

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“SUSCEPTIBILIDAD A NISINA DE CEPAS DE *Leuconostoc*
spp. AISLADAS DE UNA PLANTA PROCESADORA DE
SALCHICHAS Y LA ASOCIACIÓN CON SU GENOTIPO”

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

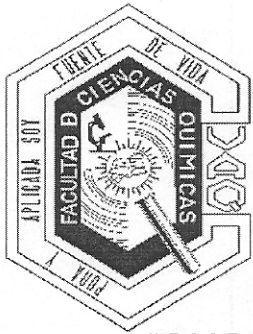
PRESENTA

ALMA GABRIELA PÉREZ RICO

DIRIGIDA POR

Dra. SOFIA MARÍA ARVIZU MEDRANO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2012.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“SUSCEPTIBILIDAD A NISINA DE CEPAS DE *Leuconostoc*
spp. AISLADAS DE UNA PLANTA PROCESADORA DE
SALCHICHAS Y LA ASOCIACIÓN CON SU GENOTIPO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

ALMA GABRIELA PÉREZ RICO

DIRIGIDA POR

Dra. SOFIA MARÍA ARVIZU MEDRANO

SINODALES

Dra. SOFIA MARÍA ARVIZU MEDRANO
DIRECTOR

M. en C. BEATRIZ LILIANA ÁLVAREZ MAYORGA
SINODAL

Dra. MONSERRAT HERNÁNDEZ ITURRIAGA
SINODAL

M. en C. J. JESÚS PADILLA FRAUSTO
SINODAL

RESUMEN

El deterioro microbiano en productos cárnicos embutidos es debido, principalmente, a bacterias ácido lácticas, destacando el género *Leuconostoc*. En este estudio se evaluó la susceptibilidad de 87 cepas de tres especies de *Leuconostoc* caracterizadas genéticamente a concentraciones de 0, 2, 8, 10 y 12.5 ppm de nisina en medio de cultivo. La presencia de nisina en el medio incrementa los tiempos de detección, disminuye el incremento de la población durante la fase exponencial, logrando una menor población de las cepas de las tres especies de *Leuconostoc* estudiadas. El mayor efecto de la nisina ocurrió a 10 ppm para *L. lactis* mientras para *fallax* y *mesenteroides* no hubo diferencia significativa entre 10 y 12.5 ppm. *L. lactis* presentó los valores más altos de máxima población alcanzada y tiempo de detección, pero también el mayor porcentaje de inhibición. *L. fallax* y *L. mesenteroides* presentaron comportamientos similares en estos parámetros cinéticos, congruente con la similitud en su información genética. El orden de tolerancia a nisina fue: *mesenteroides* > *fallax* > *lactis*. Sin embargo la diferencia en la tolerancia entre *L. mesenteroides* y *L. fallax* es mucho menor que entre *L. fallax* y *L. lactis*. *L. mesenteroides* presentó la mayor tolerancia a nisina en los genotipos I-XV, mientras que *fallax* fue en los genotipos del XIII-XXIII. La adición de conservadores como la nisina en la formulación de la salchicha puede ser una medida de control del desarrollo microbiano que le provee de estabilidad durante la vida de anaquel de salchichas empacadas al vacío.

ÍNDICE GENERAL

| Contenido | Página |
|--|--------|
| ÍNDICE GENERAL | i |
| ÍNDICE DE CUADROS | iii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | iv |
| RESUMEN | |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 3 |
| II.1 Embutidos | 3 |
| II.2 Salchichas | 3 |
| II.2.1 Definición | 3 |
| II.2.2 Deterioro | 4 |
| II.3 <i>Leuconostoc</i> spp. como deteriorador | 5 |
| II.4 Estrategias generales para el control microbiano en alimentos | 7 |
| II.5 Conservadores | 8 |
| II.6 Bacteriocinas | 9 |
| II.6.1 Clasificación de las bacteriocinas producidas por BAL | 10 |
| II.7 Nisina como conservador | 11 |
| II.8 Resistencia de los microorganismos a las bacteriocinas | 13 |
| II.9 Tipificación de microorganismos | 14 |
| II.9.1 Métodos de tipificación | 14 |
| II.9.1.1 Técnicas genotípicas | 16 |
| III. HIPÓTESIS | 18 |

| | |
|--|----|
| IV. OBJETIVOS | 19 |
| IV.1. General | 19 |
| IV.2. Específicos | 19 |
| V. METODOLOGÍA | 20 |
| V.1. Material | 20 |
| V.1.1. Equipo | 20 |
| V.1.2. Reactivos y medios de cultivo | 20 |
| V.1.3. Material biológico | 21 |
| V.2. Métodos | 21 |
| V.2.1 Activación de cepas | 21 |
| V.2.2 Preparación de inóculo | 22 |
| V.2.3 Evaluación del desarrollo de cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. en medio MRS adicionado con nisina | 22 |
| V.2.4 Asociación de la tolerancia a nisina con el genotipo de cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. | 23 |
| V.2.5 Análisis estadístico | 23 |
| VI. RESULTADOS | 24 |
| VI.1 Evaluación del desarrollo de cepas de <i>Leuconostoc</i> en medio MRS adicionado con nisina | 24 |
| VI.2 Asociación de la tolerancia a nisina con el genotipo de cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. | 35 |
| VII. DISCUSIÓN | 40 |
| VIII. CONCLUSIONES | 43 |
| IX. BIBLIOGRAFÍA | 44 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Cepas de <i>Leuconostoc</i> aisladas de una planta procesadora de salchichas durante el periodo de 2008-2010. | 21 |
| 2 | Efecto de la nisina sobre los valores medios de máxima población alcanzada por cada especie. Letras diferentes denotan diferencia significativa entre las medias. | 30 |
| 3 | Efecto de la nisina sobre los valores medios del incremento para cada especie analizada. Letras diferentes denotan diferencia significativa entre las medias. | 32 |
| 4 | Efecto de la nisina sobre los valores medios de tiempo de detección obtenidos para cada especie. Letras diferentes denotan diferencia significativa. | 34 |
| 5 | Porcentaje de inhibición ocurrido para cepas de <i>L. lactis</i> , <i>L. fallax</i> y <i>L. mesenteroides</i> en 5 concentraciones diferentes de nisina. | 35 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Estructura de la nisina A. | 11 |
| 2 | Mecanismo de acción de la nisina mediante formación de poros en la membrana. | 13 |
| 3 | Capacidades diferentes de desarrollo entre cepas de <i>L. lactis</i> (A), <i>L. fallax</i> (B) y <i>L. mesenteroides</i> (C) en medio MRS sin adición de nisina. | 25 |
| 4 | Comportamientos que presentaron 3 cepas de <i>L. lactis</i> (A), <i>L. fallax</i> (B) y <i>L. mesenteroides</i> (C) al someterse a 0, 2, 8 y 10 ppm de nisina. | 26 |
| 5 | Viabilidad observada a 12.5 ppm de nisina para algunas cepas de <i>L. lactis</i> (A), <i>L. fallax</i> (B) y <i>L. mesenteroides</i> (C). | 27 |
| 6 | Efecto promedio de la nisina sobre la máxima población alcanzada de todas las cepas de <i>Leuconostoc</i> . Letras diferentes denotan diferencia significativa entre concentraciones. | 28 |
| 7 | Efecto que ejercieron las diferentes concentraciones de nisina sobre la máxima población alcanzada por las cepas <i>L. fallax</i> , <i>L. lactis</i> y <i>L. mesenteroides</i> . | 29 |
| 8 | Efecto inhibitorio de la nisina sobre el incremento para todas las cepas de <i>Leuconostoc</i> . Letras diferentes denotan diferencia significativa entre los valores medios de incremento. | 31 |
| 9 | Efecto de la nisina sobre los valores de incremento para la especie <i>L. fallax</i> , <i>L. lactis</i> y <i>L. mesenteroides</i> . | 31 |
| 10 | Efecto de la nisina sobre el tiempo de detección para las cepas de <i>Leuconostoc</i> . Letras diferentes denotan diferencia significativa entre concentraciones. | 33 |
| 11 | Efecto de la nisina sobre el tiempo de detección para las especies de <i>L. fallax</i> , <i>L. lactis</i> y <i>L. mesenteroides</i> . | 33 |
| 12 | Dendograma que muestra algunas cepas de <i>Leuconostoc lactis</i> , | 35 |

| | | |
|----|--|----|
| | genotipos, fuente de aislamiento y fecha de muestreo englobadas en dos grupos de genotipos. | |
| 13 | Dendograma que asocia dos grupos de genotipos para <i>Leuconostoc fallax</i> . | 36 |
| 14 | Relación entre genotipos de <i>Leuconostoc fallax</i> con respecto a la máxima población alcanzada (A) y el tiempo de detección (B). | 37 |
| 15 | Asociación entre la máxima población alcanzada y el tiempo de detección de cepas de <i>L. fallax</i> a 0, 10 y 12.5 ppm de nisina. Los números rojos señalan el número de cepa. El cuadro verde señala las cepas con menor tiempo de detección en presencia de 12.5 ppm. | 37 |
| 16 | Dendograma de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> que muestra 3 grupos de genotipos asociados en función de su porcentaje de similitud. | 38 |
| 17 | Relación que existe entre genotipos de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> con respecto a la máxima población alcanzada (A) y el tiempo de detección (B). | 39 |
| 18 | Asociación entre la máxima población alcanzada y el tiempo de detección de cepas de <i>L. mesenteroides</i> a 0, 10 y 12.5 ppm de nisina. Los números señalan el número de cepa. El cuadro verde señala las cepas que logran la misma población máxima en presencia de 12.5 ppm de nisina con respecto al control. | 39 |

I. INTRODUCCIÓN

Los productos cárnicos curados emulsionados y cocidos no son productos estériles, sin embargo, es posible elaborarlos manteniendo un mínimo de carga microbiana hasta su empaque y limitar la actividad de los microorganismos en la comercialización mediante refrigeración. Típicos ejemplos de este grupo son las salchichas. Aunque sus materias primas presentan elevada carga microbiana, la cocción representa una medida efectiva para inactivar la flora presente. Suele ser frecuente la recontaminación en etapas posteriores a la cocción.

Leuconostoc mesenteroides es considerado como el deteriorador más importante en salchichas y emulsiones cárnicas cocidas empacadas al vacío y almacenadas bajo refrigeración. Es responsable del agriado, generación de sabores y olores desagradables, exudado lechoso y gasificación. Una de las estrategias de control de la actividad microbiana que emplean las industrias es la inclusión de conservadores a las formulaciones de los productos. Algunos conservadores logran incrementar la vida de anaquel del alimento, pero pueden generar efectos negativos a la salud del consumidor cuando se ingieren por largos períodos o se emplean en dosis elevadas. Por tal motivo, existe una tendencia general a aumentar el uso de conservadores de origen natural, como la nisina. Esta bacteriocina es considerada como GRAS y en México se permite como aditivo en diversos alimentos. Está bien documentado que es capaz de inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos, pero existe poca información sobre su efecto en microorganismos deterioradores, como *Leuconostoc*.

El comportamiento de los microorganismos depende, en cierta medida, de su capacidad metabólica definida, principalmente, por la información genética con que cuentan. Las características genéticas pueden determinar el comportamiento de los microorganismos ante factores ecológicos que se usen para su control, como el caso de los conservadores en el alimento. La tipificación de los microorganismos

hace posible evidenciar las diferencias en la información genética entre cepas pertenecientes a la misma especie.

En este trabajo se pretende evaluar el comportamiento de cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas de una planta procesadora de salchichas ante nisina e investigar si la tolerancia a nisina muestra asociación con sus características genéticas.

II. ANTECEDENTES

II.1 Embutidos

Los embutidos son productos constituidos a base de carne picada y condimentada con forma generalmente simétrica (Müller y Ardoíno, 2003). El sabor, la textura y la forma característicos de los diferentes embutidos conocidos actualmente surgieron a consecuencia de variaciones en los procesos de elaboración, disponibilidad de materias primas y condiciones climáticas (Price y Schweigert, 1976).

De acuerdo a la práctica de elaboración, se clasifican en embutidos crudos, cocidos y escaldados. Ésta última se refiere a aquellos cuya pasta es incorporada cruda, sometiéndose a un tratamiento térmico y ahumado opcional, para luego ser introducido en tripas autorizadas de diámetro variable. Por ejemplo: mortadelas, salchichas y jamón cocido (Müller y Ardoíno, 2003).

II.2 Salchichas

II.2.1 Definición

La Norma Mexicana NMX-F-065-1984 define a la salchicha como un producto alimenticio embutido de pasta semifirme de color característico elaborado con la mezcla de carne (60 % mínimo) y grasa de ternera o res y cerdo, adicionadas de condimentos, especias y aditivos de uso permitido. Posteriormente, se introduce en tripas autorizadas, se somete a curación (pudiendo ser ahumada o no), a cocción y a enfriamiento, se empaca en material adecuado para su distribución y se conserva en refrigeración.

II.2.2. Deterioro

El deterioro de los alimentos es la expresión de los procesos físicos y reacciones químicas que suceden durante su almacenamiento y llevan a la pérdida de su valor comercial (Fernández, 2008). Se presenta como una característica subjetiva atribuida por el consumidor, la cual puede ser influenciada por la agudeza sensorial del individuo y la intensidad de los cambios (Korkeala y Björkroth, 1997). El consumidor considera una intensa decoloración, malos olores y desarrollo de mucosidad como criterios para rechazar el producto (Nychas y col., 2008). El resultado final es la reducción de la vida media del alimento y pérdidas económicas para el productor de salchichas (Muñoz, 2006). Por ello, los factores que favorecen o aceleran el deterioro son aquellos que promueven la actividad microbiana. Los factores incluyen: el número inicial de microorganismos, tipo de alimento, flora acompañante, condiciones de almacenamiento (Fernández, 2008).

Dependiendo del ambiente (nutrientes, humedad y temperatura), los microorganismo pueden multiplicarse y, partiendo de poblaciones iniciales bajas, alcanzar altos niveles y generar el deterioro de los alimentos (Fernández, 2000). Los equipos y las materias primas pueden ser fuentes de contaminación durante la elaboración de embutidos (Von Holy y col., 1992). Los equipos pueden actuar como reservorios cuando presentan partes pequeñas, secciones inaccesibles y son de determinado material porque no permiten una limpieza y desinfección eficaz. De igual forma sucede con los utensilios como tablas de cortar, cuchillos y cucharas (Ray, 1996). Actualmente, la industria de carnes frías se ve afectada por fallas y/o carencias en la cadena de frío durante la comercialización del producto, lo cual compromete la conservación del producto terminado (Padilla-Frausto, 2010). Las bacterias ácido lácticas son los organismos deterioradores predominantes en carnes refrigeradas empacadas al vacío y en atmósferas modificadas (Korkeala y Björkroth, 1997; Björkroth y Holzapfel, 2006). La población de bacterias ácido lácticas (BAL) en salchicha empacada al vacío recién elaborada se encuentra

usualmente por debajo del límite de detección (<10 UFC/g), pero su número puede incrementar durante el almacenamiento del producto en comercialización hasta 10^8 UFC/g, lo que eventualmente se asocia con el deterioro (Chenoll y col., 2007).

En un estudio realizado por Von Holy y col. (1992), donde analizaron muestras ambientales de una empresa productora de salchichas, encontraron un gran número de bacterias Gram negativas y un amplio espectro de BAL, las cuales comprendían los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, entre otros, destacando *Lactobacillus* homofermentativos y *Leuconostoc*, por presentar capacidad deterioradora en la salchicha tipo Viena empacada al vacío.

II.3 *Leuconostoc* spp. como deteriorador

Leuconostoc es una bacteria ácido láctica heterofermentativa. Su nombre deriva de un alga verdeazulada, *Nostoc*, y del griego *Leukos*, que significa blanco o incoloro (Frobisher, 1969). Es una célula esférica pequeña (1-1.5 μm), presente en pares o cadenas capaz de formar gruesos revestimientos externos, mucosos o viscosos (llamados dextranos) en medios que contienen sacarosa (De Vuyst y Vandamme, 1994). *Leuconostoc* es catalasa negativa, anaerobio facultativo, Gram positiva, mesófilo (temperatura óptima de 20 a 30 °C), pero algunas especies pueden crecer a 3 °C o menos (Ray, 1996). Convierte un 50 % de lactosa o glucosa en ácido láctico, un 25 % en CO_2 y un 25 % en ácido acético y alcohol etílico (Frobisher, 1969). Otras características son: arginina negativo, producción de gas a partir de glucosa y productor primario del isómero D-lactato (Bjökroth y Holzapfel, 2006). Algunas cepas producen bacteriocinas que son efectivas contra bacterias patógenas Gram negativas y deterioradores presentes en alimentos (Cabeza, 2006). Es exigente con sus requerimientos nutricionales, incluyendo a aminoácidos (biotina, nicotina, tiamina y ácido pantoténico), péptidos, carbohidratos

fermentables, ácidos grasos, ácidos nucleicos y vitaminas (Björkroth y Holzapfel, 2006).

Los géneros *Lactobacilli* y *Leuconostoc* son los microorganismos involucrados en el deterioro de productos cárnicos, siendo *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* el principal aislado de salchichas y emulsiones cárnicas envasadas al vacío y otras carnes procesadas que se almacenan bajo temperaturas de refrigeración (-3 a 5 °C) (Björkroth y Holzapfel, 2006). Como resultado de su actividad se puede observar agriado, generación de sabores y olores desagradables, exudado lechoso y formación de gas (Ray, 1996; Korkeala y Björkroth, 1997). También, en 2007, Chenoll y col. mostraron que estos géneros fueron la flora dominante en cuatro grupos de productos cárnicos (embutidos y cocidos) analizados durante su almacenamiento, mostrando los síntomas anteriores de deterioro. El estudio de Hamasaki y col. (2003) demostró tasas de crecimiento muy rápido para *L. mesenteroides*, subsp. *mesenteroides* y *L. citrium* aún a temperaturas de refrigeración, con valores de hasta 8 Log en incubación por 4 días a 10 °C y el mismo desarrollo en 25 días a 4 °C. La importancia de este género va más allá porque, estudios recientes han demostrado que, aproximadamente, un 36 % de la flora deterioradora en salchicha tipo Viena pertenece a *Leuconostoc* (Dykes y col., 1996).

Los equipos y los trabajadores se encuentran como las fuentes probables de contaminación. Las cepas provenientes de material crudo pueden pasar a otras áreas de la producción fácilmente (Korkeala y Björkroth, 1997). Por ello, un control exhaustivo de las buenas prácticas de manufactura y sanitarias en la elaboración de la salchicha, así como la implementación de barreras que controlen eficientemente el deterioro prematuro, son acciones que pueden garantizar al mercado, no sólo productos de buena calidad, sino de aceptable estabilidad comercial (Padilla-Frausto, 2010).

II.4 Estrategias generales para el control microbiano en alimentos

Las estrategias para controlar los microorganismos deterioradores consisten en evitar su acceso a los alimentos, inactivarlos, inhibir o minimizar su desarrollo con el fin de alargar la vida media de un producto (Muñoz, 2006). Dentro de los procedimientos que usualmente se emplean se encuentran los procesos físicos o químicos. En los primeros destacan el uso de altas temperaturas como la cocción, horneado, esterilización o pasteurización, además de aquellos con baja temperatura como el enfriamiento o congelación. También se usa radiación ultravioleta, filtración y la modificación de la actividad acuosa del alimento. Entre las estrategias de control químico se incluye el uso de antimicrobianos (compuestos químicos, naturales o sintéticos) (Madigan y col., 2004). Se puede retrasar la descomposición microbiana de los productos cárnicos mediante 3 recursos no excluyentes entre sí: 1) llevar a cabo prácticas sanitarias en su elaboración que mantenga baja la población microbiana; 2) aplicar un tratamiento químico o térmico que controle, disminuya o elimine la flora microbiana presente en él, y finalmente; 3) la conservación a bajas temperaturas durante su comercialización (Cepeda-Márquez y col., 2008).

El control del progreso del deterioro en carne procesada es difícil debido a que algunas bacterias lácticas tienen carácter psicrótrofo o son resistentes a determinados compuestos, como el nitrito, las sales y humos. Ray (1996) señala tres factores que favorecen el desarrollo de microorganismos en los productos empacados al vacío y refrigerados: cambios en el ambiente del alimento (como un vacío ineficiente o con microaerobia), altos valores de pH y largo tiempo de almacén a bajas temperaturas. Por lo tanto, para asegurar la estabilidad microbiológica de los alimentos, se recomienda la aplicación de dos o más métodos de conservación y considerar que la eficiencia de los procesos es dependiente de la dosis, condiciones de aplicación y/o duración del tratamiento (Fernández, 2000).

II.5 Conservadores

La conservación de alimentos pretende, mediante la aplicación de un conjunto de estrategias, impedir o minimizar el crecimiento y la actividad de los microorganismos para prolongar la vida útil del alimento (Russell, 1991; Muñoz, 2006). Una de las estrategias que se emplean es la incorporación del conservador en los alimentos. Por norma general, la eficacia del conservador depende de su concentración en el alimento, por ello, sólo tiene sentido cuando se utiliza como complemento a adecuadas prácticas sanitarias de operación (Muñoz, 2006). Existe la posibilidad de que la contaminación generada por diversas fuentes operando durante la producción, propicien que el número de microorganismos en un producto sea tan elevado que el conservador no lo pueda controlar (Padilla-Frausto, 2010).

De acuerdo con Davidson (1997), los conservadores se pueden clasificar en dos tipos: conservadores químicos tradicionales y naturales. Los primeros son aquellos que se han usado por muchos años, están aprobados como antimicrobianos alimentarios en muchos países y son producidos de forma sintética o inorgánica. Ejemplos son los ácidos orgánicos y sus ésteres (ácido sórbico y sorbato, ácido benzoico y benzoato, etc.), nitritos, polifosfatos y cloruro de sodio (Hoover y Steenson, 1993). Los conservadores naturales son compuestos orgánicos naturales con actividad antimicrobiana que están presentes en los alimentos de origen animal (lactoferrina, lisozima, etc.) o vegetal (especies y aceites esenciales, etc.).

Existe una tercera clasificación que se refiere a conservadores biológicos o también llamados bioconservadores. Son sustancias provenientes de determinados microorganismos (principalmente bacterias ácido lácticas) capaces de inhibir a otros microorganismos o sus metabolitos. Por ejemplo: antibióticos, ácidos débiles y bacteriocinas (Mata, 1999).

II.6 Bacteriocinas

La mayoría de los consumidores están convencidos de que los mejores y más sanos alimentos son, después de los frescos, los mínimamente procesados que no contienen conservadores, colorantes u otras sustancias dañinas para la salud (De Vuyst y Vandamme, 1994). Así es que en la actualidad, existe la tendencia al decremento del uso de aditivos químicos para reemplazarlos por metabolitos, producidos por bacterias selectivas, que permitan inhibir el desarrollo de microorganismos indeseables. Algunos compuestos son: ácido acético, láctico, peróxido de hidrógeno o bacteriocinas (Hoover y Steenson, 1993).

Según Hernández y col. (1993) las bacteriocinas se definen como un grupo heterogéneo de proteínas que varían en su espectro antimicrobiano, propiedades bioquímicas, mecanismo de acción y características genéticas, y las cuales provienen de diversas bacterias. Sin embargo, la definición más aceptada es que son productos de síntesis ribosómica, primarios o modificados, que son secretados extracelularmente y presentan un espectro de acción bactericida relativamente estrecho (Hoover y Steenson, 1993).

Son muchos los microorganismos que producen bacteriocinas. Entre las bacterias ácido lácticas destacan los siguientes géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium* (De Vuyst y Vandamme, 1994; Dolz, 2008).

Los requerimientos para que las bacteriocinas sean usadas como conservadores son: no generar daño a la salud humana, costo económicamente aceptable, ser eficientes a bajas concentraciones, no afectar las características organolépticas del alimento, ser estables durante el almacenamiento y efectivos para la vida media del alimento, además de inhibir los microorganismos con capacidad deterioradora (Lederbeg, 1992).

II.6.1 Clasificación de las bacteriocinas producidas por BAL

Atendiendo las características estructurales, masa molecular y estabilidad al calor, las bacteriocinas pueden ser divididas en 3 clases: I, II y III. La clase I son pequeños péptidos hidrófobos, policíclicos (<5 kDa), de síntesis ribosómica similares estructuralmente entre sí por su contenido de aminoácidos modificados, tales como lantionina, metil-lantionina, dideshidroalanina y dideshidrobutirina (Muñoz, 2006). De acuerdo a su estructura química y actividad antimicrobiana, se dividen en antibióticos tipo A y tipo B. Los antibióticos tipo A son péptidos largos con carga neta positiva que ejercen su actividad formando poros en las membranas bacterianas. Los antibióticos tipo B son péptidos globulares más pequeños sin carga o con carga neta negativa y su actividad antimicrobiana se relaciona con la inhibición de enzimas específicas (De la Fuente, 2009).

La clase II son pequeños péptidos (<10 kDa), estables al calor que no poseen lantionina (De Vuyst y Vandamme, 1994) y representan al grupo más grande de bacteriocinas. Se divide en 3 subgrupos: clase IIa, IIb y IIc. En la clase IIa se encuentran péptidos como la pediocina que contienen una secuencia consenso -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys- y es uno de los grupos que abarca más atención por su actividad anti-*Listeria*. La clase IIb incluye bacteriocinas que requieren un sistema de dos péptidos diferentes para ejercer actividad antimicrobiana. La clase IIc contiene los péptidos restantes de esta clase y corresponden a bacteriocinas secretadas por el sistema sec-dependiente (De la Fuente, 2009).

Por último, la clase III incluye proteínas grandes (>10 kDa) y termolábiles, por ello, no son de interés para uso en alimentos (De Vuyst y Vandamme, 1994).

Cabe destacar que la clase I son las bacteriocinas que presentan mayor aplicación como conservadores en los alimentos (Medina, 2008), tal es el caso de la nisina (Figura 1), lactocina S y 481, epidermina y gallidermina (De la Fuente, 2009).

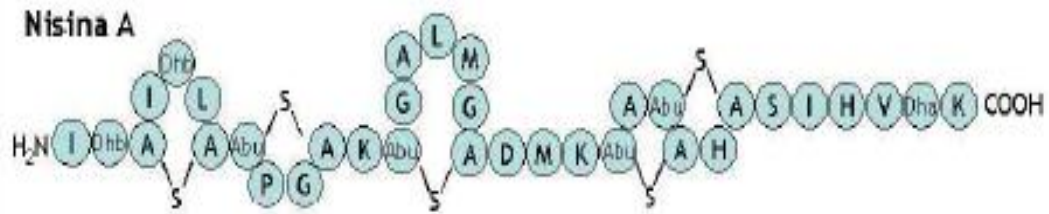


Figura 1. Estructura molecular de la nisina A.

II.7 Nisina como conservador

La bacteriocina más representativa de la clase I es la nisina. Es un polipéptido flexible, pequeño y alargado, de 34 aminoácidos, producida por la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (Parada y col., 2007). La nisina presenta un pH ácido óptimo de 2 a 5, por lo que es estable en condiciones ácidas (Rayman, 1981; Hoover y Steenson, 1993; De Vuyst y Vandamme, 1994). Su solubilidad y estabilidad aumenta al aumentar la temperatura y disminuir el pH (Hoover y Steenson, 1993). La nisina se destruye cuando se calienta 30 minutos a 63 °C y a un pH alcalino (Chen y Hoover, 2003). Su síntesis es compleja; requiere procesos de transcripción, traducción, modificaciones post-traduccionales, secreción, procesamiento y señales de transducción (González-Martínez y col., 2003).

La nisina es la bacteriocina más conocida y aplicada desde hace más de 50 años en alimentación (Hoover y Steenson, 1993). Es un ejemplo de antimicrobiano reconocido por la FDA con la categoría GRAS que le permite incorporarse en películas comestibles y a una gran variedad de productos alimenticios; leche, quesos, vegetales enlatados y sopas (Ray, 1996). En México se permite añadirla en quesos procesados a 0.00125 % (12.5 ppm; 500 UI/g) (NOM-121-SSA1-1994; Cleveland y col., 2001). Comparado con el Codex Alimentarius (1995), éste también permite 12.5 ppm para el mismo producto.

Algunas ventajas que presenta la nisina son:

- Al ser de naturaleza proteica, es inactivada fácilmente por enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal (Nettles y Barefoot, 1993).
- Marcada termorresistencia, lo que le permite conservar su actividad antimicrobiana tras ser sometida a temperaturas de pasteurización y esterilización (100 °C/10 min) (De Vuyst y Vandamme, 1994).
- Amplio espectro antimicrobiano frente a diversas bacterias Gram positivas patógenas o deterioradoras y algunas Gram negativas (Ray, 1996).
- Por ser la más caracterizada, es de fácil manipulación genética y la única comercial (Hoover y Steenson, 1993).
- No presenta toxicidad su ingestión, ni contribuye con olor, color o sabor al producto alimenticio (Jay, 2000; Pongtharangkul y Demirci, 2004).

El modo de acción de la nisina es una unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y la carga positiva localizada, fundamentalmente, en uno de los extremos de la bacteriocina (extremo C-terminal de la nisina). A continuación se produce una inserción de las bacteriocinas en la bicapa lipídica por su extremo N-terminal (Moll y col., 1999). Esto origina una desestabilización y permeabilización de la membrana citoplasmática que da origen a la formación de poros transitorios (Figura 2) o canales iónicos, que causan la disipación o reducción de la fuerza motriz de la célula (pérdida de iones) debido a la interacción con los lípidos aniónicos que constituyen la pared celular de todos los microorganismos Gram positivos (Rojas y Vargas, 2008). Estos iones son necesarios para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácidos nucleicos en la bacteria, sin los cuales eventualmente muere (González-Martínez y col., 2003).

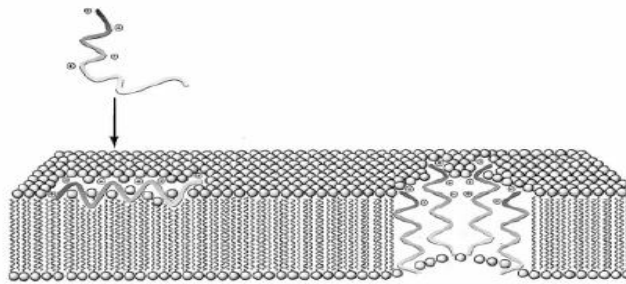


Figura 2. Mecanismo de acción de la nisina mediante formación de poros en la membrana.

II.8 Resistencia de los microorganismos a las bacteriocinas.

Un organismo para crecer se enfrenta a diversos factores u obstáculos que afectan su metabolismo. Algunos de los obstáculos son la actividad de agua, el pH, la temperatura y los nutrientes del medio en que se encuentra (De Vuyst y Vandamme, 1994). Cuando los microorganismos se exponen a efectos moderados de estrés, a través de un proceso adaptativo, tienden a responder desarrollando tolerancia o resistencia a efectos más intensos del factor estresante (Fernández, 2000).

Resistencia es la capacidad temporal o permanente de un microorganismo y su progenie para seguir siendo viable y/o multiplicarse en condiciones que pudieran destruir o inhibir a otros miembros de la cepa, por ello, las bacterias resistentes son aquellas que no son susceptibles a una concentración de agente antibacteriano usado en la práctica (Cloete, 2003). Los mecanismos por los cuales las bacterias generan resistencia (mediante adaptación o por intercambio genético) a antimicrobianos son muy diversos (Cloete, 2003). Estos pueden incluir la inhibición de varios pasos en la replicación, transcripción y traducción del ADN, o aparecer a nivel de la pared o la membrana celular o la alteración, modificación o sobreproducción de receptores externos de antimicrobianos, que derivan posteriormente en la ausencia de enzimas o rutas metabólicas (Russell, 1997).

Además, las bacterias pueden cambiar la permeabilidad de su membrana a los antimicrobianos y, finalmente, permitir su salida del citoplasma (Dever y Dermody, 1991; Cloete, 2003). La exposición a concentraciones subinhibidoras de un antimicrobiano puede activar los mecanismos de resistencia innata, disminuyendo así la susceptibilidad hacia otros antimicrobianos. La información de resistencia a los antimicrobianos se encuentra en plásmidos o integrones y, generalmente, son transferidos juntos. Harris (1991) explica que, cuando existen altos niveles de población microbiana, se espera que ocurra resistencia espontánea a nisina. En individuos de una misma especie pueden existir subgrupos y miembros que se han adaptado a un ambiente en particular (Padilla-Frausto, 2010).

II.9 Tipificación de microorganismos

La tipificación es de utilidad en la diferenciación de líneas genéticas bacterianas que se encuentran en diferentes hábitats u hospederos (Padilla-Frausto, 2010). Es presumible que entre los individuos de una misma especie, existan subgrupos y miembros que se han adaptado a un hospedero o ambiente en particular. Tal adaptación es promovida por las condiciones a las que se expusieron (disponibilidad de nutrientes, pH, temperatura, presencia de inhibidores, salinidad, entre otros). Es factible también que, una segunda progenie de estos organismos, será genéticamente idéntica a él, es decir, con las características de adaptación y colonización, como factores de resistencia, por lo que su huella genética los hará diferentes a los mismos que no están adaptados a tales condiciones (Scott y Cote, 1998).

II.9.1 Métodos de tipificación

Un método de tipificación es aquel que puede ser usado para diferenciar cepas bacterianas a nivel de clonas, siendo capaz de comparar cepas y agrupar aquellas con idénticos perfiles de respuesta (Martín, 2005). Pero además, debe

cumplir con 3 requisitos esenciales: 1) poder de tipificación (ser capaces de catalogar cualquier tipo de cepa en un tipo determinado), 2) poder discriminatorio (ser capaces de discriminar entre cepas no relacionadas), 3) reproducibilidad (ser capaces de brindar resultados reproducibles entre diferentes ensayos y estables para una cepa dada y obtenida de diferentes orígenes). Además, se considera también la sencillez de realización y de interpretación de resultados (Tenover y col., 1997; Martín, 2005).

Existen dos métodos de tipificación: la fenotípica y la genotípica. El método fenotípico permite detectar características que están expresadas por los microorganismos (Martín, 2005). Suele realizarse empleando métodos estandarizados de pruebas de susceptibilidad, como evaluaciones en caldo o difusiones en agar mediante discos impregnados con el agente (Padilla-Frausto, 2010). Incluye técnicas como la serotipificación, biotipificación, fagotipificación, susceptibilidad a bacteriocinas, etc. pero tienen un poder limitado, debido a que cada uno es aplicable a un número reducido de especies bacterianas (Tenover y col., 1997).

Por otro lado, la tipificación genotípica incluye un análisis directo del ADN cromosómico o extracromosómico, por ello, es aplicable a cualquier taxón bacteriano (Tenover y col., 1997). Otras características que presenta son:

- El ADN bacteriano siempre puede ser extraído; todas las cepas son tipificables.
- Las estrategias analíticas del método son similares permitiendo que se apliquen a ADN de cualquier origen.
- El ADN es una característica estable y su composición no es independiente de las condiciones de cultivo o métodos de preparación.
- Permite un análisis estadístico de los datos.

La principal ventaja de los métodos genotípicos respecto a los fenotípicos tradicionales es su poder discriminatorio, logrando en muchos casos diferenciar entre cepas absolutamente idénticas fenotípicamente (Padilla-Frausto, 2010).

II.9.1.1 Técnicas genotípicas

Varios tipos de técnicas moleculares han sido desarrolladas durante la década pasada para la identificación y clasificación de grupos bacterianos. De todos éstos, los más importantes son los métodos moleculares basados en la genética, conocidos como técnicas de ADN de huella digital. Algunos ejemplos son la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), ribotipado, amplificación polimórfica de ADN aleatorizado (RAPD) y polimorfismo de fragmento amplificado largo (AFLP) (Randazzo y col., 2009).

La tipificación mediante estas técnicas moleculares permite evidenciar reservorios (de diversos géneros, especies, variedades y/o clonas) o fuentes y mecanismos de contaminación en los alimentos mediante la diferenciación de líneas genéticas bacterianas y puede ser aplicado en programas de vigilancia a nivel interno, con la finalidad de prevenir, corregir y/o controlar estos reservorios o fuentes de contaminación latentes o continuas en la empresa (Randazzo y col., 2009).

La técnica de RAPD es una de la más usada para tipificar microorganismos patógenos, hongos, protozoarios y bacterias de interés tecnológico (Struelens, 2001). Consiste en la amplificación al azar de fragmentos de ADN usando un iniciador, nucleótidos, cloruro de magnesio y *Taq* ADN polimerasa (Jay, 2000). La reacción se somete a diferentes condiciones cíclicas de temperatura, lo que permite la amplificación *in vitro* de múltiples fragmentos de ADN a partir de una cadena molde (Becerra y Paredes, 2000). Los productos resultantes del PCR son fragmentos de ADN de diferentes tamaños que son visualizados a través de

electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida (Randazzo y col., 2009). Es sencilla, rápida, discrimina entre patrones de bandas de las diferentes cepas y presenta una adecuada correlación contra otras técnicas de genotipificación (Jay, 2000). Sin embargo, RAPD presenta baja reproducibilidad y poder discriminatorio variable debido a que está en función al número y secuencia de los iniciadores arbitrarios y las condiciones de amplificación (Randazzo y col., 2009). Además de que requiere de instalaciones y personal con las habilidades adecuadas para ser estrictamente estandarizado y así ofrecer una reproducibilidad óptima (Struelens, 2001). Existen ya diversas publicaciones que describen las condiciones e iniciadores específicos para analizar aislamientos del género *Leuconostoc* (Giancarlo-Moschetti y col., 2000).

III. HIPÓTESIS

Cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas de una planta procesadora de salchicha son capaces de desarrollar en presencia de nisina.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

Evaluar la susceptibilidad de cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas de una planta procesadora de salchichas a nisina.

IV.2 Específicos

- Evaluar la capacidad de cepas de *Leuconostoc* spp. para desarrollar en medio de cultivo MRS adicionado con nisina.
- Investigar si la tolerancia a nisina muestra una asociación con el genotipo de cepas de *Leuconostoc* spp.

V. METODOLOGÍA

V.1 Material

V.1.1 Equipo

Agitador mecánico Vortex®, Velp Scientific®, ns/113123
Analizador turbidimétrico automatizado Bioscreen®, C. Labsystems
Autoclave eléctrica de mesa, Market-Forge®, Mod. 199-85
Balanza analítica, sensibilidad 0.001g, marca Sartorius® y BL120S
Balanza granataria, sensibilidad 0.1g, OHAUS®, Mod. CT200S
Baño María con termostato, Arfrank®, Mod. 91
Campana de flujo laminar, Alder®, Veco®
Cuenta colonias, Quebec® y Reicher-Jung®
Homogenizador Stomacher®, Laboratory Blender®, Mod. 400 (BA 7021)
Horno para esterilización, Shel-Lab®
Incubadora con refrigeración (a 22, 30, 35°C), Precision Scientific®
Micropipetas 1-1000µL, Labsystems®, Beta®, Rainin®
Microscopio óptico Axiostar plus®, Mod. 1169-149,
Olla de presión Presto steele®, Mod. 21 L y 12 L
Potenciómetro Jenway® 3510, pH Meter®
Refrigerador OSEDA® Refrigeración
Refrigerador REVCO®, Thermo Scientific®
Ultracentrífuga Heraeus®, Biofugue pico®, Kendro®

V.1.2 Reactivos y medios de cultivo

Agar Man, Rogosa y Sharpe (AMRS), Difco®
Caldo Man, Rogosa y Sharpe (CMRS), Difco®
Diluyente de peptona de caseína 0.1% (DP), Bacto®

NaCl, J.T Baker®

Nisina 2.5%, Sigma®

V.1.3 Material biológico

Se emplearon 87 cepas de *Leuconostoc*: *L. mesenteroides* (43), *L. fallax* (29) y *L. lactis* (15) aisladas de una planta procesadora (Cuadro 1). Estas cepas se conservaron en caldo MRS adicionado de 20 % de glicerol a -18 °C hasta su uso.

Cuadro 1. Cepas de *Leuconostoc* aisladas de una planta procesadora de salchichas durante el periodo de 2008-2010.

| Especie | Número de cepas | Número de genotipos | Fuente |
|----------------------------------|-----------------|---------------------|--|
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | 43 | 37 | Materia prima Superficies Producto en proceso Producto dañado Varios materiales* |
| <i>Leuconostoc fallax</i> | 29 | 23 | Materia prima Superficies Producto en proceso Producto dañado Varios materiales |
| <i>Leuconostoc lactis</i> | 15 | 6 | Superficies Producto dañado |

*Plástico de salchicha para rellenar, frente, escisiones y salmuera.

V.2 Métodos

V.2.1 Activación de cepas

Se transfirieron 40 µL de una suspensión de cada cepa que se mantuvieron a -18 °C y se incubaron a 30 °C/24 horas. Transcurrido este tiempo, se realizó una

resiembra de 40 μ L del cultivo a caldo MRS pero esta vez se incubó a 30 °C/48 horas. Se alcanzó una población de aproximadamente de 8 Log UFC/mL.

V.2.2 Preparación de inóculo

Se colocó 1 mL de la cepa activada en tubo Eppendorf y se centrifugó 4500 rpm/15 minutos. El sobrenadante se decantó y los paquetes celulares se lavaron dos veces con solución salina fisiológica (SSF, 0.85 %). Se realizaron las diluciones necesarias en SSF para obtener la concentración deseada.

V.2.3 Evaluación del desarrollo de cepas de *Leuconostoc* spp. en MRS adicionado con nisina.

La cuantificación del desarrollo de las cepas de *Leuconostoc* spp. se realizó en un analizador turbidimétrico automatizado (Bioscreen®). Se distribuyó caldo MRS adicionado con 0, 2, 8, 10 y 12.5 ppm de nisina (Sigma®) en fosas de placas múltiples.

Se inocularon de forma independiente las fosas con 10 μ L (10^{4-5} UFC) de las suspensiones de cada cepa. Se empleó caldo sin inocular como control negativo y caldo MRS con nisina como control positivo. Las placas inoculadas se introdujeron en el equipo Bioscreen® durante 48 horas. Las determinaciones de la densidad óptica (DO) de los cultivos se realizaron a 600 nm, con lecturas cada 20 minutos y agitación media de 5 segundos previo a la medición. Al finalizar la incubación, se obtuvieron los datos de DO y se transformaron a Log UFC/mL empleando la siguiente ecuación de correlación que asocia cuenta viable y DO.

Leuconostoc mesenteroides:

$$\text{Log} \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = 6.552306 + 2.1152565(\text{DO})$$

Leuconostoc fallax:

$$\text{Log} \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = 6.3347058 + 2.3572172(DO)$$

Leuconostoc lactis:

$$\text{Log} \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = 5.8009265 + 3.1493447(DO)$$

A partir de los datos de las cinéticas de desarrollo se estimaron dos parámetros al final de la fase Log: población máxima alcanzada (Log de UFC/mL) e incremento con respecto al inóculo (Log UFC/mL). De cada cinética, el equipo reportó el tiempo de detección (h).

V.2.4 Asociación de la tolerancia a nisina con el genotipo de cepas de *Leuconostoc* spp.

Los genotipos de las 87 cepas de *Leuconostoc* spp. se obtuvieron a partir de la metodología descrita por Padilla-Frausto (2010) tomando como referencia el coeficiente de similitud de Dice (valor mayor de 95 % se considera un genotipo). Posteriormente, se generaron los dendogramas correspondientes a *L. lactis*, *L. fallax* y *L. mesenteroides* (Figuras 12, 13 y 14, respectivamente) mediante el programa Statistica versión 4.3 (1993). Los genotipos dentro de cada especie se agruparon en base al % de similitud y se realizaron comparaciones de los parámetros de desarrollo entre grupos de genotipos.

V.2.5 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de la máxima población alcanzada, incremento en la fase exponencial y tiempo de detección entre especies y grupos de genotipos dentro de cada especie mediante el programa JMP© (versión 5.0.1).

VI. RESULTADOS

En un estudio previo en el laboratorio se aislaron 87 cepas de *Leuconostoc* con capacidad deterioradora a partir de materiales y superficies de una planta procesadora de salchichas. Mediante identificación bioquímica se detectaron las especies *L. lactis*, *L. fallax*, *L. mesenteroides*, *L. plantarum* y *L. citreum*.

En este trabajo se incluyeron solamente las primeras 3 especies, que fueron las que se aislaron con mayor frecuencia. Los resultados generados en este trabajo buscan proporcionar información sobre la capacidad de *Leuconostoc* de desarrollar ante un compuesto que con frecuencia se emplea para controlar el desarrollo de microorganismos patógenos y deterioradores en alimentos.

VI.1 Evaluación del desarrollo de cepas de *Leuconostoc* en medio MRS adicionado con nisina.

Las cepas de *Leuconostoc* aisladas previamente, fueron retadas contra diferentes concentraciones de nisina; 0, 2, 8, 10 y 12.5 ppm, ésta última es considerada como la máxima concentración permitida por la Normatividad Mexicana. El estudio se realizó en el equipo Bioscreen® que mide la densidad óptica (DO) a intervalos regulares de tiempo y a una temperatura específica. Mediante ecuaciones lineales, los datos de DO se transformaron a cuenta viable (Log de UFC/mL) y se graficaron en función del tiempo para obtener los comportamientos de las 3 especies a diferentes concentraciones de nisina. La Figura 3 muestra el desarrollo de las cepas de cada una de las especies en el caldo MRS sin nisina. Se puede observar que de forma inherente, las cepas muestran diferente capacidad para desarrollar. Estas diferencias entre cepas son más acentuadas en *L. lactis*, especialmente en el tiempo de detección, con valores hasta de 8 horas.

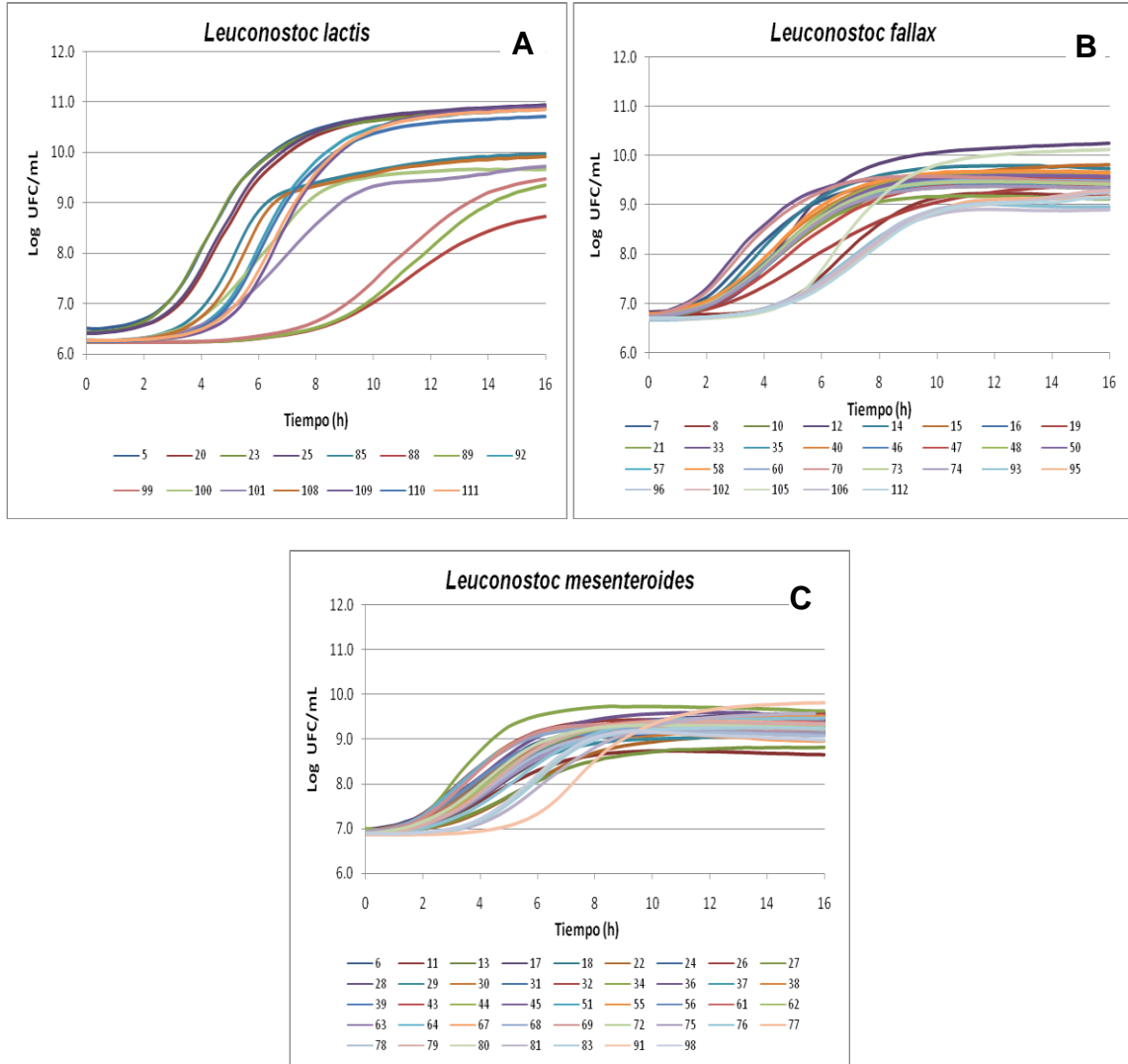


Figura 3. Capacidades diferentes de desarrollo entre cepas de *L. lactis* (A), *L. fallax* (B) y *L. mesenteroides* (C) en medio MRS sin adición de nisina.

Para contrastar el comportamiento de las tres especies de *Leuconostoc* estudiadas, se seleccionaron 3 cepas de cada especie y se graficaron en cada una de las concentraciones analizadas (Figura 4). Las cepas que se muestran en estas gráficas son: la cepa con desarrollo más activo (color verde), aquella con menor grado de desarrollo (color azul) y una intermedia (color rojo).

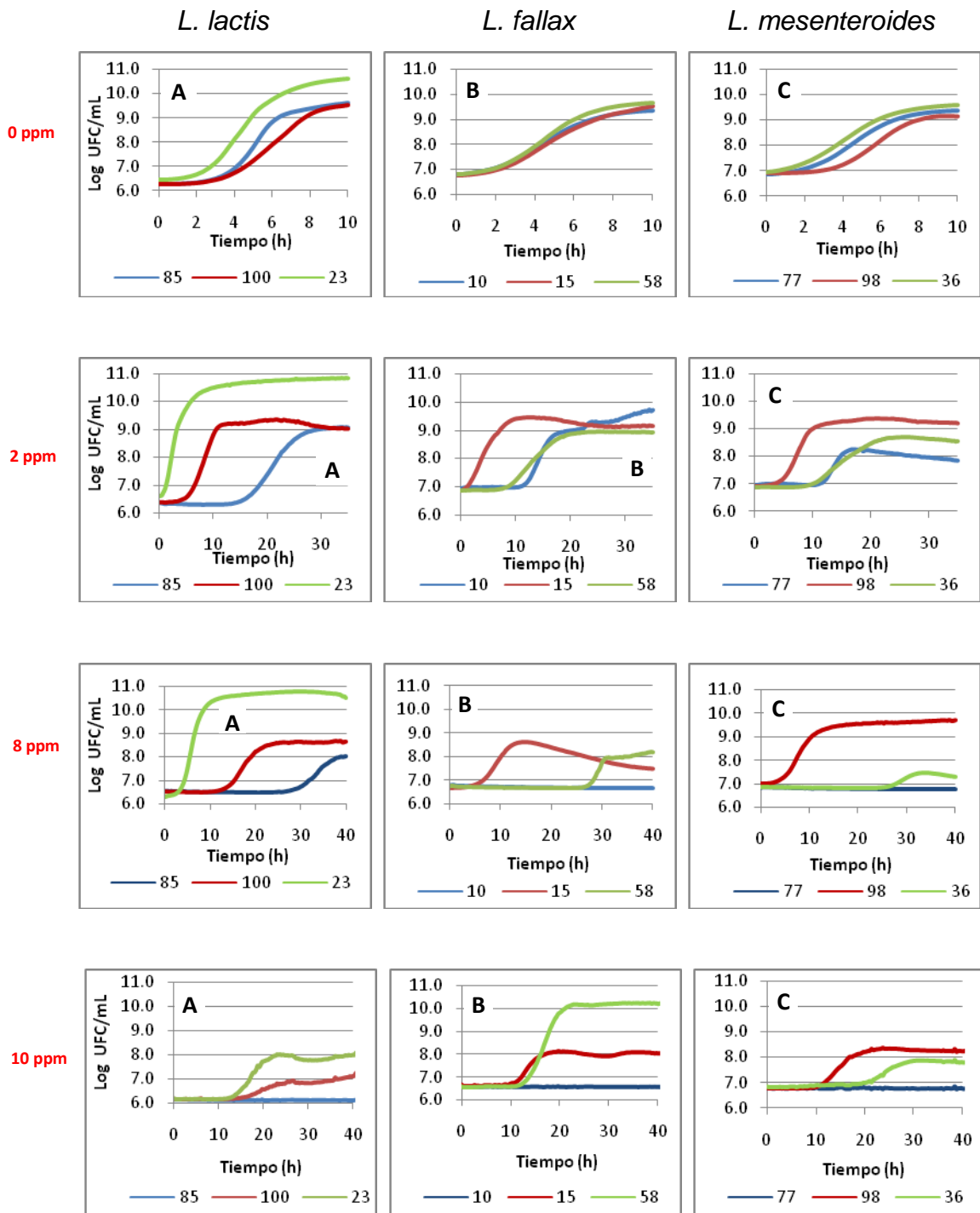


Figura 4. Comportamientos que presentaron 3 cepas de *L. lactis* (A), *L. fallax* (B) y *L. mesenteroides* (C) al someterse a 0, 2, 8 y 10 ppm de nisina.

La concentración máxima de nisina analizada merece especial interés por marcar el límite de uso permitido en México para un alimento procesado. La Figura 5 muestra el comportamiento de las cepas anteriores sometidas a una concentración de 12.5 ppm. Se observa en las 3 especies de *Leuconostoc* viabilidad de las cepas que presentaron el desarrollo más activo.

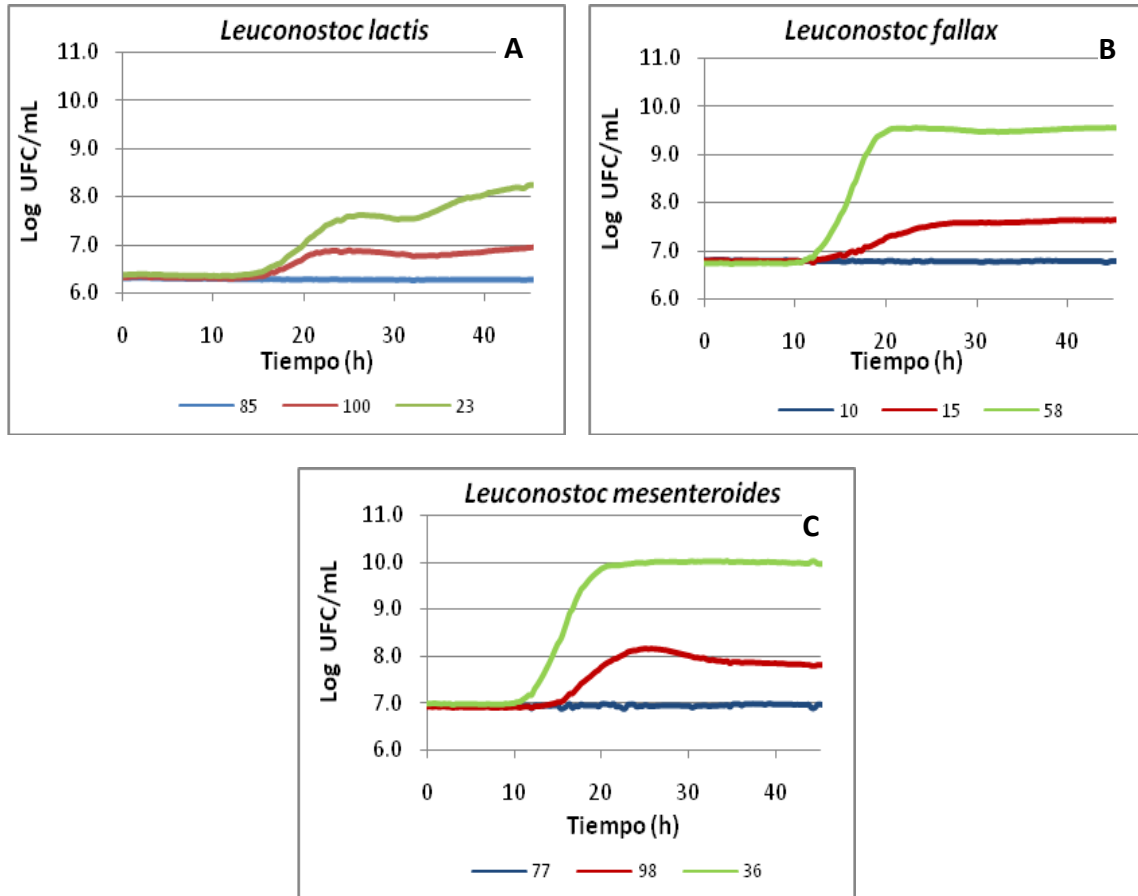


Figura 5. Viabilidad observada a 12.5 ppm de nisina para algunas cepas de *L. lactis* (A), *L. fallax* (B) y *L. mesenteroides* (C).

De los datos de viabilidad se obtuvieron parámetros: a) máxima población alcanzada (Log UFC/mL), ésta corresponde a la concentración de células viables al finalizar la fase exponencial; b) incremento (Log UFC), se calculó por la diferencia entre la concentración de células al inicio y final de la fase exponencial; y c) tiempo

de detección (h), que es un parámetro reportado por el programa del Bioscreen® y que refiere el tiempo en el que se detecta un cambio ≥ 0.3 unidades de DO en cada una de las cinéticas y se realizó un análisis estadístico para determinar el efecto que ejerció la nisina sobre éstos de las cepas de *Leuconostoc* (Figuras 6-11).

La Figura 6 muestra el efecto promedio de la nisina sobre la máxima población alcanzada de todas las cepas de *Leuconostoc*. Entre 2 y 10 ppm de nisina se observa una relación inversa con respecto a la máxima población alcanzada. A mayor concentración, menor es la población al final de la fase exponencial. Mientras que 12.5 ppm del conservador no ofrece un efecto inhibitorio mayor que 10 ppm.

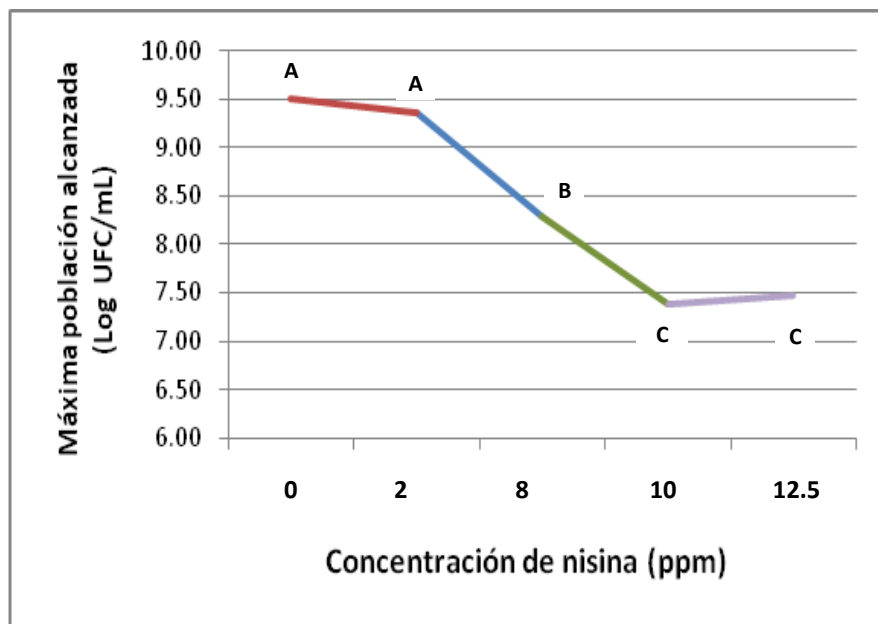


Figura 6. Efecto promedio de la nisina sobre la máxima población alcanzada de todas las cepas de *Leuconostoc*. Letras diferentes denotan diferencia significativa entre concentraciones.

La Figura 7 y el Cuadro 2 muestran la máxima población alcanzada para cada una de las especies en función de la concentración de nisina. No se observaron diferencias marcadas en el comportamiento de las tres especies. Aún cuando *L. lactis* muestra la mayor población en el caldo de cultivo sin nisina, es la especie en donde se observaron las concentraciones celulares más bajas en presencia de 10 y 12.5 ppm de nisina.

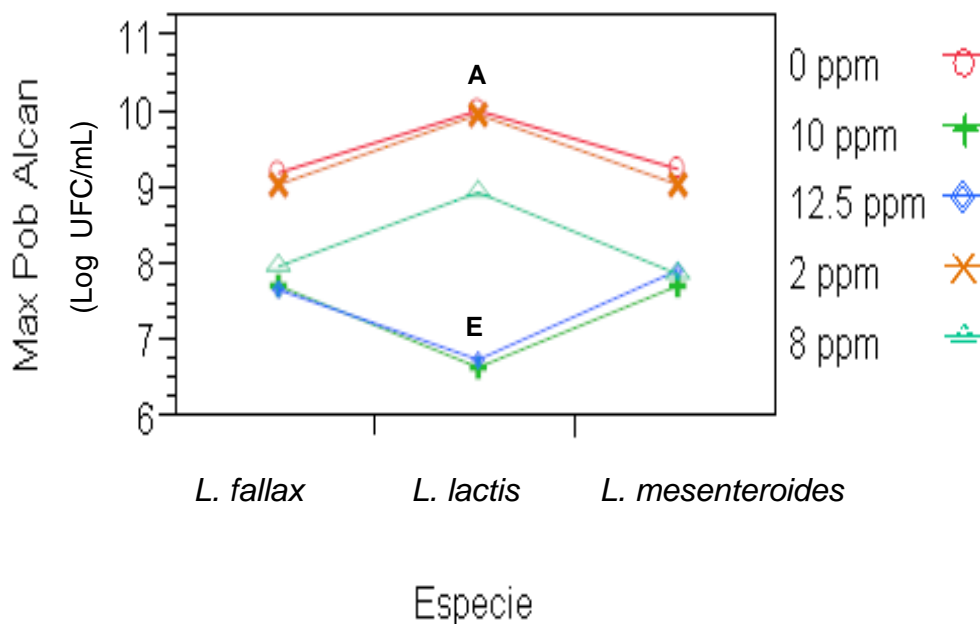


Figura 7. Efecto que ejercieron las diferentes concentraciones de nisina sobre la máxima población alcanzada por las cepas de *L. fallax*, *L. lactis* y *L. mesenteroides*.

La letra A de la gráfica anterior denota a *L. lactis* como la especie que presentó la mayor población a 0 y 2 ppm, mientras que la letra E muestra que la especie también presentó el mayor efecto inhibitorio de la nisina. Los valores correspondientes a estas asignaciones se presentan en el Cuadro 7.

Cuadro 2. Efecto de la nisina sobre los valores medios de máxima población alcanzada por cada especie. Letras diferentes denotan diferencia significativa entre las medias.

| Concentración (ppm) | Especie | Media (Log UFC/mL) | |
|---------------------|----------------------|--------------------|-----|
| 0 | <i>lactis</i> | 10.016 | A |
| 2 | <i>lactis</i> | 9.956 | AB |
| 0 | <i>mesenteroides</i> | 9.284 | ABC |
| 0 | <i>fallax</i> | 9.230 | ABC |
| 2 | <i>fallax</i> | 9.083 | C |
| 2 | <i>mesenteroides</i> | 9.035 | C |
| 8 | <i>lactis</i> | 8.973 | BC |
| 8 | <i>fallax</i> | 7.992 | D |
| 12.5 | <i>mesenteroides</i> | 7.928 | D |
| 8 | <i>mesenteroides</i> | 7.906 | D |
| 10 | <i>fallax</i> | 7.723 | D |
| 10 | <i>mesenteroides</i> | 7.716 | D |
| 12.5 | <i>fallax</i> | 7.695 | D |
| 12.5 | <i>lactis</i> | 6.786 | E |
| 10 | <i>lactis</i> | 6.687 | E |

Los colores rosa y azul resaltan la especie mostrada en la Figura 7 para la letra A y E, respectivamente.

El efecto de la adición de nisina sobre el incremento en la población de *Leuconostoc* durante la fase exponencial se muestra en la Figura 8, mientras el efecto sobre la especie se muestra en la Figura 9.

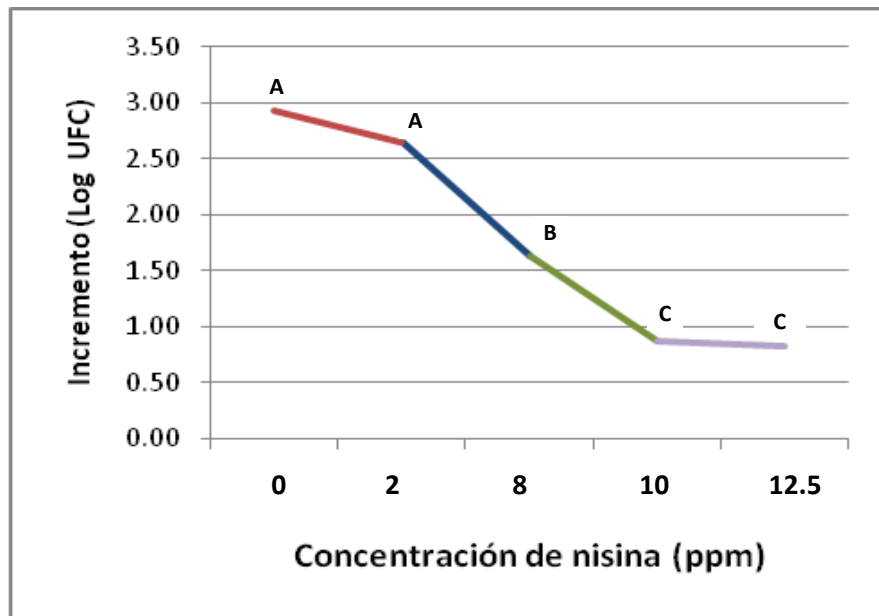


Figura 8. Efecto inhibitor de la nisina sobre el incremento para todas las cepas de *Leuconostoc*. Letras diferentes denotan diferencia significativa entre los valores medios de incremento.

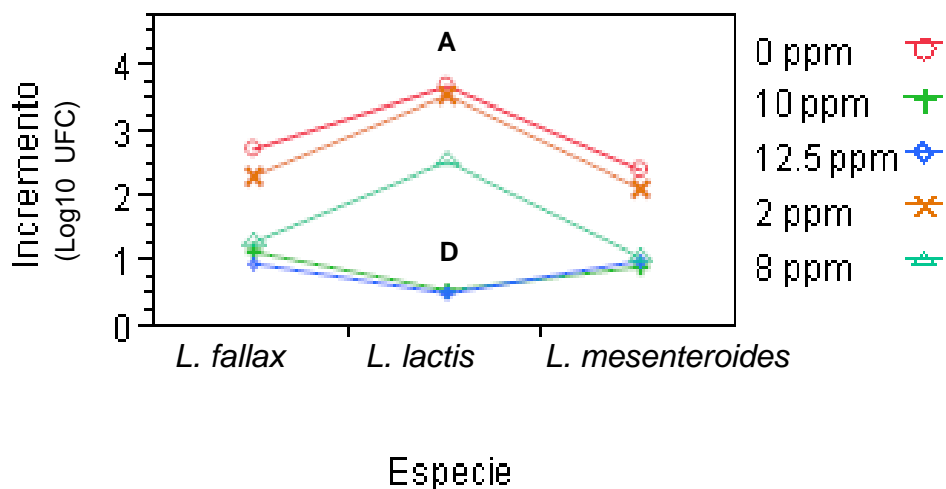


Figura 9. Efecto de la nisina sobre los valores de incremento para la especie *L. fallax*, *L. lactis* y *L. mesenteroides*.

La Figura 8 muestra que no existe diferencia significativa entre los valores de incremento a 0 y 2 ppm de nisina, y 10 y 12.5 ppm para las cepas de *Leuconostoc*. La misma situación se presentó para *L. lactis*, que fue la especie más inhibida. El Cuadro 3 muestra los valores obtenidos para la gráfica anterior. El renglón marcado con color rosa denota la especie con el mayor incremento y en verde aquella que se inhibió en mayor grado.

Cuadro 3. Efecto de la nisina sobre los valores medios del incremento para cada especie analizada. Letras diferentes denotan diferencia significativa entre las medias.

| Concentración (ppm) | Especie | Media (Log UFC) |
|---------------------|----------------------|-----------------|
| 0 | <i>lactis</i> | 3.712 A |
| 2 | <i>lactis</i> | 3.529 A |
| 0 | <i>fallax</i> | 2.698 B |
| 8 | <i>lactis</i> | 2.531 B |
| 0 | <i>mesenteroides</i> | 2.380 B |
| 2 | <i>fallax</i> | 2.292 B |
| 2 | <i>mesenteroides</i> | 2.134 B |
| 8 | <i>fallax</i> | 1.311 C |
| 10 | <i>fallax</i> | 1.130 CD |
| 8 | <i>mesenteroides</i> | 1.065 CD |
| 12.5 | <i>mesenteroides</i> | 1.036 CD |
| 12.5 | <i>fallax</i> | 0.969 CD |
| 10 | <i>mesenteroides</i> | 0.934 CD |
| 10 | <i>lactis</i> | 0.541 CD |
| 12.5 | <i>lactis</i> | 0.489 D |

El efecto de la nisina sobre el tiempo de detección para las cepas de *Leuconostoc* analizadas se muestra en la Figura 10. La nisina genera que el tiempo en que se inicia el desarrollo se prolongue.

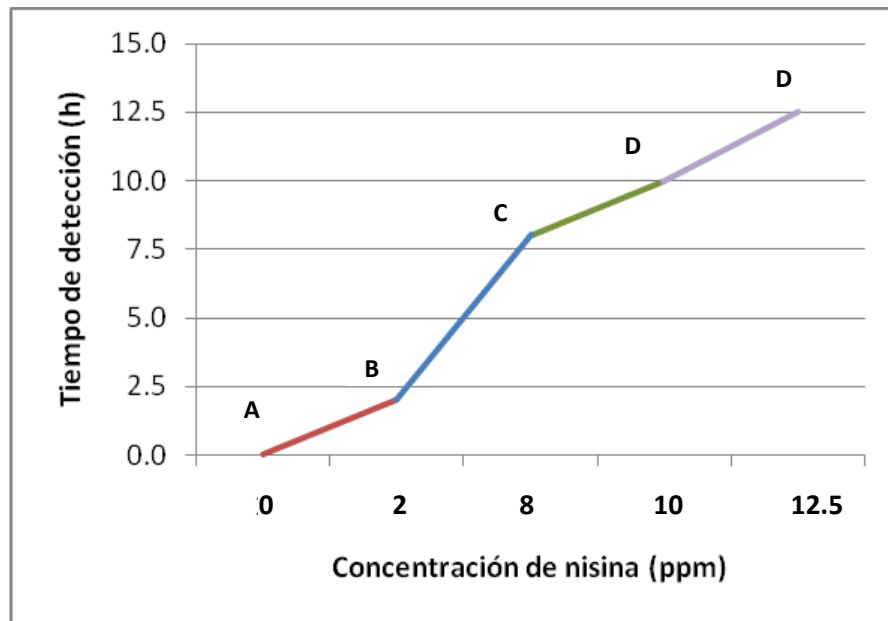


Figura 10. Efecto de la nisina sobre el tiempo de detección para las cepas de *Leuconostoc*. Letras diferentes denotan diferencia significativa entre concentraciones.

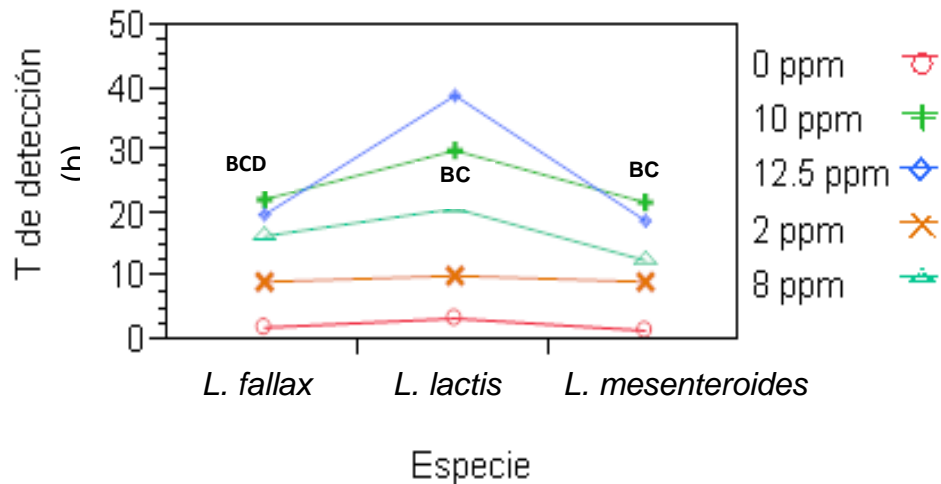


Figura 11. Efecto de la nisina sobre el tiempo de detección para las especies de *L. fallax*, *L. lactis* y *L. mesenteroides*.

La Figura 11 muestra el efecto que ejerció la nisina sobre el tiempo de detección de cada especie. A mayor concentración del conservador, mayor fue el tiempo en que las cepas de *Leuconostoc* iniciaron el desarrollo. *L. lactis* presentó los mayores tiempos de detección (hasta 38 horas), seguida de *L. mesenteroides* y, al último *L. fallax* como la especie que menos tarda en comenzar su desarrollo en presencia de nisina. Los valores correspondientes se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Efecto de la nisina sobre los valores medios de tiempo de detección obtenidos para cada especie. Letras diferentes denotan diferencia significativa.

| Concentración (ppm) | Especie | Media (h) |
|---------------------|----------------------|-------------|
| 12.5 | <i>lactis</i> | 38.660 A |
| 10 | <i>lactis</i> | 29.933 AB |
| 10 | <i>mesenteroides</i> | 22.266 BC |
| 8 | <i>lactis</i> | 21.740 BC |
| 10 | <i>fallax</i> | 21.013 BCD |
| 12.5 | <i>fallax</i> | 20.145 BCD |
| 12.5 | <i>mesenteroides</i> | 19.084 CD |
| 8 | <i>fallax</i> | 19.084 CDE |
| 8 | <i>mesenteroides</i> | 12.702 DEF |
| 2 | <i>lactis</i> | 9.953 DEFGH |
| 2 | <i>fallax</i> | 9.355 EFGH |
| 2 | <i>mesenteroides</i> | 9.049 EFG |
| 0 | <i>lactis</i> | 3.533 FGH |
| 0 | <i>fallax</i> | 1.966 GH |
| 0 | <i>mesenteroides</i> | 1.581 H |

VI.2 Asociación de la tolerancia a nisina con el genotipo de cepas de *Leuconostoc* spp.

El dendograma de *Leuconostoc lactis* (Figura 12) muestra con círculos verdes las cepas que no fueron capaces de desarrollar en presencia de 8 ppm de nisina en el medio, mientras en color crema aquellas que fueron inhibidas con 10 ppm. El cuadro 5 muestra el porcentaje de cepas que fueron inhibidas por completo a las diferentes concentraciones de nisina.

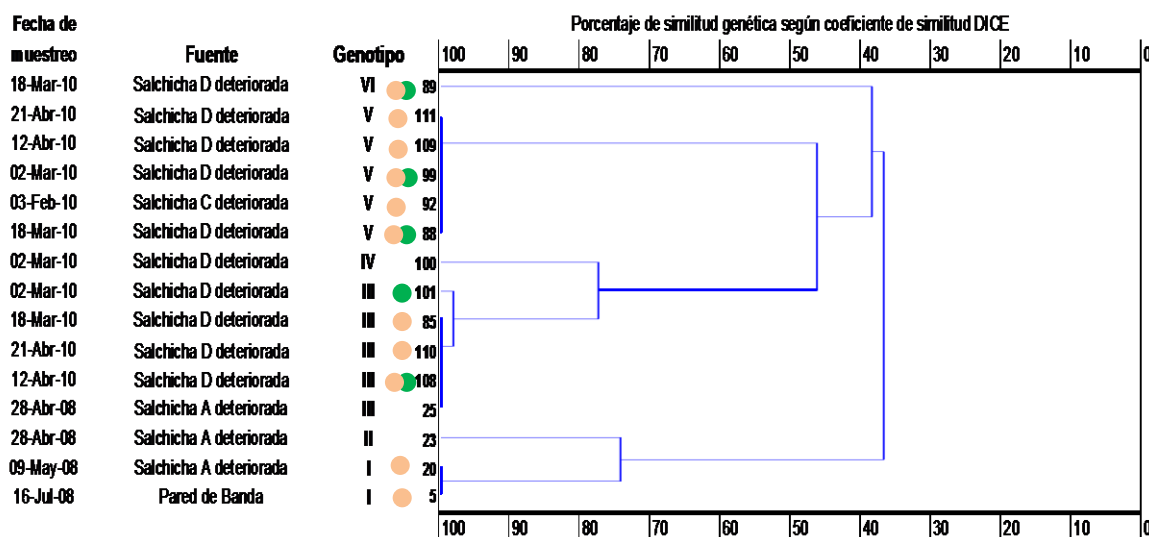


Figura 12. Dendrograma que muestra algunas cepas de *Leuconostoc lactis*, genotipos, fuente de aislamiento y fecha de muestreo englobadas en dos grupos de genotipos.

Cuadro 5. Porcentaje de inhibición ocurrido para cepas de *L. lactis*, *L. fallax* y *L. mesenteroides* en 5 concentraciones diferentes de nisina.

| Especie | 0 ppm | 2 ppm | 8 ppm | 10 ppm | 12.5 ppm |
|----------------------|-------|-------|-------|--------|----------|
| <i>lactis</i> | 0 | 0 | 33.3 | 73.3 | 80.0 |
| <i>fallax</i> | 0 | 0 | 41.4 | 48.3 | 69.0 |
| <i>mesenteroides</i> | 0 | 0 | 53.5 | 58.1 | 60.5 |

El dendograma de la especie *L. fallax* (Figura 13) muestra 23 genotipos diferentes, los cuales se dividen a su vez en 2 grandes grupos; aquel que comprende del genotipo 1 a 12 (color naranja) y del genotipo 13 a 23 (color verde).

La Figura 14 muestra la relación que existe entre los genotipos con el efecto que ejerció la nisina sobre el parámetro cinético de máxima población alcanzada (imagen A) y tiempo de detección (imagen B). Al conjuntar estos 2 parámetros en función de la concentración de nisina, se obtuvo un perfil del comportamiento de las cepas (Figura 15). El cuadro de color verde engloba a las más tolerantes (en las gráficas de cajas se aprecian que requiere más tiempo para iniciar el desarrollo) y se identifican para su posterior asociación.

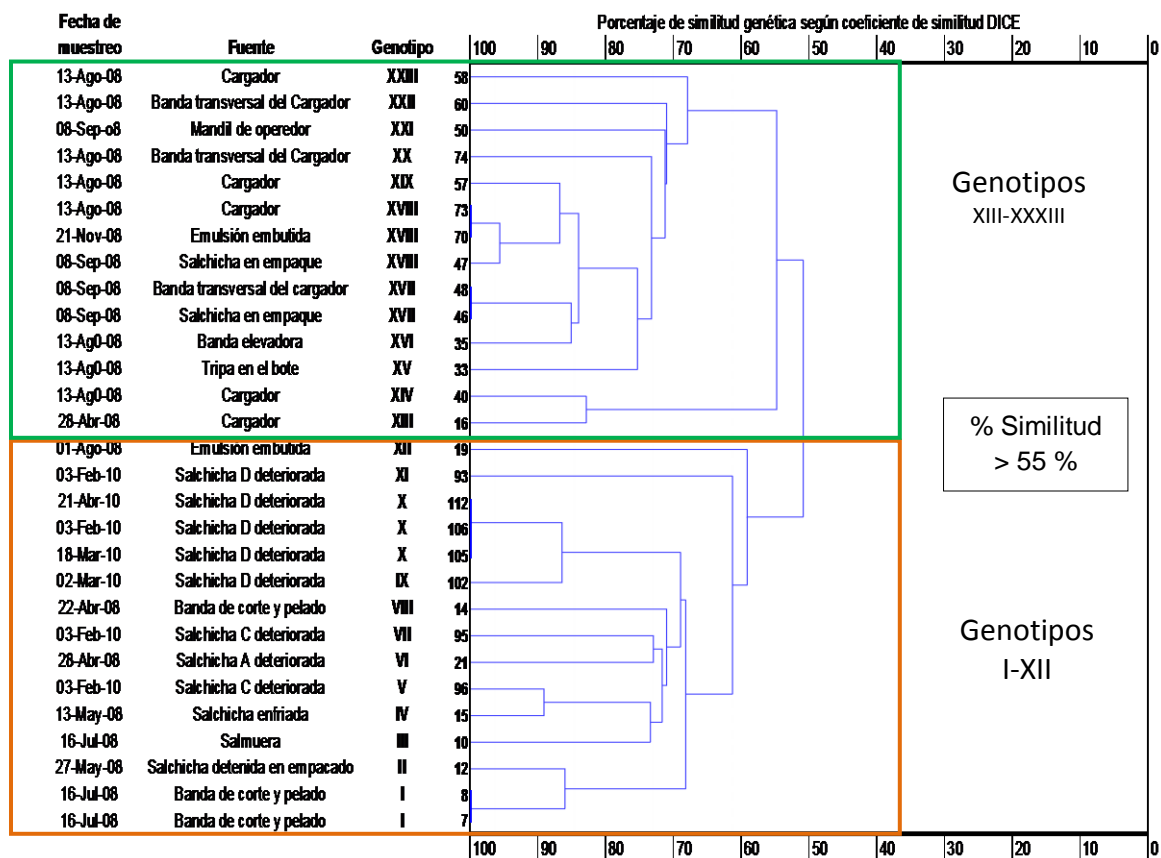


Figura 13. Dendograma que asocia dos grupos de genotipos para *Leuconostoc fallax*.

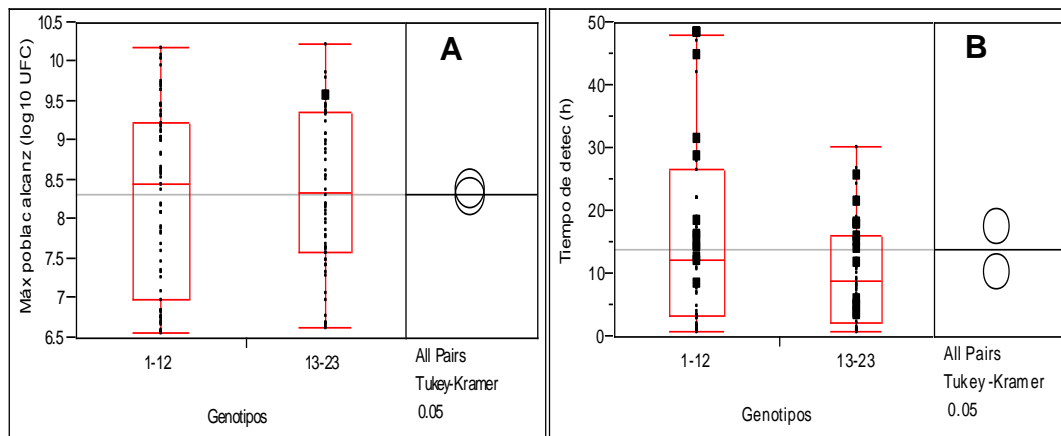


Figura 14. Relación entre genotipos de *Leuconostoc fallax* con respecto a la máxima población alcanzada (A) y el tiempo de detección (B).

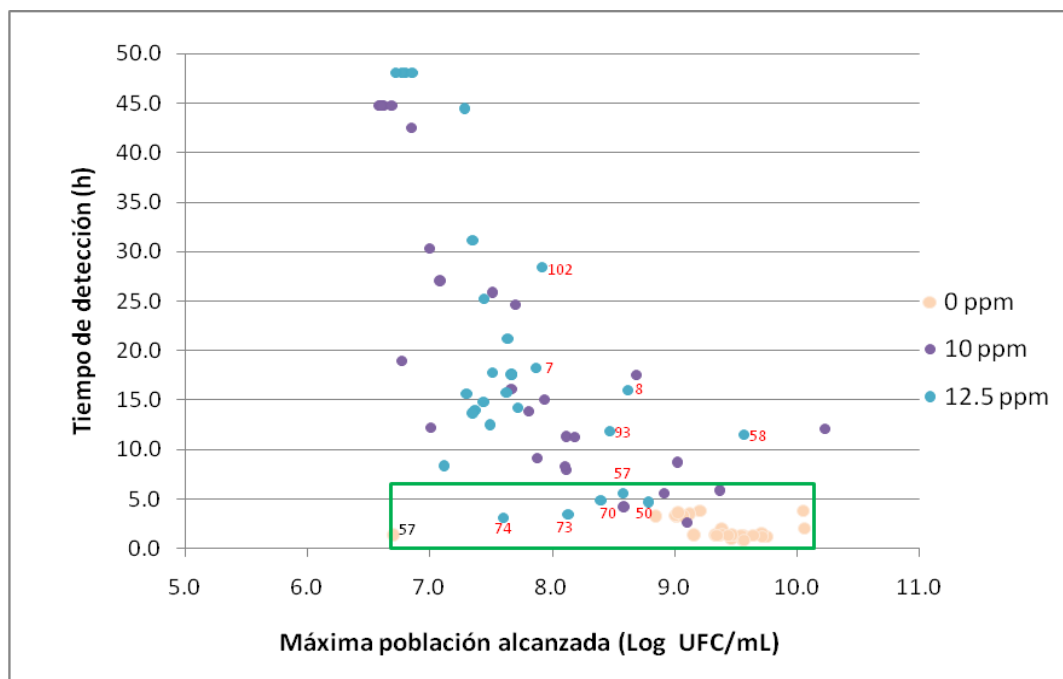


Figura 15. Asociación entre la máxima población alcanzada y el tiempo de detección de cepas de *L. fallax* a 0, 10 y 12.5 ppm de nisina. Los números rojos señalan el número de cepa. El cuadro verde señala las cepas con menor tiempo de detección en presencia de 12.5 ppm.

El dendrograma de *L. mesenteroides* muestra 3 grupos de cepas con una estrecha relación entre sí. Los cuadros de colores engloban a las cepas involucradas y definen el rango de % de similitud que existe entre ellas (Figura 16).

La Figura 17 muestra la relación que existe entre los genotipos con el efecto que ejerció la nisina sobre el parámetro cinético de máxima población alcanzada (imagen A) y tiempo de detección (imagen B). Al conjuntar estos 2 parámetros en función de la concentración de nisina, se obtuvo un perfil del comportamiento de las cepas (Figura 18). El cuadro de color verde engloba a las más tolerantes y se identifican para su posterior asociación.

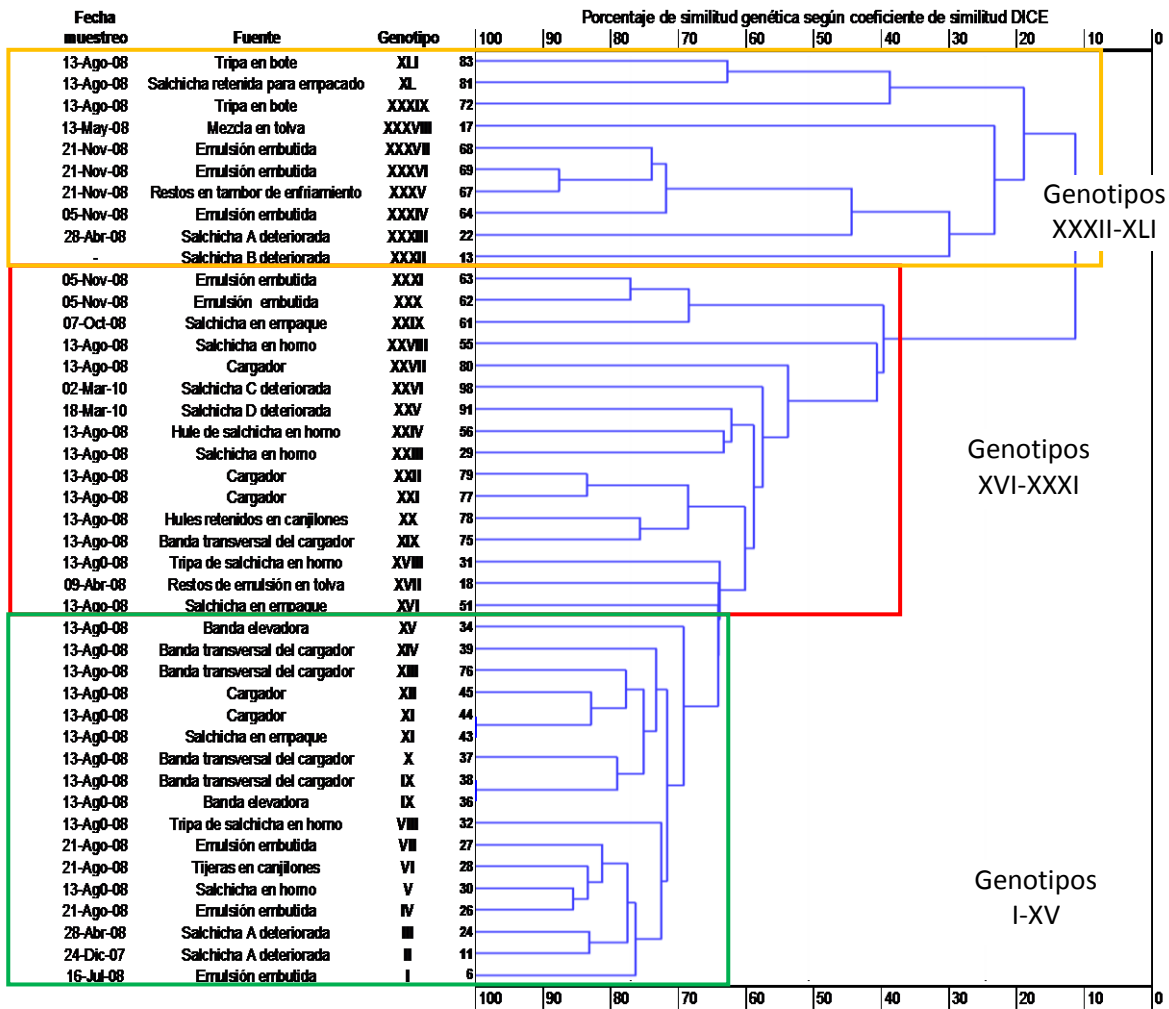


Figura 16. Dendrograma de *Leuconostoc mesenteroides* que muestra 3 grupos de genotipos asociados en función de su porcentaje de similitud.

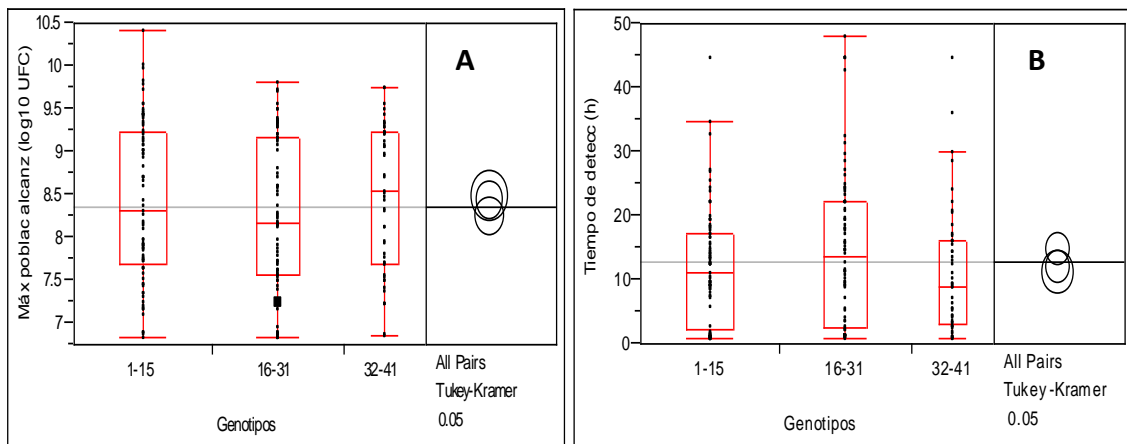


Figura 17. Relación que existe entre genotipos de *Leuconostoc mesenteroides* con respecto a la máxima población alcanzada (A) y el tiempo de detección (B).

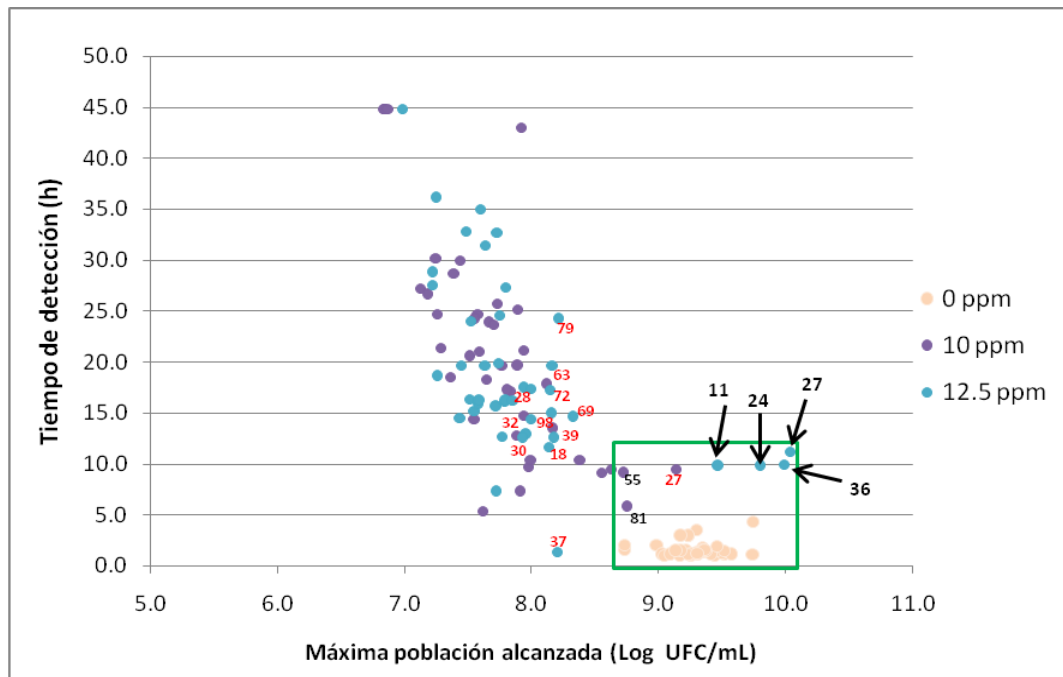


Figura 18. Asociación entre la máxima población alcanzada y el tiempo de detección de cepas de *L. mesenteroides* a 0, 10 y 12.5 ppm de nisina. Los números señalan el número de cepa. El cuadro verde señala las cepas que logran la misma población máxima en presencia de 12.5 ppm de nisina con respecto al control.

VII. DISCUSIÓN

La incorporación de nisina al medio de cultivo impactó sobre el desarrollo de *Leuconostoc*. El desarrollo de las cepas en el medio de cultivo sin nisina mostró valores de población máxima al final de la fase exponencial superior a los 10 log de UFC/mL y tiempos cortos de detección, (promedio de 2.1 h). A medida que la concentración de nisina fue mayor se observó una tendencia general a prolongarse la duración de la fase lag, disminución del incremento de la población durante la fase exponencial e incremento en el tiempo de detección. Dos hechos en relación a la dosis, se destacaron: 1) la concentración de 2 ppm no generó un efecto significativo en el desarrollo de la mayoría de las cepas y 2) no se observa una diferencia marcada en el grado de inhibición del desarrollo de las cepas entre 10 y 12.5 ppm de nisina. Aún a la concentración más alta permitida por la legislación mexicana, existen cepas de las tres especies capaces de desarrollar.

Considerando el comportamiento de todas las cepas de cada especie, se puede señalar que *L. mesenteroides* muestra mayor tolerancia a la nisina con sólo el 60.5 % de las cepas completamente inhibidas a 12.5 ppm, comparada con 69 % para *L. fallax* y 80 % para *L. lactis*. De acuerdo con Padilla-Frausto (2010), el porcentaje de similitud fue de 32 % para *L. fallax* y *L. mesenteroides* pero no hubo relación cercana con *L. lactis*. Estas diferencias en la información genética se observaron en el comportamiento de las especies ante nisina. En un estudio previo realizado por Cepeda-Márquez y col. (2008) se demostró el potencial deteriorador de salchichas de estas cepas. Aún cuando las tres especies mostraron capacidad para deteriorar, *L. mesenteroides* fue la especie que generó los signos de deterioro en el producto similares a los observados en brotes de deterioro que había sufrido una empresa productora. El conservador incluido en la formulación del producto contiene entre otros compuestos, nisina. La mayor capacidad de las cepas para tolerar este compuesto, le proporciona mayor posibilidad de desarrollar en el alimento y generar cambios en las características sensoriales que impiden su comercialización y consumo.

Hoover y Steenson (1993) proponen ciertos factores que afectan la eficacia de las bacteriocinas, entre ellos, el desarrollo de microorganismos resistentes a la bacteriocina o, como es el caso de *Listeria monocytogenes*, *C. butyricum* y *S. agalactiae*, puede surgir resistencia espontánea a nisina (Vuyst y Vandamme, 1994). Algunas de estas situaciones podrían suceder en las cepas que mostraron mayor tolerancia a la nisina. Por ejemplo, la cepa 36 de *L. mesenteroides*, la cual presenta una población máxima de 8-10 logaritmos a 10 y 12.5 ppm. Las cepas empleadas en este estudio se aislaron de superficies, materiales y producto de una empresa productora de salchichas a lo largo de 2 años. La caracterización genética de las cepas evidenció que las cepas pueden permanecer en el proceso de producción por meses (Padilla-Frausto, 2010). La exposición prolongada y/o repetida a los conservadores empleados en la fórmula podría estar induciendo la adaptación de las cepas y/o generando la selección de las cepas más tolerantes al compuesto.

La tolerancia de las cepas al efecto de la nisina, puede deberse a una alteración de los receptores enlace-nisina o a modificaciones intracelulares del enlace nisina, como lo explica Hoover y Steenson (1993), pero también pueden ser producidas por determinadas bacterias ácido lácticas resistentes, entre ellas, *Leuconostoc* spp. (De Vuyst y Vandamme, 1994).

Para *L. lactis* el efecto inhibitor de la nisina fue mayor en cepas con el genotipo mayor (de XIII-XXIII) que en cepas con genotipos menores (I-XII), a pesar de que ambos presentaron más del 50 % de similitud. Los dos grupos logran poblaciones al final de la fase exponencial similares, pero el tiempo de detección es diferente. El segundo grupo (XIII-XXIII) tarda menos en comenzar su desarrollo e incluye a las cepas que toleraron 12.5 ppm de nisina. Un tiempo de detección menor de 10 horas, les permitió alcanzar poblaciones de 7 a 9 logaritmos a esta concentración.

Para el caso de *L. mesenteroides*, la inhibición no fue homogénea para los genotipos. Genotipos (I-XV) con un porcentaje de similitud mayor del 65 % fueron los más tolerantes al efecto de la nisina y el grado de tolerancia disminuía conforme la similitud era más pequeña. Este grupo de genotipos incluye a las cepas que alcanzaron las mayores poblaciones microbianas. Un tiempo de detección menor de 10 horas mostró que las cepas 11, 24, 27 y 36 alcanzaban poblaciones de hasta 10 logaritmos.

VIII. CONCLUSIONES

La presencia de nisina en el medio incrementa los tiempos de detección, disminuye el incremento de la población durante la fase exponencial, logrando una menor población de las cepas de las tres especies de *Leuconostoc* estudiadas.

L. lactis es la especie que alcanzó las mayores poblaciones microbianas y presentó el menor tiempo de detección en medio de cultivo sin nisina. Es la especie que mostró la mayor diversidad en cuanto a su dinamicidad en medio de cultivo.

El orden de tolerancia a nisina fue: *mesenteroides* > *fallax* > *lactis*. Sin embargo la diferencia en la tolerancia entre *L. mesenteroides* y *L. fallax* es mucho menor que entre *L. fallax* y *L. lactis*.

Leuconostoc mesenteroides fue la especie que mostró la mayor resistencia y tolerancia a nisina en los genotipos I-XV, mientras para *Leuconostoc fallax* fue en XIII-XXIII.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Becerra, V. V. y Paredes, M. C. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura técnica*. **2000**; 60 (3): 270-281.

Björkroth, J. and Holzapfel, W. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weisella*. 3rd ed. En: *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. New York: Springer-Verlag, **2006**: 272 y 275.

Cabeza, E. A. H. Aportaciones a la caracterización de la morcilla de León y evolución de determinados parámetros físicos, químicos y microbiológicos durante su conservación a refrigeración. Universidad Autónoma de León. Tesis para obtener el grado de Doctor. **2006**: 71-72.

Cepeda-Márquez, L., Ramírez-Barrera, G., Arvizu-Medrano, S. M. y Fernández-Escartín, E. Reservorios de *Leuconostoc* en una planta procesadora de salchichas. Memorias del Congreso Internacional de Inocuidad, sección D. **2008**: 1-2.

Chen, H. and Hoover, D. G. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2003**; 2: 81-100.

Chenoll, E., Macián, M.C., P. Elizaquível, Aznar, R. Lactic acid bacteria associated with vacuum-packed cooked meat product spoilage: population analysis by rDNA-based methods. *The Society for Applied Microbiology*. **2007**; 102: 498-508.

Cleveland, J., Montville, T. J., Ingolf, F. N. and Chikindas, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. **2001**; 71: 1-20.

Cloete T.E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeter Biodegrad*. **2003**; 51: 277-82.

Codex Alimentarius. Codex-Stand 192-1995. Norma general para aditivos alimentarios. **1995** [consultado 2010 mayo 10].

Davidson, P. M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. **1997**; 520-549.

De la Fuente, N.M.S. Biosíntesis y actividad de bacteriocinas producidas por cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* con potencial aplicación como

bioconservadores en alimentos. Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis para obtener el grado de doctor. **2009**: 33-34.

Dever, L. A. and Dermody, T. S. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. Archives of Internal Medicine. **1991**; 151: 886–95.

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications. First edition. Great Britain: Blackie Academic & Professional. **1994**; 2, 7, 157.

Dolz, M. C. Bacteriocinas de probióticos. Nuevos enfoques bioterapéuticos: PINHE. Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria. **2008**; 28 (3): 20-37.

Dykes, G. A., Marshall, L. A., Meissner, D. and Von Holy, A. Acid treatment and pasteurization affect the shelf life and spoilage ecology of vacuum-packaged Vienna sausages. Food Microbiology. **1996**; 13 (1): 69-74.

Fernández, E. E. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. 1era edición. Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro. **2000**: 14-18, 25, 28, 48.

Fernández, E. E. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. 2da edición. Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro. **2008**: 34-115.

Frobisher, Martín. Microbiología. Introducción a los microorganismos con una referencia especial a los procariotes. 4a edición. España: Salvat Editores. **1969**; 501, 511-512.

Giancarlo-Moschetti., Blaiotta, G., Villani, F., Coppola, S. Specific detection of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* with DNA primers identified by Randomly Amplified polymorphic, DNA analysis. Appliedd Enviroment Microbiology. **2000**; 66(1):422-424.

González-Martínez, B. E., Gómez-Treviño, M. y Jiménez-Salas Z. Bacteriocinas de probióticos. Revista Salud Pública y Nutrición. **2003**; 4 (2). Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/iv/2/ensayos/bacteriocinas.htm>

Hamasaki, Y., Ayaki, M., Fuchu, H., Sugiyama, M. and Morita, H. Behavior of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from spoiling cooked meat products. Applied and Environmental Microbiology. **2003**; 69 (6): 3668-3671.

- Harris**, L. J., Fleming, H. P. and Klaenhammer, T. R. Sensitivity and resistance of *Listeria Monocytogenes* ATCC 19115, Scott A and UAL500 to nisin. Food Fermentation Laboratory. **1991**; 1-5.
- Hernández**, P. E., Rodríguez, J. M., Cintas, L. M., Moreira, W. L., Sobrino, O. J., Fernández, M. F., and Sanz B. Utilización de bacterias lácticas en el control de microorganismos patógenos de los alimentos. Microbiología SEM. **1993**; 9: 37-48.
- Hoover**, D. G., and Steenson, L. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. U.S.A.: Academic Press, INC. **1993**; 54-58.
- Jay**, J. M. Modern food microbiology. 6 th edition. U. S. A.: AN Aspen Publication. **2000**: 220, 269.
- Korkeala**, H. K. and Björkroth, K. J. Microbiological spoilage and contamination of vacuum-packaged cooked sausages. Journal of Food Protection. **1997**; 60 (6): 731-724.
- Lederbeg**, J. Encyclopedia of Microbiology. Volume 1, A-C. First edition. U.S.A.: Academic Press, INC. **1992**: 186.
- Madigan**, M. T., Martinko, J. M. y Brock, P. J. Biología de los microorganismos. Décima edición. España: Editorial Pearson Educación. **2004**: 688-697.
- Martín**, Belén J. Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares, estandarización, seguridad y mejora tecnológica. España: Universidad de Girona. Memoria. **2005**: 41, 55, 61.
- Mata**, Carmen. M. A. Empleo de fermentos lácticos en la fabricación de productos cárnicos. España: Universidad de Córdoba. Memoria para obtener el grado de doctor en Veterinaria. **1999**: 26, 30.
- Medina**, V. A. Expresión y recuperación de una proteína recombinante insertada en *E. coli* BL21 (DE3). Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis. **2008**: 3-5.
- Moll**, G. N., Konings, N. and Driessen, A. J. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and poreformation. Antonie van Leeuwenhoek. **1999**; 76: 185-198.

Müller, S. G. y Ardoíno, M. A. Procesamiento de carnes y embutidos, elaboración, estandarización y control de calidad, un manual práctico de experiencias. DCT. [serie en internet] **2003** [consultado 2010 agosto 15]; [pp 1-192]. Disponible en: www.science.oas.org/oea_gtz/LIBROS/EMBUTIDOS/cap25.htm

Muñoz Arantxa. Optimización de la producción de la enterotoxina AS-48 y ensayo de su eficacia como bioconservante en alimentos. España: Universidad de Granada. Memoria para obtener el grado de Doctor en Ciencias. **2006**: 7, 33-36, 40-54.

Nettles, C. G. and Barefoot, S. F. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria. *Journal Food Protection*. **1993**; 56: 338-356.

NMX-F-065-1984. Norma Mexicana. Alimentos. Salchichas. Especificaciones. Dirección general de Normas. Consultado: 2010 Agosto 6.

NOM-121-SSA1-1994. Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. Consultado: 2010 Agosto 20.

Nychas, G. J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C. and Koutsoumanis, K. P. Meat spoilage during distribution. *Meat Science*. **2008**; 78: 77-89.

Padilla-Frausto, J. Jesús. Diversidad genética y capacidad para formar biopelículas de cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas de una planta procesadora de salchichas. Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. **2010**: 3-8, 10, 13-15.

Parada, J. L., Ricoy, C. C., Medeiros, A. B. and Soccol, C. R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Archives of Biology and Technology*. **2007**; 50 (3): 521-542.

Pongtharangkul, T. and Demirci, A. Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2004**: 65, 268–272.

Price, J. F. y Schweigert, B. S. Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. 1era. edición. España: Editorial Acribia, **1976**: 482-511.

Randazzo, C. L., Caggia, C. and Neviani, E. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods*. **2009**; 78: 1-9.

Ray, B. *Fundamental Food Microbiology*. United States of America: CRC Press. **1996**: 25, 37, 245, 248.

Rayman, M. K., Aris, B. and Hurst, A. Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. *Applied and Environmental Microbiology*. **1981**; 41 (2): 375-780.

Rojas, C. y Vargas, P. Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. *Tecnología en marcha*. **2008**; 21 (2): 9-16.

Russell, A. D. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *Journal Application Bacteriology*. **1991**; 71: 191-201.

Russell, A. D. Plasmids and bacterial resistance to biocides. *Journal Application Microbiology*. **1997**; 83 (2): 155-165.

Scott, M. Holt and Cote, G. L. Differentiation of dextran-producing *Leuconostoc* strains by a modified Randomly Amplified Polymorphic DNA protocol. *Applied and Environmental Microbiology*. **1998**; 64 (8): 3096-3098.

Struelens, M. *Molecular epidemiology. Laboratory Diagnosis of Bacterial Infections*. New York: Marcel Dekker. **2001**: 125-145.

Tenover, F., Arbeit, R. and Goering, R. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A 112 review for healthcare epidemiologists. *Infection Control Hospital Epidemiology*. **1997**; 18(6): 426-439.

Von Holy, A., W. H. Holzapfel and Dykes, G. A. Bacterial populations associated with Vienna sausage packaging. *Journal Food Microbiological*. **1992**; 9: 45-53.