville T, Nes I, Chikindas M. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* 71:1-20.
- Corsetti A, Globetti M, Smacchi E. 1996. Antibacterial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C57. *Food Microbiology* 13:447-456.
- Cuozzo S, Castellano P, Sesma F, Vignolo G, Raya R. 2003. Differential roles of the two-component peptides of Lactocin 705 in antimicrobial activity. *Curr Microbiol* 46:180-183.
- Daba H, Pandian S, Gosselin J, Simard R, Huang J, Lacroix C. 1991. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl Environ Microbiol* 57:3450-3455.
- Daeschel M. 1992. Procedures to detect antimicrobial activities of microorganisms en: Bibek R., Daeschel M (editores). *Food biopreservatives of microbial origin*. CRC press. Pp. 57-77.
- Daeschel MA, Penner MH. 1992. Hydrogen peroxide, lactoperoxidase systems, and reuterin en: Bibek R., Daeschel M. *Food biopreservatives of microbial origin*. CRC press. México. 57-77.
- Dalet K, Cenatiempo Y, Cossart P, Héchard Y. 2001. A  $\sigma^{54}$ -dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiol* 147:3263-3269.
- Davidson PM, Parish ME. 1989. Method for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol* 148-155.
- Del Campo R, Tenorio C, Jiménez R, Rubio C, Gómez R, Baquero F, Torres C. 2001. Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 45:905-912.
- Dennis, C., Stringer, M. 1992. *Chilled Foods a comprehensive guide*. Pp. 230.
- Diario Oficial de la Federación. 1988. 18-01-88. México D.F.
- Díaz C y González B. 2001. *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. *Rev Salud Pública Nut. En línea*. Vol.2, No. 3.
- Dutka, S., Evers, S., Courvalin, P. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 33:24-27.
- Eijsink V, Skeie M, Middelhoven H, Brurberg M, Nes I. 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 64:3275-3281.
- Elotmani F, Revol-Junelles A, Assoghei O, Milliere J. 2002. Characterization of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocins from *Enterococcus faecium*, and *Lactococcus lactis* strains isolated from Raib, a Moroccan traditional fermented milk. *Curr Microbiol*. 44:10-17.

- Ennahar S, Cai Y, Fujita Y. 2003. Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. *Appl Environ Microbiol* 69:444-451.
- Ennahar S, Deschamps N, Richard J. 2000a. Natural variation in susceptibility of *Listeria* strains to class IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol.* 41:1-4.
- Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K, Ishizaki A. 2000b. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev* 24:85-106.
- Enserink, M. 1999. Promising antibiotic candidate identified. *Science* 286:2245-2247.
- Escamilla M, Prado L, Baca A, Velásquez J. 1993. Determinación del efecto del basawí en cultivos axénicos de cepas aisladas del tesguino. En: Wachter M, Lappe P. Alimentos fermentados indígenas de México. UNAM. México. 87-91.
- Fariás M, Ruiz A, Sesma F. 1994. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheeses: Inhibition of foodborne pathogens. *J Food Prot* 57:1013-1015.
- Feord J. 2002. Lactic acid bacteria in a changing legislative environment. *Antonie van Leeuwenhoek* 82:353-360.
- Fisher ChW, Lee D, Dodge B, Hamman K, Robbins J, Martin S. 2000. Influence of catalase and superoxide dismutase on ozone inactivation of *L. monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 66:1405-1409.
- Franz C, Schillinger U, Holzapfel W. 1996. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int J Food Microbiol* 29:255-270.
- García-Almendárez B, Ibarra-Silva J, Mayorga L, Domínguez J, Regalado C. 2002. Modeling conditions affecting the production of a bacteriocin by *Enterococcus faecium* UQ1 and the kinetics of the bacteriocin antilisterial activity. In: Welti-Chanes J, Barbosa G, Aguilera J. as editors. Engineering and food for the 21<sup>st</sup> century. CRC press. pp 927-946.
- Gänzle M, Weber S, Hammes W. 1999. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *Int J Food Microbiol* 46:207-217.
- Georgalaki MD, Van den Berghe E, Kritikos D, Devreese B, Van Beeumen J, Kalantzopoulos G, De Vuyst L, Tsakalidou E. 2002. Macedocin, a food-grade antibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Appl Environ Microbiol* 68:5891-5903.
- Gibson D. 1990. Pathogenic bacteria in chilled foods en: Zeuthen P, Cheftel J, Eriksson C, Gormley T, Linko P, Paulus K (editores). Processing and quality of Foods. Vol. 3. Elsevier London. 3.53-3.67.
- Giono S, Escobar A, Valdespino J. 1994. Diagnóstico de laboratorio de las infecciones gastrointestinales. INDRE. México. Pp. 3-50.
- Gravesen A, Ramnath M, Rechinger B, Andersen N, Jansch L, Héchar Y, Hastings J, Knochel S. 2002. High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiol* 148:2361-2369.
- Harris LJ, Daeschel MA, Stiles ME, Klaenhammer TR. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 52:384-387.

- Hécharad Y, Sahl H. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* 84:545-557.
- Herranz C, Cintas L, Hernández P, Moll G, Driessen A. 2001a. Enterocin P Causes potassium ion efflux from *Enterococcus faecium* T136 cells. *Antimic Ag Chemother* 45:901-904.
- Herranz C, Chen Y, Chung H, Cintas L, Hernández P, Montville T, Chikindas M. 2001b. Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of *Enterococcus faecium* T136. *Appl Environ Microbiol* 67:1689-1692.
- Herranz C, Casaus P, Mukhopadhyay S, Martínez J, Rodríguez J, Nes I, y col. 2001c. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocina a and enterocin B. *Food Microbiol* 18:115-131.
- Herranz C, Martínez J, Rodríguez J, Hernández P, Cintas L. 2001d. Optimización of enterocin P production by batch fermentation of *enterococcus faecium* P13 at constant pH. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:378-383.
- Herrera T. 1993. Semblanza del estudio de las bebidas y de los alimentos fermentados mexicanos en: Wachter M, Lappe P. Alimentos fermentados indígenas de México. UNAM. México. 21-27.
- Holbrook, R. 2000. Detection of microorganisms in foods, principles of culture methods en: Lund B, Baird-Parker T, Gould G (editors). The microbiological safety and quality of food. Vol II. Aspen publications. Maryland. pp 1770-1783.
- Hoover D.G. 1993. Bacteriocins with potential for use in foods. En: Davidson P, Branen L. editores. Antimicrobials in foods. 2a. edición, Marcel Dekker, New York. Pp. 409-440.
- Hoover D, Steenson L. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Academic press, San Diego. pp 6 y 23-32.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. National Center for Biotechnology Information.
- <http://www.fsis.usda.gov>. Food safety and inspection service. United States Department of agriculture.
- Jack RW, Tagg JR, Ray B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* 59:171-200.
- Jay J, 2000. *Modern Food Microbiology*. 6ª ed. Aspen, Maryland. pp. 35-44, 131-146.
- Jung M, Paik H. 2000. Identification and partial characterization of Lacticin JW3, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* JW3 isolated from commercial swiss cheese products. *Food Sci Biotechnol* 9:116-123.
- Katla T, Moretro T, Svein I, Aasen IM, Axelsson L, Rorvik LM, Naterstad K. 2002. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in chicken cold cuts by addition of sakacin P and sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*. *J Appl Microbiol* 93:191-196.
- Kazazic M, Nissen-Meyer J, Fimland G. 2002. Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of the pediocin-like sakacin P. *Microbiology* 148:2019-2027.
- Ke D, Picard, F, Martineau F, Menard Ch, Roy, P, Ouellette, M, Bergeron, M. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. *J Clin Microbiol* 37:3497-3503.

- Klaenhammer TR. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 12:39-85.
- Krier F, Revol-Junelles AM, Germain P. 1998. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 50:359-363.
- Kyzlink, V. 1990. Principles of food preservation. Elsevier. Amsterdam. pp. 529-536.
- Lappe P, Ulloa M. 1993. Microbiología del pulque. En: Wachter M., Lappe P. Alimentos fermentados indígenas de México. UNAM. México. 74-79.
- Laskowski M. 1955. Tripsinogen and Tripsin en: Colowick SP y Kaplan NO (editors). *Methods in enzymology* vol 2. Academic Press. Pp.32- 33.
- Leroy F y De Vuyst L. 1999. Temperature and pH conditions that prevail during fermentarion of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin Sakacin K. *Appl Environ Microbiol* 65:974-981.
- Leroy F y De Vuyst L. 2000. Sakacins en: Naidu AS editor. Natural food antimicrobial systems. CRC press. Washington. 589-636.
- Leroy F and De Vuyst L. 2002. Bacteriocin produciton by *Enterococcus faecium* RZSC5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. *Int. J. Food Microbiol.* 72:155-164.
- Leroy F, Vankrunkelsven S, De Greef J, De Vuyst L. 2003. The stimulating effect of a harsh environmental on the bacteriocin activity by *Enterococcus faecium* RZS C5 and dependency on the environmental stress factor used. *Int J Food Microbiol* 83:27-38.
- Lewus C, Montville T. 1991. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J Microbiol Meth.* 143-150.
- Loessner M, Guenther S, Steffan S, Scherer S. 2003. A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. *Appl Environm Microbiol* 69:1854-1857.
- Loncarevic, S., Bannerman, E., Bille, J., Danielsson, M, Tham, W. 1998. Characterization of *Listeria* strains isolates from soft and semi-soft cheeses. *Food Microbiol* 15:521-525.
- López, J, González M, Figueroa G, Medrano R, Carranza J. 2000. Calidad sanitaria de las salsas crudas y cocidas en 50 restaurantes de la ciudad de Morelia. *Med Interna Méx* 16:174-176.
- Madigan, M., Martinko J., Parker J. 1998. Brock Biología de los Microorganismos. Prentice Hall. 8ª. ed. pp 70-81, 431-437, 537-542.
- Mareková M, Laukova A, De Vuyst L, Skaugen M, Nes I. 2003. Partial characterization of bacteriocins produced by environmental strain *Enterococcus faecium* EK13. *J Appl Microbiol* 94:523-530.
- Martínez C, Requena T, Peláez C. 2002. Effect of bacteriocin-induced cell damage on the branched-chain amino acid transamination by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett* 217:109-113.
- Mathieu, F., Michel, M, Lebrihi, A., Lefebvre, G. 1994. Effect of the bacteriocin carnocin CP5 and of the producin strain *Carnobacterium piscicola* CP5 on the viability of *L. monocytogenes* ATCC 15313 in salt solution, broth and

- skimmed milk, at various incubation temperatures. *Int J Food Microbiol* 22:155-172.
- Mayr-Harting A., Hedges A., Berkeley R. 1972. Methods for studying bacteriocins. *Meth Microbiol Chap VII, Vol 7A*. Academic press. London. Pp. 316-370.
- McAuliffe O, Hill C, Ross R. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lacticin 3147-producing starter culture. *J Appl Microbiol* 86:251-256.
- McAuliffe O, Ross RP, Hill C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev* 25:285-308.
- Messens W, Verluyten J, Leroy F, De Vuyst L. 2003. Modelling growth and bactericin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation process. *Int J Food Microbiol* 81:41-52.
- Mijares I. 1993. Mestizaje alimentario. Facultad de filosofía y letras, UNAM. México. Pp. 151-153.
- Monstein H, Quednau M, Samuelsson A, Ahrné S, Isaksson B, Jonasson J. 1998. Division of the genus *Enterococcus* into species groups using PCR-based molecular typing methods. *Microbiol* 144:1171-1179.
- Montville T, Chen Y. 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Appl Microbiol Biotechnol* 50:511-519.
- Montville T, Winkowski K. 1997. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In: Doyle, M., Beuchat, L., Montville, T. (eds.). *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*. ASM press. Washington D.C. pp 557-577.
- Moreno FM, Callewaert R, Devreese B, Van Beeumen J, De Vuyst L. 2003a. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *J Appl Microbiol* 94:214-229.
- Moreno MR, Rea MC, Cogan TM, De Vuyst L. 2003b. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *Int J Food Micr.* 81:73-84.
- Moreno M, Leisne, J, Tee L, Ley C, Radu S, Rusul G, Vancanneyt M, De Vuyst L. 2002. Microbial análisis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocinas produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *Jour Appli Microbiol.* 92:147-157.
- Morgan F, Bonnín V, Mallereau M, Perrin G 2001. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. *Int J Food Microbiol* 64:217-221.
- Morovsky M, Pristas P, Javorský P, Nes I, Holo H. 2001. Isolation and characterization of enterocin BC25 and occurrence of the entA gene among ruminal gram-positive cocci. *Microbiol Res.* 156:133-138.
- Mortvedt C, Nissen J, Jelle B, Grenov B, Skaugen M, Nes I. 1995. Production and pH-dependent bactericidal activity of Lactocin S, an lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. *Appl Environ Microbiol* 61:175-179.
- Mota-Meira M, LaPointe G, Lacroix Ch, Laroie M. 2000. MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrob Ag Chemother* 44:24-29.

- Naidu AS y Clemens RA. 2000. Probiotics en: Naidu AS editor. Natural food antimicrobial systems. CRC press. Washington. Pp. 432-462.
- Nel HA, Bauer R, Vandamme EJ, Dicks LM. 2001. Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB 1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. *J Appl Microbiol* 91:1131-1138.
- Nes I, Holo H. 2000. Class II Antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* 55:50-61.
- Neysens P, Messens W, Gevers D, Swings J, De Vuyst L. 2003. Biphasic kinetics of growth and bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 occur under stress conditions. *Microbiology* 149:1073-1082.
- Nguyen-the C, Carlin F. 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Crit Rev Food Sci Nutr* 34:371-401.
- Noonpakdee W, Santivarangkna C, Jumriangrit P, Sonomoto K, Panyim S. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from *nham*, a traditional Thai fermented sausage. *Int J Food Microbiol* 81:137-145.
- Omar N y Ampe F. 2000. Microbial community dynamics during production of the mexican fermented maize dough pozol. *Appl Environ Microbiol* 66:3664-3673.
- Onda T, Yanagida F, Uchimura T, Tsuji M, Ogino S, Shinohara T, Yokotsuka K. 2002. Widespread distribution of the bacteriocin-producing lactic acid cocci in Miso-paste products. *J Appl Microbiol* 92:695-705.
- O'Sullivan L, Ross RP, Hill C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84:593-604.
- Patel R, Piper K, Rouse M, Steckelberg J, Uhl J, Uhl J, Kohner P. 1998. Determination of 16S rRNA sequences of Enterococci and application to species identification on nonmotile *Enterococcus gallinarum* isolates. *J Clin Microbiol* 36:3399-3407.
- Pu Z, Dobos M, Limsowtin G, Powell I. 2002. Integrated polymerase chain reaction-based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the Gram-positive bacterial genus *Lactococcus*. *J App Microb* 93:353-361.
- Ramnath M, Beukes M, Tamura K, Hastings J. 2000. Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 66:3098-3101.
- Rasch M, Knochel S. 1998. Variation in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocina PA-1 and bavaricin A. *Lett Appl Microbiol* 27:275-278.
- Ray B, Miller K. 2000. Pediocin en: Naidu AS editor. Natural food antimicrobial systems. CRC press. Washington. 525-566.
- Ray B, Daeschel M. 1992. Food biopreservatives of microbial origin. CRC press. Florida. pp 57-63, 177-197.
- Richard C, Brillet A, Pilet MF, Prévost H, Drider D. 2003. Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action. *Lett Appl Microbiol* 36:288-292.
- Riley M, Wertz J. 2002. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* 84:357-364.

- Rubio M, Lappe P, Wacher C. 1993. Estudio microbiano y químico de la fermentación de soluciones de piloncillo inoculadas con tибicos. En: Wacher M., Lappe P. Alimentos fermentados indígenas de México. UNAM. México. Pp 93-97.
- Salminen S y Von Wright A. 1998. Lactic Acid Bacteria, microbiology and functional aspects. Marcel Dekker. New York. Pp 1-6.
- Schillinger U, Geisen R, Holzappel W. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. Trends Food Sci Technol Vol 7.
- Schillinger U, Lucke F. 1987. Identification of *Lactobacilli* from meat and meat products. Food Microbiol 4:199-208.
- SSA. 1999. Mortalidad 1998, contexto actual y aspectos relevantes. Dirección general de estadística e informática. Secretaría de Salud. México D.F. pp. 40
- SSA. 2002a. Estadísticas en Salud, Boletín epidemiológico de la vigilancia hasta la semana 23. Sistema único de información para la Vigilancia Epidemiológica. Secretaría de Salud. <http://www.ssa.gob.mx/unidades/epide/2002/sem23/>.
- SSA. 2002b. Principales causas de mortalidad general en México 1999. Secretaría de Salud. <http://www.ssa.gob.mx>
- Solano, C., Hernández, H. 2000. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of manchego and Chihuahua Mexican cheese. Int J Food Microbiol 62:149-153.
- Stecchini M, Aquili V, Sarais I, Pitotti A. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* isolated from Italian raw ham. J Food Safety 12:295-302.
- Steinkraus, K. 1992 Lactic Acid Fermentations in: report of an *Ad Hoc* Panel of the board on science and technology for international development. National Academy press. Washington. Pp 43-65.
- Steinkraus K. 1993. Fermented foods of the world en: Wacher M., Lappe P. Alimentos fermentados indígenas de México. UNAM. México. pp 5-9.
- Stiles, M., Holzappel, W. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int J Food Microbiol 36:1-29.
- Thomas L, Clarkson M, Delves J. 2000. Nisin en: Naidu AS editor. Natural food antimicrobial systems. CRC press. Washington. Pp. 463-524.
- Twomey D, Ross RP, Ryan M, Meaney B, Hill C. 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. Antonie van Leeuwenhoek 82:165-195.
- Tyrrell, G., Bethune, R., Willey, B., Low, D. 1997. Species identification of *Enterococci* via ribosomal PCR. J Clin Microbiol 35:1054-1060.
- Valdespino J, García M, Del Río A, Arturo R. 1994. Magnitud y trascendencia de las infecciones gastrointestinales. En: Giono S, Escobar A, Valdespino J. Diagnostico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Secretaría de Salud, INDRE. México. 3-50.
- Van den Berg, D., Smits, A., Pot, B., Ledebøer, A., Kersters, K., Verbakel, J., Verrips, T. 1993. Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections. Food Biotechnol 7:189-205.

- Van der Goot F. 2003. Membrane-damaging toxins: pore formation en: Burns D, Barbieri J, Iglewski B, Rappuoli R (editores). Bacterial protein toxins. ASM press. Washington DC. Pp.189-193.
- Van Heusden HE, de Kruijff B, Breukink E. 2002. Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore-forming peptide lantibiotic nisin. *Biochemistry* 41:12171-12178.
- Van Schaik, W., Gahan, C., Hill, C. 1999. Acid-adapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance against the lantibiotics nisin and lactacin 3147. *J Food Protect* 62:536-539.
- Vancanneyt, M., Lombardi, A., Andrighetto, Ch., Knijff, E., Torriani, S., Bjorkroth, K., et.al. 2002. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Appl Environ Microbiol* 68:1381-1391.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60:407-438.
- Vignolo G, Palacios, J., Farías, M., Sesma, F., Schillinger, U., Holzapfel, W, Oliver, G. 2000. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Curr Microb* 41:410-416.
- Wan J., Harmark, K., Davidson, BE., Hillier, AJ., Gordon, JB., Wilckok, A., Hickey, MW., Coventry, MJ. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by piscicolin 126 in milk and camambert cheese manufactured with a thermophilic starter. *J Appl Microbiol* 82: 273-280.
- Weidemann I, Breukink E, van Kraaij C, Kuipers OP, Bierbaum G, de Kruijff B, Sahl H. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor Lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J Biol Chem* 276:1772-1779.
- Wessels S, Jelle B, Nes I. 1998. Bacteriocins of the lactic acid bacteria: an overlooked benefit for food. Danish toxicology centre. Denmark. pp. 2-3.
- Williams-Campbell, A., Jay, J. 2002. Effects of diacetyl and carbon dioxide on spoilage microflora in ground beef. 65:523-527.
- Wood B. 1999. The lactic acid bacteria in health and disease. Aspen publication. Gaithersburg. Pp. 193-232.
- Wood, B., Holzapfel, W. 1995. The genera of lactic acid bacteria. Blackwell Academic & Professional. Gran Bretaña. Pp. 7-17.
- Yang R, Ray B. 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol* 11:281-291.
- Yang, Z. 2000. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. University of Helsinki. Ph, Tesis. Helsinki.
- Yin L, Wu Ch, Jiang S. 2003. Bacteriocins from *Pediococcus pentosaceus* L and S from pork meat. *J Agric Food Chem*. 51:1071-1076.
- Zakharov S, Cramer W. 2002. Colicin crystal structures: pathways and mechanisms for colicin insertion into membranes. *Biochim Biophys Acta* 1565: 333-346.



## APENDICE I

### TINCIÓN DE GRAM

#### COLORANTES

##### Cristal Violeta

##### Solución A

Cristal violeta (90% contenido seco)	2 g
Etanol 95%	20 ml

##### Solución B

Oxalato de amonio	0.8 g
Agua destilada	80 ml

Mezclar las soluciones A y B. Almacenar 24 hrs. y filtrar con papel filtro.

##### Yoduro de Gram

Yodo	1 g
Yoduro de potasio (KI)	2 g
Agua destilada	300 ml

Colocar el KI en un mortero, adicionar yoduro y moler con el pistilo por 5-10 seg. Adicionar 1 ml de agua y moler, entonces adicionar 5 ml de agua y moler, adicionar 10 ml de agua y moler. Vaciar la solución en un bote. Lavar el mortero y el pistilo con el resto del agua para completar un volumen total de 300 ml.

##### Contratinción de Hucker (Solución Stock)

Safranina O	2.5 g
Etanol 95%	100 ml

Adicionar el stock a 90 ml de agua destilada.

## PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN

Fijar las preparaciones con aire seco. Teñir la lamina 1 minuto con cristal violeta en solución de oxalato de amonio. Lavar rápidamente en el grifo de agua y drenar. Aplicar yoduro por 1 min. Lavar en el grifo de agua y drenar. Decolorar con etanol al 95% hasta que el lavado ya no desprende azul (aproximadamente 30 seg). Alternativamente se puede inundar la laminilla con etanol, retirar inmediatamente y reinundar con etanol 10 seg. Lavar rápidamente con agua. Drenar y aplicar solución de safranina de 10 a 30 seg. Lavar rápidamente con agua, drenar, secar con papel secante o aire seco. Leer al microscopio, (BAM, 1999).