



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C.**

**“ACTIVIDAD BACTERIOCINOGENICA DE
PSICRÓTROFOS AISLADOS DE VEGETALES FRENTE A
E. coli O157:H7 y *Salmonella* Saintpaul”**

Por:

Q.B.C José Agustín Cota Coronado

TESIS APROBADA POR LA

Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

Diciembre del 2015

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de José Agustín Cota Coronado, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez
Director de Tesis



Dra. Irasema Vargas Arispuro
Asesor



Dra. Verónica Mata Haro
Asesor



MC. Emmanuel Aispuro Hernández
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	11
II. ANTECEDENTES.....	13
II.1 Buenas prácticas en la agricultura.....	13
II.2 Problemas de salud pública asociada a patógenos en productos agrícolas frescos.....	14
II.3 Microorganismos antagonistas en el control de patógenos en alimentos.....	16
II.4 Bacteriocinas y actividad bacteriocinogénica.....	21
II.5 Otros compuestos producidos por bacterias que aportan actividad antagonista.....	25
II.6 Aplicaciones de bacteriocinas en alimentos.....	26
II.7 Estudios de antagonismo en psicrotrofos.....	27
III. HIPÓTESIS.....	28
IV. OBJETIVO GENERAL.....	29
4.1 Objetivos Específicos.....	29
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
V.1 Reactivación de cepas.....	19
V.2 Ensayo de antagonismo célula Vs. Célula.....	31

V.3 Obtención de bacteriocinas.....	31
V.4 Ensayo de actividad bacteriocinogénica.....	32
V.5 Tinción Gram y prueba de Catalasa.....	32
V.6 Inhibición por compuestos de naturaleza no proteica.....	33
V.7 Cuantificación de proteína.....	34
V.8 Electroforesis para péptidos.....	34
V.9 Ensayo <i>in vivo</i>	35
V.10 Identificación molecular de colonias con actividad bacteriocinogénica (BCCG).....	35
V.11 Análisis estadístico.....	36
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
VI.1 Evaluación de la actividad antagónica y bacteriocinogénica.....	38
VI.2 Ensayos para detección de otros metabolitos antagonistas.....	44
VI.3 Evaluación de péptidos presentes en medios de cultivo libres de células.....	47
VI.4 Ensayo de actividad bacteriocinogénica de aislados de psicrótrofos frente a <i>Salmonella</i> Saintpaul en espinaca.....	50
VI.5 PCR punto final y secuenciación.....	52
VII CONCLUSIONES.....	56
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Antagonismo en placa de los controles de BAL frente a <i>Salmonella</i> Saintpaul y <i>E. coli</i> O157:H7.	39
2	Antagonismo en placa del extracto proveniente del medio libre de células de psicrótrofos y <i>Pediococcus acidilactici</i> (control +).	42
3	Perfil electroforético de los extractos libres de células en geles de poliacrilamida por SDS-PAGE.	48
4	Conteo de <i>Salmonella</i> Saintpaul a 48 h de la aplicación de los extractos con actividad bacteriocinogénica.	51
5	Productos de amplificación de los iniciadores: 27F-519R.	53
6	Productos de amplificación de los iniciadores: 519F-1301R.	54
7	Diagrama de amplificación del gen 16S ribosomal	54

LISTA DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1	Brotes de <i>Salmonella</i> Saintpaul y <i>E. coli</i> O157:H7 relacionados con hortalizas, registrados de 2008 a 2014.	15
2	Clasificación de los tipos de antagonismo causado por microorganismos.	19
3	Clasificación de bacteriocinas en base a características estructurales y biológicas de los compuestos liberados por bacterias ácido lácticas.	23
4	Actividad antagonista célula-célula de las BAL Vs. <i>S. Saintpaul</i> y <i>E. coli</i> O157:H7.	39
5	Actividad antagonista célula-célula de los aislados de psicrótrofos Vs. <i>S. Saintpaul</i> y <i>E. coli</i> O157:H7.	40
6	Actividad bacteriocinogénica libre de células de BAL Vs. <i>S. Saintpaul</i> y <i>E. coli</i> O157:H7.	41
7	Actividad bacteriocinogénica de aislados de psicrótrofos obtenidos de cilantro Vs. <i>S. Saintpaul</i> y <i>E. coli</i> O157:H7.	43
8	Detección de otros metabolitos con actividad antagonista.	45
9	Tinción Gram y prueba de catalasa.	46
10	Identificación molecular de los aislados con actividad bacteriocinogénica por comparación de las secuencias en el banco de genes.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ASQ: Sociedad Americana para la Calidad

BAL: Bacterias Ácido Lácticas

BCA: Agente de control biológico

CDC: Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos de América

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

ETAs: Enfermedades Transmitidas por Alimentos

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos de América

HACPP: Análisis de Riesgos y de Puntos Críticos de Control

kDa: Kilodalton

Log: Logaritmo base 10

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

RESUMEN

Existen microorganismos que inhiben el desarrollo de patógenos, mediante la liberación de péptidos antimicrobianos denominados bacteriocinas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad bacteriocinogénica, *in vitro* e *in vivo* de aislados bacterias psicrótrofas obtenidos de cilantro (*Coriandrum sativum* L.), frente a *Salmonella* Saintpaul y *E. coli* O157:H7. Para lo cual: 1) Se seleccionaron aislados con capacidad antagonista célula vs célula frente a los patógenos, 2) se evaluó su actividad bacteriocinogénica en placa, 3) se obtuvo la secuencia del gen 16S ARNr, 4) se determinó el perfil electroforético de las proteínas en los sobrenadantes de los cultivos y 5) se evaluó la actividad *in vivo* de estos extractos en un modelo de espinaca comercial. Mediante un ensayo célula vs célula. Diez aislados tuvieron actividad antagonista contra los patógenos, de las cuales seis presentaron actividad bacteriocinogénica *in vitro*, con halos de inhibición similares al control positivo (bacterias ácido lácticas). Los seis aislados pertenecen a los géneros *Serratia* sp. Y *Enterobacter* sp. El perfil electroforético de los sobrenadantes de caldos de cultivo con actividad mostró proteínas con un tamaño de 45 kDa para las cepas 1 y 2 (identificadas como *Serratia* sp.), mientras que un péptido menor a 4 kDa en el extracto del aislado número cuatro, identificada como *Enterobacter* sp. El ensayo de antagonismo *in vivo* mostró que los extractos proteicos de los aislados de psicrótrofos evaluados, redujeron en promedio 3.6 log (10 UFC/g) de *Salmonella* Saintpaul en espinaca comercial (P<0.05) a niveles comparables con los de la bacteriocina comercial nisina. Se concluye que existe actividad bacteriocinogénica de péptidos segregados por aislados de *Serratia* sp. y *Enterobacter* sp. frente a *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Saintpaul *in vitro* e *in vivo* frente a *Salmonella* Saintpaul en un modelo de espinaca comercial.

Palabras clave: Antagonismo, actividad bacteriocinogénica, bacteriocinas, patógenos, psicrótrofos.

ABSTRACT

Some microorganisms inhibit the growth of pathogens by releasing antimicrobial peptides called bacteriocins. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* bacteriocinogenic activity of psychrotrophic bacteria isolated from coriander (*Coriandrum sativum* L.), against *Salmonella* Saintpaul and *E. coli* O157: H7. For which: 1) strains with direct cell antagonistic capacity against pathogens were selected, 2) their bacteriocinogenic activity was evaluated and 3) the electrophoretic profile of proteins in the culture supernatants were determined. 4) the *in vivo* activity of *in vitro*-active extracts was evaluated in an artificially-contaminated commercial spinach model and 5) strains were identified by 16S rRNA gene sequencing. Ten antagonistic strains were selected from the direct cell test, and six of them showed *in vitro* bacteriocinogenic activity, with halos of inhibition similar to the positive control (lactic acid bacteria). The six strains belong either to the genera *Serratia* sp. or *Enterobacter* sp. Electrophoretic patterns of proteins in active supernatants showed 45 kDa bands for strains 1 and 2 (identified as *Serratia* sp.), while a 4 kDa peptide from the strain 4 extract, (*Enterobacter* sp). The *in vivo* antagonism test showed that the protein extracts of isolates reduced the up to 3.6 log of *Salmonella* Saintpaul (log 10 CFU/g) in commercial spinach (p <0.05) to levels comparable to those of commercial bacteriocin nisin. We conclude that secreted peptides by *Serratia* sp. and *Enterobacter* sp. strains confer *in vitro* bacteriocinogenic activity against *E. coli* O157: H7 and *Salmonella* Saintpaul and *in vivo* activity against *Salmonella* Saintpaul in a commercial spinach model.

Keywords: Antagonism, bacteriocinogenic activity, bacteriocins, pathogens, psychrotrophs.

I. INTRODUCCIÓN

En la agricultura moderna, las buenas prácticas agrícolas son hasta la fecha, el método más efectivo para reducir o eliminar la presencia de peligros biológicos en los productos agrícolas frescos, sin embargo a pesar de un excelente desarrollo de las prácticas, puede existir contaminación en alguna de las etapas en la cadena de producción primaria del cultivo (Brandl, 2008). Los contaminantes más persistentes son los de carácter microbiológico, los cuales no son detectables a la vista, producen enfermedades tanto a la planta como al consumidor y tienen la propiedad de adaptarse a condiciones adversas. Los microorganismos patógenos en los alimentos se controlan con el uso de desinfectantes químicos, sin embargo el fuerte impacto a la salud demostrado en diversos estudios *in vitro* e *in vivo*, ha propiciado que su utilización disminuya de manera considerable (EFSA, 2013). Por tanto han surgido diversas alternativas innovadoras para atender esta problemática con impacto en la salud pública.

Una de estas alternativas es el aprovechamiento de bacterias antagonistas inocuas que se desarrollan en los alimentos, para la eliminación de bacterias patógenas persistentes en ellos. Cuando un microorganismo o sus productos metabólicos inhiben el crecimiento de otros, se le conoce como antagonismo microbiano. En la actualidad se han aislado diversas bacterias con propiedades antagonistas, que por sus características se emplean en la industria y otras más se encuentran en investigación. Es por esto que es importante resaltar el potencial del antagonismo bacteriano y continuar con el estudio de su efecto frente a los patógenos más persistentes en la industria alimentaria, así como su

mecanismo de acción para asegurar su utilización viable como control biológico de patógenos en alimentos.

II. ANTECEDENTES

II.1 Buenas prácticas en la agricultura

Se definen como el conjunto de métodos empleados para resguardar la seguridad de alimentos frescos no procesados. Las buenas prácticas son intereses que competen a todo el sector de la industria alimentaria, pues se interrelacionan los agricultores, la industria y consumidores (FDA, 2013). Los agricultores son los que implementan todos los requerimientos esenciales para el desarrollo del cultivo y por lo tanto tienen que tomar las medidas adecuadas para el control de algún microorganismo o insecto que lo afecte. Asimismo, utilizar equipo para evitar que el personal que tiene contacto directo con los vegetales, de manera involuntaria, contamine con algún patógeno al cultivo o los frutos. La industria de alimentos procesados tiene maneras más controladas para preservar sin contaminación a los alimentos, pues se tienen programas bien establecidos como el análisis de peligros y control de puntos críticos (HACPP), en donde existen puntos de revisión y si persiste el riesgo de contaminación, se aplique una medida de control para asegurar la inocuidad del alimento (ASQ, 2009).

Por otra parte, el consumidor puede descontaminar de manera terminal un alimento fresco, pero si este tratamiento es inefectivo o el alimento está en algún envase o enlatado, el patógeno o el compuesto segregado por el patógeno puede permanecer hasta su consumo (Brandl, 2008). Es por eso que

a pesar de las buenas prácticas puede existir la presencia de patógenos, que provocan brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) convirtiéndose en un problema de salud pública.

II.2 Problemas de salud pública asociada a patógenos en productos agrícolas frescos

La presencia de patógenos o sus toxinas en alimentos puede ocasionar a los consumidores daños a la salud (Barreto *et al.*, 2010), denominadas como “Enfermedades Transmitidas por Alimentos” (ETAs). El impacto de la enfermedad dependerá del género y de la carga bacteriana (unidades formadoras de colonias) que se encuentre presente en el alimento. Los géneros más comúnmente involucrados en ETAs incluyen a *Salmonella* y *E. coli*, los cuales se han aislado en frutas y hortalizas, y llegan al alimento a través del contacto con heces, aguas contaminadas, entre otras fuentes (Beuchat, 1998).

Del año 2000 a 2007 se registró en el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos de América (CDC) que 9.4 millones de todas las STAs registradas, son causadas por 31 patógenos dentro de los cuales, están *Salmonella* y *E. coli* (CDC, 2013). En el ámbito de vegetales, se han detectado brotes importantes de los géneros *Salmonella* Saintpaul y de *E. coli* O157:H7 señalados en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Brotes de *Salmonella* Saintpaul y *E. coli* O157:H7 relacionados con hortalizas, registrados de 2008 a 2014 (CDC, 2014).

Brotes			
Cepa	Año	Afectados (Núm. De individuos)	Cultivo
<i>E. coli</i> O157:H7	2006	199	Espinaca (CDC, 2006)
<i>Salmonella</i> Saint Paul	2008	167	Tomates y chile jalapeño (CDC, 2008)
<i>Salmonella</i> Saint Paul	2009	235	Germinados de alfalfa (CDC, 2009)
<i>E. coli</i> O157:H7	2011	60	Lechuga romana (CDC, 2011)
<i>E. coli</i> O157:H7	2012	33	Espinaca (CDC, 2012)
<i>Salmonella</i> Saint Paul	2013	84	Pepino (CDC, 2014)

Los brotes de ETAs se pueden generar en la producción primaria, durante el desarrollo del vegetal y durante el proceso de cosecha y post-cosecha, pues el alimento se puede contaminar durante el riego, la aplicación de insumos agrícolas y manejo post-cosecha. Algunos pueden ser causa de contaminación cruzada, por ejemplo: un trabajador que no desinfectó el utensilio con el cual manipuló un vegetal contaminado, puede transmitir ese microorganismo en los alimentos que sigue manipulando (Brandl, 2008).

Brotes de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7, han llamado de manera importante la atención en vegetales de hojas verdes, pues se ha encontrado en lechuga romana, que las poblaciones de patógenos se desarrollan en las hojas más jóvenes del interior en comparación con las de la parte media y superficial, que son más viejas, es por esto que el lavar superficialmente el vegetal, no lo

descontaminará por completo, volviéndose un microorganismo persistente (Brandl y Amundson, 2008). Entre algunos brotes de *E. coli* O157:H7 en espinaca cruda en el año 2006, donde afectó a 199 personas de 26 estados en los Estados Unidos, provocando la muerte de 3 individuos (CDC, 2006).

En el año 2013, la FDA propuso una norma basada en datos de investigación para establecer los estándares mínimos de desarrollo bacteriano para la cosecha, empaquetado y almacenamiento seguro de los productos para el consumo humano. Esto tuvo un impacto positivo en cada etapa del procesamiento desde la manipulación en el campo, hasta el consumidor, para tener libre de contaminación los vegetales de hojas verdes. Un tópico de estas medidas de control, es la reducción o eliminación de patógenos por medio de microorganismos antagonistas (FDA, 2013).

II.3 Microorganismos antagonistas en el control de patógenos en alimentos

Las plantas se encuentran rodeadas de una gran variedad de fauna y microorganismos que contribuyen a la regulación del desarrollo de patógenos. Los microorganismos que tienen un impacto mayor al contrarrestar enfermedades en vegetales son los saprófitos; simbiontes facultativos de la planta, e hiperparásitos facultativos. Estos son capaces de colonizar y liberar compuestos que realizan el control biológico mientras crecen en los tejidos vegetales (Pal y Gardener, 2006).

Para que un microorganismo tenga aplicación tecnológica como control biológico (ACB), se tiene que poder manipular de manera sencilla en el laboratorio y el lugar donde se vaya a aplicar, razón por la cual el número de

ACB es reducido. Los géneros de bacterias y hongos que se utilizan son *Bacillus*, *Burkholderia*, *Lysobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*; mientras que de hongos son *Ampelomyces*, *Coniothyrium*, *Dactylella*, *Gliocladium*, *Paecilomyces* y *Trichoderma*. También se pueden emplear organismos más recalcitrantes como micorrizas, *Pisolithus* sp. y *Glomus* sp., ya que limitan las infecciones subsecuentes y a algunos patógenos que causan hiperparasitismo en plantas. Se ha observado que en la interacción de plantas con virus que pueden ser fitopatógenos, estos últimos son capaces de inactivar a otros virus de alta virulencia, esto mediante la activación de vías que inducen defensa por parte del hospedero (Pal y Gardener, 2006).

Es por esto que el antagonismo microbiano ha emergido como una aplicación tecnológica para la mejora de las buenas prácticas en la agricultura. Se utiliza como un control de crecimiento de microorganismos patógenos, el cual puede describirse a través de varios mecanismos que actúan a distintos niveles (macromolecular y molecular) y muestran una inhibición en el desarrollo de los mismos (Gardener y Fravel, 2002). El antagonismo se puede clasificar en dos grandes grupos: 1) antagonismo directo, que resulta del contacto físico, donde el patógeno tiene un alto grado de selectividad por el mecanismo que exprese el agente de control biológico y, 2) el antagonismo indirecto, en el cual no se necesita un contacto físico necesariamente entre patógeno y antagonista (Cuadro 2).

Existen diversos mecanismos mediante los cuales los microorganismos pueden ejercer el antagonismo, por ejemplo; muchos microorganismos liberan enzimas líticas que pueden hidrolizar una gran variedad de compuestos poliméricos como quitina, proteína, celulosa, hemicelulosa y ADN. Esto actúa inhibiendo directamente el desarrollo del patógeno en la interacción microbio-microbio y se ha observado que descomponen los compuestos poliméricos para poder nutrirse del carbono. También, se puede mejorar la producción de compuestos

tóxicos para los patógenos y así lograr una mejor supresión (Pal y Gardener, 2006).

En el control biológico post-cosecha de alimentos, se han utilizado aditivos para potenciar el efecto antagonista de la microbiota presente en el alimento. El quitosano, por ejemplo, estimuló la producción de enzimas hidrolíticas de celulosa en microorganismos antagonistas en limones, lo que a su vez favoreció la inhibición de patógenos (Benhamou, 2004).

Cuadro 2. Clasificación de los tipos de antagonismo causado por microorganismos. Descripción de los mecanismos de antagonismo microbiológico observado. Tomado de: Pal y Gardener, 2006.

Tipo	Mecanismo	Ejemplos
Antagonismo directo	Hiperparasitismo/depredación	Lítico/Micovirus no líticos <i>Ampelomyces quisqualis</i> <i>Lisobacter enzymogenes</i> <i>Pasteuria penetrans</i> <i>Trichoderma virens</i>
Mezcla patógeno-antagonista	Antibióticos	2-4-diacetilfluoroglucinol Fenazinas Lipopéptidos cíclicos
	Enzimas líticas	Quitinasas Glucanasas Proteasas
	Metabolitos bacterianos	Amonio Dióxido de carbono Hidrógeno de cianuro Bacteriocinas
	Interferencia química/física	Bloqueo de esporas del suelo Término de las señales de germinación Confusión de la comunicación molecular
Antagonismo indirecto	Competencia	Consumo de exudados Recolección de sideróforos Ocupación física del nicho
	Inducción de resistencia por el hospedero	Contacto con células de pared de hongos Detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) Inducción mediada por fitohormonas

Otro compuesto antagonista importante, es el ácido cianhídrico (HCN), que tiene como mecanismo de acción el bloqueo de la vía de señalización de la citocromo oxidasa, por lo cual es altamente tóxico para los microorganismos aerobios a concentraciones picomolares. Algunas psuedomonas fluorescentes como la *P. fluorescens* CHA0, han demostrado inhibir el crecimiento del patógeno *Thielaviopsis basicola*, que causa la raíz negra en la planta de tabaco (Voisard *et al.*, 1989). Además, otros compuestos volátiles como el amonio (NH₄), liberados por *Enterobacter cloacae* producen una inhibición del desarrollo de *Pythium ultimum* y son comunes en microorganismos que tienen contacto con fitopatógenos (Gardener y Fravel, 2002).

Se ha descubierto que algunas bacterias son capaces de producir metabolitos de carácter peptídico denominados bacteriocinas, que ejercen actividad inhibitoria en un amplio espectro de microorganismos. Existen bacteriocinas con diferentes pesos moleculares, unas con pesos altos como la Caseicina 80 proveniente de *Lactobacillus casei* B80 de un peso de 42 kDa, otras de un peso mucho menor como la Pediocina PA-1 proveniente de la cepa *Pediococcus acidilactici* de 4.6 kDa y unas más pequeñas como la nisina de 3.3 kDa, proveniente de *Lactococcus lactis* (Henderson *et al.*, 1992; Müller y Radler, 1993; Field *et al.*, 2012). Estos compuestos han adquirido un interés importante en los últimos años, puesto que pueden fungir como conservadores de alimentos, así como un sustituto de los antibióticos ya que son inhibidores de desarrollo microbiano naturales y por lo tanto no generan una alta resistencia bacteriana. Sin embargo es escasa la información disponible de la caracterización y mecanismos de acción de bacterias que no pertenecen a la clasificación de bacterias ácido lácticas. (Urbizu *et al.*, 2013).

II.4 Bacteriocinas y actividad bacteriocinogénica

Las bacteriocinas son péptidos bioactivos o proteínas que son segregadas por algunas bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos que pudieran realizar competencia (Mezaini *et al.*, 2008). Se ha investigado el antagonismo derivado de estos compuestos proteicos desde hace varias décadas, resultando hoy en día en un área fuerte de investigación por las diversas propiedades que presentan. Los péptidos antimicrobianos o bacteriocinas se pueden definir como “un grupo heterogéneo de péptidos sintetizados ribosomales con o sin modificaciones post-traduccionales, los cuales son secretados extracelularmente y tienen un mecanismo de acción bactericida contra algunas cepas” (Urbizu *et al.*, 2013). Este mecanismo de acción se basa en interacciones electrostáticas, donde existe una unión inicial del péptido con cargas positivas con los lípidos de la membrana bacteriana cargados negativamente, donde posteriormente se produce una inserción de las bacteriocinas en la bicapa lipídica. El mecanismo descrito para la bacteriocina pediocina, es por medio del contacto de su α -hélice transmembranal del extremo C-terminal, mientras que en otro compuesto denominado nisina realiza la inserción del extremo N-terminal, lo que provoca la formación de poros en la membrana de la bacteria y por consecuencia comienza a perder metabolitos y iones esenciales para su reproducción y supervivencia causando así la muerte bacteriana (Ruiz-Larrea *et al.*, 2007).

Las bacteriocinas son distintas a los péptidos antimicrobianos que producen los organismos eucariotas, ya que los péptidos producidos por los eucariotas, pueden ser bastante tóxicos para otros organismos. También se diferencian de otros compuestos producidos por antagonistas como los antibióticos en a) estructura molecular, b) naturaleza química, c) modo y rango de acción y d) ausencia de toxicidad y mecanismos de resistencia inducidos

(Cleveland *et al.*, 2001). La actividad que realizan es específica y dirigida a ciertos tipos de cepas o especies y algunas de ellas han sido aprobadas como seguras para el consumo humano por la Food and Drug Administration (Gillor *et al.*, 2008). Básicamente existe una clasificación de dos grandes grupos de bacteriocinas, las producidas por Gram positivos y las de Gram negativos (Drider *et al.*, 2006). Las diferencias entre ellas está en que las producidas por Gram positivos no son necesariamente letales para la células que las produce, esto derivado de que el mecanismo de transporte de los Gram positivos efectúa la liberación de la biotoxina. La otra diferencia radica en que los Gram positivos, tienen regulación bacteriocina-específica, mientras que los Gram negativos se basan únicamente en las vías de regulación del hospedero (Nes *et al.*, 1996).

En acuerdo, algunos autores realizaron una clasificación de bacteriocinas según características estructurales y biológicas de las biotoxinas liberadas por bacterias ácido lácticas, donde han sido ampliamente estudiadas (Cuadro 3). Teniendo así tres grupos reconocidos oficialmente y un cuarto grupo no reconocido (Cotter *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2004). Las de clase I son denominadas lantibióticos ya que son modificados post-traduccionalmente y su composición química se basa en aminoácidos como la lantionina y β -metil lantionina, además de aminoácidos deshidratados. Las bacteriocinas de clase II son de tamaño pequeño con alrededor de 30 a 60 aminoácidos, son estables al calor y no contienen lantionina en el péptido. Al contrario de estas, las bacteriocinas de clase III son proteínas grandes y son sensibles al calor. El grupo no oficial sería las de clase IV, son de carácter no proteico y suelen incorporar grupos como carbohidratos o lípidos en la molécula para poder ser activa. Sin embargo se conoce poco sobre la estructura y función de los pertenecientes a esta clasificación, algunos ejemplos de estas bacteriocinas son la leuconocina S y lactocina 27 (Bruno y Montville, 1993; Upreti y Hinsdill, 1975).

Cuadro 3. Clasificación de bacteriocinas en base a características estructurales y biológicas de los compuestos liberados por bacterias ácido lácticas (Cotter *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2004).

Clase	Subclase	Ejemplos
Clase I Antibióticos <5 KDa	Ia: catiónica Péptidos lineares Ib: Péptidos globulares sin carga, o carga neta negativa	Nisina Epidermina Lacticina 3147 Mersacidina
Clase II Bacteriocinas Estables al calor Sin modificar <10 KDa	IIa: Similares a la pediocina, bacteriocinas anti-listeria IIb: Bacteriocinas heterodiméricas IIc: Bacteriocinas sec-dependientes IId: Bacteriocinas sin péptido líder IIe: Bacteriocinas cíclicas IIf: Bacteriocinas no agrupadas	Pediocina PA-1 Enterocina A Lactacina F Lactococcina G Bacteriocina 31 Enterocina P EJ97 Enterocina L50 AS-48 Circularina A Gassericina A Lactococcina A Enterocina B
Clase III Grandes proteínas lábiles al calor (Bacteriolisinas) >30 KDa		Helveticina J Enterolisina A

II.5 Otros compuestos producidos por bacterias que aportan actividad antagonista.

Diversas especies del genero *Lactobacillus* y otros géneros bacterianos pertenecientes a las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen la capacidad de producir metabolitos antimicrobianos tales como ácidos orgánicos, CO₂, acetaldehído, diacetilo, peróxido de hidrógeno y otras moléculas de bajo peso molecular como la reuterina y bacteriocinas (Cintas *et al.*, 2000; Piard y Desmazeaud, 1991a; Piard y Desmazeaud, 1991b).

Existe también la producción de ácidos orgánicos, principalmente el ácido láctico, que constituyen el principal producto del catabolismo de los carbohidratos (González de Llano *et al.*, 1996). Esto causa un descenso brusco de pH, lo cual crea un ambiente inadecuado para el desarrollo de microorganismos, entre ellos patógenos. Los efectos perjudiciales de estas moléculas en los microorganismos sensibles se resumen en alteración de la permeabilidad celular, alteración del potencial de membrana y subsiguiente alteración de la fuerza protón motriz, así como, descenso del pH intracelular que ocasiona la alteración de funciones celulares importantes (Cintas *et al.*, 2000). Se considera que los principales metabolitos producidos por las BAL con efecto antagónico contra *Listeria monocytogenes* son el ácido láctico y las bacteriocinas, de hecho se han estudiado cepas de *L. plantarum* que producen inhibición del patógeno por acidez y son candidatas apropiadas para utilizarlas como bioconservantes de vegetales (Wilson *et al.*, 2005).

Existen compuestos producidos por bacterias ácido lácticas, de bajo peso molecular (menores a 1 kDa) como ácido acético, benzoico, fenil láctico, ácido hidroxi-fenil láctico y caproico, también metilidantoína, mevanololactona y ciclo-glicil- leucina, los cuales tienen actividad anti-fúngica. Por otra parte las BAL segregan otros compuestos mayores a 1 kDa, denominados compuestos

“bacteriocin-like”. Los cuales difieren en que estos tienen distinto rango de acción, pues son activas frente a hongos y levaduras (Okkers *et al.*, 1999; Magnusson y Schnürer, 2001).

II.6 Aplicaciones de bacteriocinas en alimentos

Las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas han sido las más caracterizadas y empleadas en el sector alimentario, se han utilizado a través de la historia en el proceso de fermentación, por lo que la FDA las considera de ingesta segura. La nisina fue la primera en ser aprobada por la FDA (1988) en los Estados Unidos, y se empleó en Inglaterra, para el control de un brote de esporas de *Clostridium botulinum* en queso (Chung *et al.*, 1989). Posteriormente los estudios de bacteriocinas se enfocaron en *Listeria monocytogenes* por su capacidad de desarrollo a temperaturas de refrigeración (4 °C) a las que se preservan los alimentos. A partir de este hecho, se han caracterizado numerosas bacteriocinas Clase II con fuerte actividad frente a *Listeria* y se han empleado en alimentos como carne cruda, leche y harina de soja (Riley y Wertz, 2002). Otra biotoxina es la pediodicina y esta ha sido empleada en embutidos, donde se observó una reducción del conteo bacteriano de hasta 10,000 veces comparado con los embutidos sin la bacteriocina (Raloff, 1998).

Una bacteriocina que también tiene propiedades para ser aplicada en la industria alimentaria es la piscicolina, presente en productos cárnicos y en el lavado de ensaladas verdes. El AP-CECT7121 es un péptido antimicrobiano que posee estabilidad a diferentes temperaturas y rangos de pH. Se probó su función en embutidos secos para evaluar su actividad como conservador alimenticio, mostrando buenos resultados frente a patógenos, esto sin afectar la

cantidad de lactobacilos presente (Raloff, 1998). Se ha encontrado la producción de estos compuestos por diversos psicrótrofos, pues estos poseen un amplio espectro de temperaturas a las que se pueden desarrollar óptimamente (Ercolini *et al.*, 2001).

II.7 Estudios de antagonismo en psicrótrofos

Los psicrótrofos pueden desarrollarse plenamente a temperaturas de refrigeración (4 - 7 °C) y permanecer hasta las temperaturas a las que el consumidor ingiere el alimento (35°C aprox.), causando diversas infecciones (Ercolini *et al.*, 2001). Sin embargo también pueden actuar como agente de control biológico ayudando a eliminar bacterias patógenas. El control biológico de microorganismos, surgió como una forma natural de mantener la inocuidad de los alimentos y es una tecnología que a pesar de su antigüedad ha ido evolucionando y está a la vanguardia en investigación. Con lo que respecta a los ensayos antagonistas, las bacterias más comunes que se aplican en la industria alimentaria son del género *Bacillus*. Se probó *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* como agentes de control biológico en cultivo frente a *Salmonella* Seftenberg W775 en un cultivo mixto de las cepas (ACB-patógeno). Se observó la inactivación total del crecimiento del patógeno a las 24 horas y también son activos contra bacterias Gram positivos como para Gram negativos (Szala *et al.*, 2012).

En otro estudio reciente se observó la actividad antagonista de veinte bacterias ácido lácticas, aisladas de queso (consumo cotidiano), donde se observó que seis de estas fueron activas contra bacterias Gram positivas (Gaamouche, 2014). También se observó que la especie *S. thermophilus* produce una

bacteriocina que resiste un amplio rango de pH (4-8), por lo que se podría emplear este compuesto purificado como un control biológico de especies patógenas, ya que la bacteriocina permanecería estable y funcional a diferentes condiciones en los alimentos (Mezaini *et al.*, 2009).

Se han buscado también bacterias que se encuentren en ambientes donde existe descomposición de materia orgánica y donde existan compuestos que por su naturaleza química dañen a la flora y fauna que habita. Por ejemplo en las aguas residuales donde confluyen fluidos provenientes de distintos lugares, pueden contener compuestos como metales pesados entre otros, que necesitan ser procesados o removidos, y existen bacterias de algunos géneros como *Campylobacter* y *Pseudomonas* (Schaeffer *et al.*, 1979; Miller, 1995) que tienen la capacidad de adquirir micronutrientes de esos ambientes y de transformar los compuestos que no pueden ser utilizados, en compuestos más sencillos y aprovechables.

Uno de los géneros más recientes de bacterias con potencial de utilización, es el de *Chloroflexi sp.*, bacterias filamentosas que se han encontrado en el lodo de los tratamientos biológicos contra aguas negras y se han visto implicadas en la remoción biológica de nutrientes y el tratamiento y purificación de las mismas. Sin embargo el mecanismo de acción mediante el cual realiza estas funciones aún se encuentra en investigación (Bjornsson *et al.*, 2002).

Recientemente Andrade (2014) identificó por amplificación y secuenciación del gen 16S ribosomal, a los psicrótrofos *Pseudomonas putida* y *Chloroflexi spp.*, aisladas de cilantro fresco, que mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento de *S. Saintpaul* y *E. coli* O157:H7, por medio de ensayos de antagonismo con presencia celular de la bacteria. Sin embargo, se desconoce la capacidad de los microorganismos psicrótrofos que crecen a 7 °C, para generar biotoxinas con actividad bacteriocinógena sin presencia directa de la célula.

III. HIPÓTESIS

El antagonismo mostrado frente a *Salmonella* Saintpaul y *E. coli* O157:H7 por aislados de bacterias psicrótrofas de cilantro fresco es mediado por péptidos con actividad bacteriocinogénica.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad bacteriocinogénica y la identificación molecular de psicrótrofos aislados de cilantro frente a *Salmonella* Saintpaul y *E. coli* O157:H7.

IV. 1 Objetivos Específicos

- Determinar la actividad bacteriocinogénica en placa, de aislados de bacterias psicrótrofas, frente a *Salmonella* Saintpaul y *E. coli* O157:H7.
- Evaluar la actividad bacteriocinogénica Vs. *Salmonella* Saintpaul en espinaca comercial.
- Realizar la identificación molecular mediante el análisis por PCR punto final y secuenciación del gen 16S ribosomal, de los aislados de psicrótrofos con actividad bacteriocinogénica.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Se partió de cuarenta y cinco aislados de psicrótrofos obtenidos de cilantro, que en estudios anteriores se determinó su actividad antagonista (célula-célula) vs *Salmonella* Saintpaul y O157:H7 (Andrade, 2014). Como cepas antagonistas control se utilizaron *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus amilovorius* y *Pediococcus acidilactici* (BAL). Los patógenos utilizados fueron cepas de *Salmonella* Saintpaul y *E. coli* O157:H7.

V.1 Reactivación de las cepas

Se descongelaron cuarenta y cinco aislados de psicrótrofos obtenidos de cilantro conservadas en glicerol a -80 °C y se sembraron en caldo tripticasa soya (TSB) y *Pediococcus acidilactici* en caldo MRS y se incubaron durante 24 h para su óptimo desarrollo.

V.2 Ensayo de antagonismo célula Vs. célula

Primeramente se realizó un ensayo de antagonismo célula Vs. célula de los 45 aislados de psicrótrofos frente a *Salmonella* Saintpaul y *E. coli* O157:H7 y se escogieron los diez aislados con mayor halo de inhibición (>0.7 mm) para la obtención de bacteriocinas, así como los que presentaron inhibición después de tres ensayos.

V.3 Obtención de bacteriocinas

Se sembró *Pediococcus acidilactici* en caldo MRS y los aislados de psicrótrofos en caldo TSB (tubos de 10 mL) enriquecidos con una mezcla de oligosacáridos de ácido poligacturónico (PGA) 0.1% p/v como fuente de carbono, con un grado de polimerización de 3-20, previamente obtenidos según la técnica de Ochoa-Villareal *et al.*, (2011), se incubaron a 37 °C por 72 h. Para la obtención del sobrenadante libre de células, el caldo TSB se centrifugó a 5,000 rpm por 30 min. Ocho mL del sobrenadante con las bacteriocinas se ultrafiltraron con una membrana de corte de 500 Da en un ultrafiltrador marca Amicon® (Millipore).

V.4 Ensayo de actividad bacteriocinogénica

El sobrenadante con las bacteriocinas se colocó en pocillos de 60 µL en placas de MRS frente a los patógenos con 24 h de incubación, estandarizados con MacFarland al 0.5 (inóculo de 1.5×10^8 bacterias). Las placas se colocaron a 4°C durante 18 horas y posteriormente, se colocaron en incubación a 37°C por 48 h. Se tomaron lecturas de los halos cada 24 h, siguiendo la técnica modificada de Jaramillo-Giraldo *et al.*, 2010.

V. 5 Tinción Gram y prueba de catalasa

Posteriormente, se realizó tinción Gram para la identificación morfológica de los aislados antagonistas seleccionados y la prueba de catalasa, que consistió en colocar una gota de H₂O₂ al 3% sobre un portaobjetos y luego se transfirió una porción de colonia sobre el H₂O₂ realizándose una emulsión. La prueba se reportó positiva al observarse la producción de burbujas en la emulsión (Seija, 2002).

V.6 Inhibición por compuestos de naturaleza no proteica

Para determinar la naturaleza de los compuestos que causan el efecto antagonista en los sobrenadantes ultrafiltrados, se realizaron tres ensayos dirigidos, para la detección de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y proteínas/péptidos. Puesto que estos compuestos pueden estar presentes y causar un efecto de inhibición.

a) Inhibición por ácidos orgánicos. Una alícuota de 50 μL de cada sobrenadante libre de células se neutralizó a pH 7.0 utilizando NaOH 1N y se ensayó la actividad antagónica residual (Ahn y Stiles, 1990).

b) Inhibición por peróxido de hidrógeno. A los sobrenadantes que mostraron actividad después de ser neutralizados se les ajustó el pH a 7.0 y posteriormente fueron tratados con 32 $\mu\text{g/mL}$ de peroxidasa (Sigma®), se incubaron por 2 horas a 37°C para eliminar el peróxido de hidrógeno, posteriormente se sometieron a 65°C por 30 minutos para eliminar la actividad de la enzima; por último se evaluó la actividad antagónica del sobrenadante (Oh *et al.*, 2000).

c) Inhibición por compuesto de naturaleza proteica. Se tomaron dos alícuotas de los sobrenadantes que mostraron actividad antagónica luego de ser neutralizados (pH 7); a una alícuota, se le ajustó el pH a 7.0 y se trató con 2 mg/ml de tripsina (Merck®) (disuelta en buffer fosfato de sodio 0.01 M a pH 7.2), se incubó por 2 horas a 37°C y se llevó a 65 °C por 30 minutos. La otra alícuota de sobrenadante, se sometió a 120°C por 20 minutos (Oh *et al.*, 2000).

Al realizar el ajuste de pH de los sobrenadantes, la inactivación de la peroxidasa y someter a temperatura de 120°C, siguió existiendo actividad antagónica residual. Por lo que los componentes causantes de la inhibición son posiblemente de naturaleza proteica o peptídica.

V.7 Cuantificación de proteína

La concentración de proteína presente en los sobrenadantes de los cultivos ultrafiltrados de los aislados de psicrótrofos y de *Pediococcus acidilactici* se determinó por el método del ácido bicinconínico con el BCA "Protein Assay Kit" (Pierce). Primeramente se realizó una curva de calibración con un estándar de seroalbúmina bovina (2.0 mg/mL). Las mediciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro BioSpec-1601 DNA/PROTEIN/ENZYME Analyzer Shimadzu® a 562 nm.

V.8 Electroforesis para péptidos

Los sobrenadantes ultrafiltrados se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida del 10-20 % Mini-PROTEAN® Tris-Tricina. Se cargaron 25 µg de proteína total en cada pozo y 25 ng del estándar puro de nisina, el gel se corrió a 15 mA constantes por 150 min en una cámara Mini PROTEAN Tetra System de Bio-Rad®. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron el Broad Range SDS-PAGE y Polypeptide SDS-PAGE de Bio-Rad®. Los tamaños de las bandas pertenecientes a los péptidos se analizaron con el software Image Lab de Bio-Rad®.

V.9 Ensayo *in vivo*

En primer lugar se realizó la preparación de las soluciones para la aspersión de patógeno y colocación del extracto, donde se estableció la concentración adecuada tomando una solución de 500 mL de *Salmonella* Saintpaul teniendo en ella 30 mL de patógeno estandarizado MacFarland (0.2) (inóculo de 0.6×10^8 bacterias), más 470 mL de PBS. Para cada extracto se realizó una preparación de 1 mL de una fracción con proteínas obtenida por ultrafiltración <30 KDa, más 1 mL de la fracción >30 KDa, más 8 mL de PBS (10 mL totales) y para el control de nisina 0.6 g en 10 mL de PBS.

Se tomaron 10 g de hojas de espinaca comercial (8 hojas aprox.) y se colocaron en cajas de aluminio estériles, donde se llevó a cabo la inoculación de *Salmonella* Saintpaul por el método de aspersión de 500 mL del patógeno en solución estandarizada a 0.2 MacFarland en ambiente estéril en campana de flujo laminar. Posteriormente se colocó por descarga con micropipeta 3 mL del extracto clarificado libre de células de las cepas psicrótrofas con actividad bacteriocinogénica. Esto se realizó 24 h posteriores a la aplicación del patógeno, para permitir el establecimiento del patógeno. Setenta y dos horas después de la aplicación del extracto, se llevó a cabo un conteo de colonias, por la técnica del número más probable para determinar la concentración de células vivas del patógeno establecidas en el modelo de estudio. El experimento se llevó a cabo colocando 10 g de hoja de espinaca en 90 mL de agua peptonada para homogenizar en un Stomacher® 400 Circulator a 230 rpm durante 1 min, posteriormente, se realizaron 5 diluciones seriadas de 1 mL del extracto de espinaca en tubos con 10 mL del solución salina al 0.85%, por último, tomando 100 μ L de cada dilución para sembrarlo en agar XLD, utilizando el método de difusión en placa. Posteriormente se realizó el conteo de UFC/g después de 24 h, 48 h y 72 h de incubación para el patógeno y 72 h de incubación para los tratamientos (modificado de Andrade, 2014). Los resultados se expresaron

como log 10 UFC/g y el número obtenido por cada aislado se comparó con lo observado por el control de nisina. Se adquirió Nisaplin® por medio de la casa comercial DANISCO.

V.10 Identificación molecular de colonias con actividad bacteriocinogénica (BCCG)

El ADN genómico de las cepas que presentaron actividad bacteriocinogénica, se obtuvo utilizando el kit QIA amp DNA mini y después se purificó mediante el kit QIAEX II de Qiagen. Posteriormente se realizó PCR punto final donde se amplificó el gen 16S ribosomal con oligonucleótidos específicos, sentido: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 519F (5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3') y antisentido 1301R (5'-TACTAGCGATTCCGACTTC-3'). Los productos de amplificación se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. (Seoul, Korea).

V.11 Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA de una vía donde se comparó el halo de inhibición producido por los aislados antagonistas frente a *Salmonella* Saintpaul y *E. coli* O157:H7 posteriormente una comparación de medias por el método de Tukey.

Para el análisis *in vivo* se hizo una determinación de la reducción de log 10 de UFC/g del control de crecimiento a 72 h de *Salmonella* Saintpaul, junto con el

efecto de los tratamientos de nisina y los extractos clarificados de los aislados 1, 2, 4, 5, y 6 por medio de un ANOVA de una vía, por último se realizó una comparación de medias por el método de Tukey-Kramer con una $P < 0.05$, con tres repeticiones en cada medición.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Evaluación de la actividad antagónica y bacteriocinogénica

El antagonismo en placa de bacterias ácido lácticas (BAL) control, se evaluó frente a los patógenos *Salmonella* Saintpaul y *E. coli* O157:H7 (Figura 1), utilizando como cepas control a *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus amilovor*us y *Pediococcus acidilacticci* que presentaron halos de inhibición de 0.7 a 1.6 cm, mostrados en el Cuadro 4, valores del tamaño de los halos similar a lo reportado por Andrade (2014). Esto coincide también con algunos trabajos recientes de Vélez *et al.* (2015), quienes obtuvieron 70 aislados de BAL de calostro de la leche materna de cerdas y obtuvieron halos de inhibición superiores a 7 mm en ensayos de antagonismo frente a *Salmonella* Tiphymurium.



Figura 1. Antagonismo en placa de los controles de BAL frente a *Salmonella* Saintpaul y *E. coli* O157:H7. A) Vs. *S. Saintpaul*, B) Vs. *E. coli* O157:H7. Presencia celular de (1) *Lactobacillus animalis*, (2) *Lactobacillus amilovorius* y (3) *Pediococcus acidilactici*.

Cuadro 4. Actividad antagonista célula-célula de las BAL Vs. *S. Saintpaul* y *E. coli* O157:H7.

Cepa control	<i>Salmonella</i> Saintpaul (cm)	<i>E. coli</i> O157:H7 (cm)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.2
<i>Lactobacillus amilovorius</i>	1.1 ± 0.1	0.7 ± 0.1
<i>Lactobacillus animalis</i>	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.2

Posterior a la reactivación de los cuarenta y cinco aislados de psicrótrofos, se realizaron tres ensayos de antagonismo con la presencia celular de la bacteria frente a los patógenos. De estos ensayos se seleccionaron diez aislados que presentaron actividad antagónica frente a ambos patógenos y un halo superior a los 0.7 mm, cumpliendo estos requisitos los aislados mostrados en el Cuadro

5. Es importante señalar que esta selección se realizó en base a aislados que mantuvieron su actividad en los tres ensayos de actividad antagonista realizados.

Cuadro 5. Actividad antagonista célula-célula de los aislados de psicrótrofos Vs. *Salmonella* Saintpaul y *E. coli* O157:H7.

Aislados (psicrótrofos)	<i>Salmonella</i> Saintpaul (cm)	<i>E. coli</i> O157:H7 (cm)
1	2.1±0.3	1.1±0.2
2	2.7±0.2	2.2±0.1
3	1.7±0.01	1.2±0.02
4	1.6±0.1	1.5±0.05
5	1.2±0.1	1.1±0.1
6	0.9±0.04	1.1±0.2
7	0.7±0.5	0.8±0.2
8	1.0±0.6	1.3±0.01
9	1.2±0.3	1.3±0.04
10	1.5±0.04	1.3±0.2

Para la realización del ensayo de actividad bacteriocinogénica en medio de cultivo libre de células. Se evaluó la capacidad inhibitoria de los controles positivos de BAL (Cuadro 6), donde el sobrenadante del caldo de cultivo libre de células de *Pediococcus acidilactici* fue la cepa con mayor halo de inhibición ($P < 0.05$) frente a *Salmonella* Saintpaul, mientras que no se observaron diferencias estadísticas en los controles de BAL frente a *E. coli* O157:H7 ($P < 0.05$), por lo que se eligió como control positivo a *Pediococcus acidilactici* para el ensayo de actividad bacteriocinogénica de los aislados seleccionados. Esta cepa es productora de la bacteriocina Pediocina PA-1 (Martin *et al.*, 2004; Cotter *et al.*, 2005).

Cuadro 6. Actividad bacteriocinogénica libre de células de BAL Vs. *S. Saintpaul* y *E. coli* O157:H7.

No. de cepa	Halo de inhibición vs <i>Salmonella</i> Saintpaul (cm)	Halo de inhibición vs <i>E. coli</i> O157:H7 (cm)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	2.30 ± 0.10 ^a	1.30 ± 0.10 ^a
<i>Lactobacillus animalis</i>	1.30 ± 0.10 ^b	1.16 ± 0.28 ^a
<i>Lactobacillus amilovorvus</i>	1.43 ± 0.11 ^b	1.4 ± 0.17 ^a

Letras diferentes en los valores medios representan diferencias significativa (P> 0.05) en cada columna.

En los resultados del ensayo de actividad inhibitoria de los aislados seleccionados frente a *Salmonella* Saintpaul y *E. coli* O157:H7, con medio de cultivo libre de células, se confirmó la actividad inhibitoria de diez de ellos (Cuadro 7), sin presentar diferencias significativas en su capacidad inhibitoria frente a los patógenos. Esto es similar a lo reportado por algunos autores donde se evaluó el sobrenadante libre de células de BAL y se observó inhibición de *Salmonella enterica* y *E. coli* O157:H7 (Cálix-Lara *et al.*, 2014).

En la Figura 2 se presenta un ejemplo de los halos de inhibición del antagonismo en placa del extracto en medio libre de células de psicrótrofos y *Pediococcus acidilactici* como control positivo, frente a *Salmonella* Saintpaul y *E. coli* O157:H7.

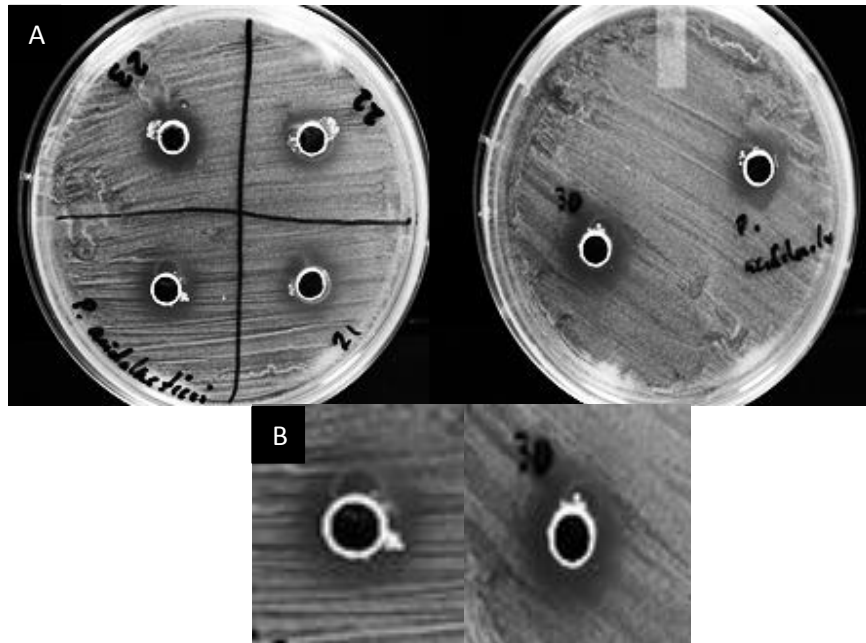


Figura 2. Antagonismo en placa del extracto proveniente del medio libre de células de psicrótrofos y *Pediococcus acidilactici* (control +). A) Ensayo de antagonismo frente a *Salmonella* Saintpaul y *E. coli* O157:H7 respectivamente. B) Acercamiento del halo de inhibición de la cepa 23 y 30.

Los sobrenadantes de cuatro de los diez aislados seleccionados, no presentaron actividad antagonista frente a los dos patógenos, por lo que se descartaron del estudio. De los aislados que mantuvieron su actividad inhibitoria en el caldo libre de células, el No. uno presentó un halo significativamente mayor ($P > 0,05$) al presentado por el control positivo. Los aislados dos, tres, cuatro y seis presentaron igualdad estadística con *Pediococcus acidilactici*, mientras que el aislado cinco resultó con menor actividad que el control (cuadro 7).

Los aislados que mostraron también un efecto inhibitorio frente a *E. coli* O157:H7, al mismo nivel que *Pediococcus acidilactici* ($P > 0.05$) con halos de inhibición de 1.0 a 1.36 cm. Estos halos de inhibición son comparables por lo reportado por Gaamouche *et al.*, en 2014. Donde 8 cepas de BAL de 65 estudiadas presentaron inhibición por actividad bacteriocinogénica frente a *E. coli* O157:H7 y mostraron halos de inhibición de 1.05 ± 0.7 a 1.35 ± 1.4 cm,

similares a lo obtenido por la actividad bacteriocinogénica de los seis aislados de psicrótrofos analizadas en este estudio.

Cuadro 7. Actividad bacteriocinogénica de aislados de psicrótrofos obtenidos de cilantro Vs. *S. Saintpaul* y *E. coli* O157:H7.

Aislados (psicrótrofos)	<i>Salmonella</i> Saintpaul (cm)	<i>E. coli</i> O157:H7 (cm)	Concentración de proteína mg/mL
<i>Pediococcus acidilactici</i>	1.5 ± 0.05 ^b	1.4±0.1 ^a	4.89±011 ^d
1	1.76±0.15 ^a	1.16±0.15 ^a	3.92±0.10 ^{ab}
2	1.56±0.05 ^b	1.36±0.20 ^a	3.59±0.10 ^a
3	1.36±0.15 ^{bc}	1.0±0.26 ^a	4.27±0.20 ^b
4	1.40±0.10 ^b	1.16±0.02 ^a	3.83±0.12 ^a
5	1.13±0.11 ^c	1.26±0.05 ^a	3.09±0.12 ^c
6	1.40±0.20 ^b	1.13±0.20 ^a	4.12±0.13 ^b
7	0.90±0.10	0.0	Nd
8	0.0	0.0	Nd
9	0.0	0.0	Nd
10	0.40±0.06	0.0	Nd

Letras diferentes en los valores medios representan diferencias significativa (P> 0.05) en cada columna. Nd = No determinado.

Está reportado que un pH ≤4 en el medio de cultivo inhibe el desarrollo de *E. coli* O157:H7 (Mezaini *et al.*, 2009). Por lo que se midió el pH de las soluciones libres de células para descartar el efecto de inhibición por acidez. Se observó que todos los medios de cultivo libres de células presentaron pH 7.0, por lo que se descartó la inhibición por acidez del medio. Esto a su vez sugiere que podrían estar presentes otros metabolitos, como péptidos con características de bacteriocinas; activos frente a organismos Gram negativos, los cuales son de nicho ecológico distinto a las bacterias ácido lácticas pertenecientes a la familia de las Gram positivas (Dridner *et al.*, 2006). Es por esto que se realizó una cuantificación de proteínas en los extractos clarificados de los seis aislados con actividad bacteriocinogénica por el método del ácido bicinconínico y una curva

de calibración con el estándar de seroalbúmina bovina (BSA) obteniéndose una $R^2=0.986$. Se observa que la cantidad de proteína producida por el control positivo de *Pediococcus acidilactici* en el extracto libre de células, es significativamente mayor a la de los aislados de psicrótrofos mientras que la de menor producción fue la del aislado número cinco ($P<0.05$). Esto nos indica que a pesar de una mayor producción de proteína de la cepa de *Pediococcus acidilactici* (control positivo) en comparación con los aislados de psicrótrofos, estas pueden exhibir halos de inhibición similares, incluso mayores al control positivo, como en el caso de los aislados uno y dos para el patógeno *Salmonella* Saintpaul. Sin embargo es posible que en los extractos libres de células existan otros compuestos que no sean proteínas, que pudieran estar causando el antagonismo, por lo que se realizaron varios ensayos para determinar la naturaleza de la inhibición.

VI.2 Ensayos para detección de otros metabolitos antagonistas

Al descartar la presencia de ácidos orgánicos (medición de pH), se realizó el ensayo para encontrar peróxido de hidrógeno, sin embargo después de la inactivación de la peroxidasa se probó la actividad residual y se encontró que seguía existiendo actividad. Es por esto que se realizó un último ensayo buscando ya, compuestos de naturaleza proteica, teniendo dos alícuotas: una tratada con tripsina y otra con temperaturas de 95°C. Se observó que después de tratar los sobrenadantes clarificados con tripsina seguían produciendo el antagonismo, sin embargo al tratarlos con temperaturas elevadas, ya no mostraban actividad (Cuadro 8). Esto puede ser debido a que la tripsina pudo no haber tenido efecto proteolítico en los compuestos de carácter proteico,

mientras que la temperatura tuvo un posible efecto desnaturalizante en los sobrenadantes clarificados.

Cuadro 8. Detección de otros metabolitos con actividad antagonista. Detección de ácidos orgánicos, tratamientos con peroxidasa, tripsina y temperatura a 120°C.

Aislados (psicrótrofos)	Detección de ácidos orgánicos (pH<5)	Tratamiento con peroxidasa	Tratamiento con tripsina	Temperatura (120°C)
1	pH 7	1.74±0.11	1.75±0.14	Nd
2	pH 7	1.54±0.04	1.55±0.07	Nd
3	pH 7	1.37±0.11	1.36±0.13	Nd
4	pH 7	1.39±0.09	1.41±0.06	Nd
5	pH 7	1.13±0.12	1.12±0.11	Nd
6	pH 7	1.38±0.18	1.36±0.22	Nd

Nd=No determinado.

Está reportado que algunas bacteriocinas producidas por *Serratia marcescens* JF59-12, son totalmente inactivadas por tripsina (Foulds y Shemin, 1969). Sin embargo en otro estudio, se encontró que las bacteriocinas Enterocina-100 y Enterocina E1B provenientes de *Enterococcus faecium*, son resistentes a la hidrólisis por tripsina (Ha *et al.*, 1994).

También a estos seis aislados se les realizó tinción Gram y la prueba de catalasa. Se observó que los aislados de psicrótrofos seleccionados pertenecen a la clasificación de las Gram negativas y todos dieron positiva la prueba de catalasa (cuadro 9). Esto es característico de la familia *Enterobacteriaceae* a la cual pertenecen los géneros: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Shigella*, *Plesiomonas*, *Edwardsiella*, *Ewingella* (Medicine, 2010). Es por esto que los aislados antagonistas podrían pertenecer a uno de estos géneros.

Cuadro 9. Tinción Gram y prueba de catalasa.

No. aislado	Gram (+/-)	Catalasa
<i>Pediococcus acidilactici</i>	+	-
1	-	+
2	-	+
3	-	+
4	-	+
5	-	+
6	-	+

VI.3 Evaluación de péptidos presentes en medios de cultivo libres de células.

Para identificar la presencia de péptidos producidos por los aislados de psicrótrofos, se realizó electroforesis en geles Mini-PROTEAN® Tris-Tricina los cuales se tiñieron con azul de Coomassie, para determinar el patrón de migración de los péptidos en los sobrenadantes libres de células y los pesos de las bandas fueron estimados por medio del software Image Lab de Bio-Rad® (Figura 3). En ambos geles se aprecian bandas entre los 56.2 y 3.5 kDa. En el gel A en el carril uno, dos y cinco se aprecian claramente bandas con un tamaño aproximado de 45 kDa y en menor concentración en los carriles tres y seis, coincidiendo con lo obtenido por Guasch *et al.*, (1995) para la bacteriocina 28b derivada de la cepa *Serratia marcescens*. Esta bacteriocina es activa frente

a los patógenos *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp, sin embargo no existen reportes de actividad frente a *Salmonella* Saintpaul. También en los carriles uno, dos y cinco se observan algunas bandas con pesos superiores a 45.0 kDa, así como bandas cercanas a los 60 kDa, lo cual es similar con lo reportado por De Graaf *et al.*, (1968) donde purificaron una bacteriocina perteneciente a la cepa de *Enterobacter cloacae* con un peso de 61 kDa. El valor del péptido obtenido en este estudio, coincide con estos reportados, así como los resultados de la tinción Gram y la prueba de catalasa de los seis aislados de psicrótrofos, ya que el género *Enterobacter* sp. es Gram negativo y catalasa positivo, así como para el género *Serratia* sp. Por lo que el perfil electroforético de los sobrenadantes libres de células podría sugerir que los aislados de este estudio pertenecen a estos géneros.

Por otra parte en el carril número 4 se aprecia una banda definida con un tamaño menor a 4 kDa y no se observan otras bandas en el mismo carril. Esto sugiere que dicho péptido es responsable del efecto antagonista, lo cual por su tamaño y actividad coincide con lo obtenido por Chehimi *et al.*, 2007; Cotter *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2004, quienes reportaron péptidos con actividad inhibitoria producidos por cepas de *Enterobacter* las cuales pertenecen a la clasificación de bacteriocinas clase II: enterocinas (tamaños <10 kDa). La actividad de enterocinas frente a *E. coli* O157:H7 en nuestro trabajo, coincide con el trabajo de Ananou *et al.*, en el 2004, donde se redujo la carga de microorganismos de ese patógeno y otros Gram negativos por el efecto inhibitorio de la bacteriocina.

En el carril uno del segundo gel (B), se puede apreciar una banda en el peso correspondiente a nisina el cual corresponde a 3.35 kDa (CID=16219761 obtenido de NCBI), donde se colocaron 25 ng totales de esta bacteriocina. Sin embargo, se desconoce que bacteriocinas son las que están presentes en los sobrenadantes, por lo que es necesaria una caracterización por otras metodologías como HPLC acoplada a espectrometría de masas, que determinen la identidad de los mismos.

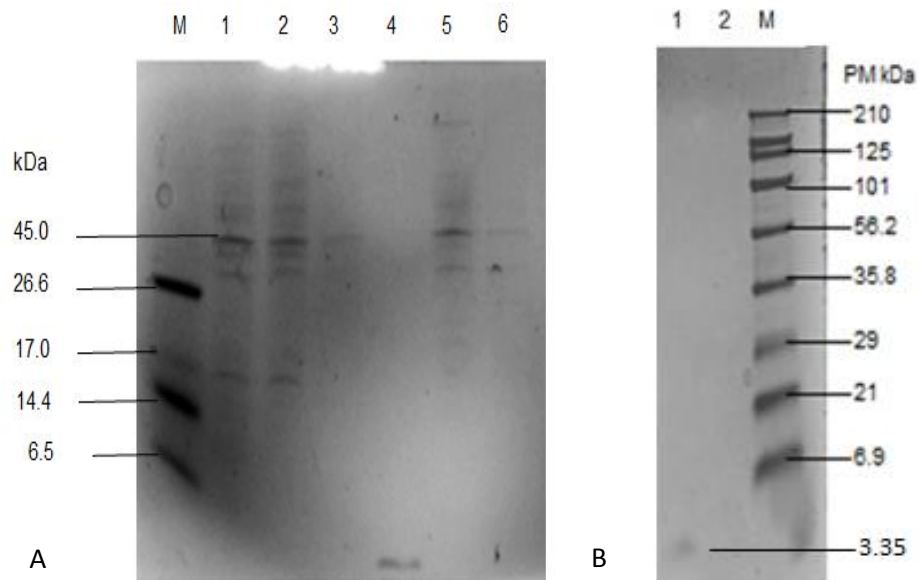


Figura 3. Perfil electroforético de los extractos libres de células en geles de poliacrilamida por SDS-PAGE. (A) Carril M: Marcador de peso molecular Polypeptide SDS-PAGE kDa. Carril 1 a 6: Cepas problema. (B) Carril 1: nisina (25 ng). Carril 2: nisina (2 ng). Carril M: Marcador de peso molecular SDS-PAGE Broad Range. En el gel A se aprecia una banda de 3.5 kDa en el carril 4 y en el gel B otra banda de 3.3 kDa en el carril 1.

VI.4 Ensayo de actividad bacteriocinogénica de aislados de psicrótrofos frente a *Salmonella* Saintpaul en espinaca.

Se realizaron ensayos de actividad bacteriocinogénica tomando como modelo espinaca comercial, para evaluar el efecto inhibitorio *in vivo* de los extractos libres de células. Este ensayo se realizó mediante un conteo de UFC/g a las 24, 48 y 72 h posteriores a la inoculación de *Salmonella* Saintpaul para observar el establecimiento del patógeno en la espinaca. Después de 48 h de aplicado el patógeno a las espinacas, se aplicaron tres mL del medio libre de células de cada aislado y tres mL de nisina como control positivo (+), a una concentración de 60 mg/mL (concentraciones observadas en cuadro 7).

Se observó que el establecimiento del patógeno a las 48 h posteriores a la inoculación, presentó un conteo de 10 Log UFC/g en las hojas de espinaca. Por su parte, la bacteriocina control nisina logró una reducción en la cuenta de UFC de *Salmonella*, de hasta 8 log, lo cual es superior a lo obtenido por Bari *et al.*, en 2005, donde la aplicación de lavados de nisina sola, redujo en 2.77 log. Se observó que el extracto de los diferentes aislados evaluados, lograron disminuir significativamente la carga del patógeno con respecto al control sin tratar ($P < 0.05$) (Figura 4). Este efecto es mayor al observado en un estudio, donde se probó la actividad de cepas productoras de bacteriocinas (nisina Z, plantaricina C, lacticina 481 y coagulina) en extracto de lechuga con la presencia de *L. monocytogenes*. La cual disminuyó de 1.2 a 1.6 log al patógeno (Allende *et al.*, 2007). En otro estudio reciente de antagonismo realizado por Cáliz- Lara *et al.* (2014), se inocularon 8.0 log de UFC/g de BAL en hojas de espinaca con *E. coli* O157:H7 y *Salmonella enterica*, observándose una reducción de hasta 1.9 log UFC/g ($P < 0.05$). Los extractos clarificados en nuestro estudio son procedentes de aislados de bacterias psicrótrofas Gram negativas y presentaron una

reducción bacteriana de los aislados dos y seis de 2.0 log, valor similar al estudio de Cáliz-Lara *et al.* (2014) y son inhibiciones menores en comparación a los otros aislados evaluados ($P < 0.05$).

El extracto libre de células de los aislados de psicrótrofos que presentó la mayor actividad inhibitoria de *Salmonella* Saintpaul fue el del aislado número cinco, con una reducción de alrededor de 5.8 log, 2.2 log menos que la reducción de la nisina. Es importante señalar que la concentración de proteína del control positivo fue de 60 mg/mL mientras que el del aislado cinco fue de 3.59 mg/ml. La reducción significativa de log de UFC de *Salmonella* en espinaca comercial comprueba que los extractos conservan la actividad bacteriocinogénica en un modelo *in vivo* y que posiblemente los compuestos proteicos presentes en dichos extractos sean responsables de la actividad.

El efecto inhibitorio *in vitro* más notable lo tuvo el aislado uno en contra de *Salmonella* Saintpaul, observándose mayor halo de inhibición con respecto al control positivo de *Pediococcus acidilactici*, mientras que no hubo diferencias entre los aislados ni el control positivo, para la inhibición *in vitro* de *E. coli* O157:H7 ($P > 0.05$). En el ensayo *in vivo* el aislado cinco fue el que mejor inhibió el desarrollo de *Salmonella* Saintpaul. El extracto libre de células de este aislado tiene potencia de utilización como alternativa tecnológica para reducción de *S. Saintpaul*.

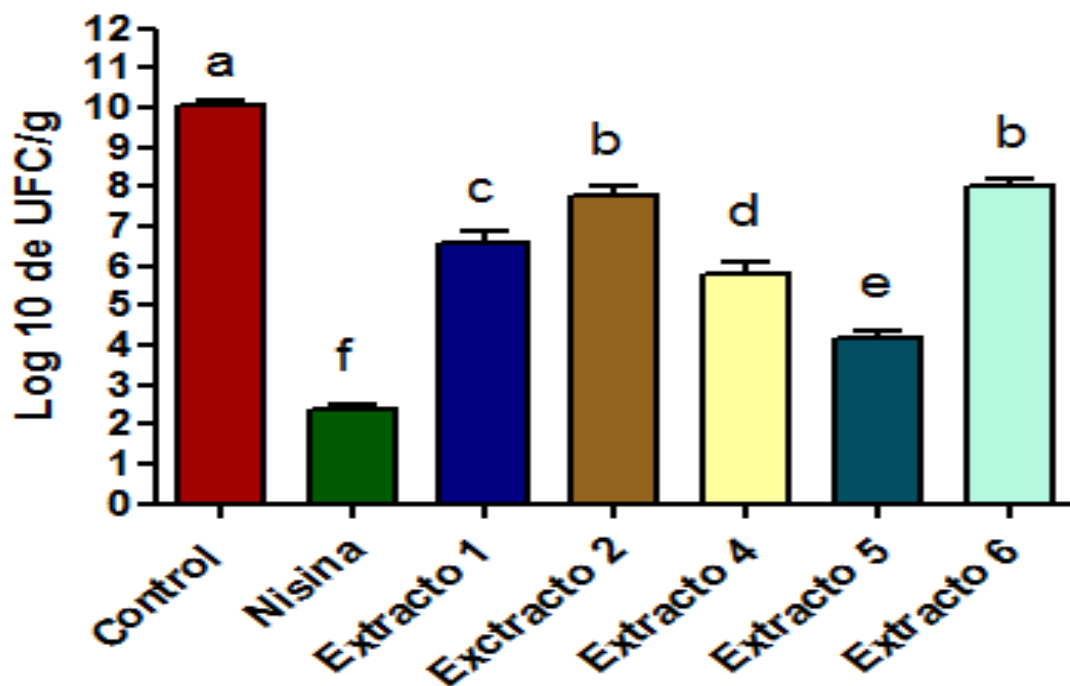


Figura 4. Conteo de *Salmonella* Saintpaul a 48 h de la aplicación de los extractos con actividad bacteriocinogénica. Se observa una reducción de Log de UFC/g en todos los tratamientos con respecto al control. Distintas letras significan diferencias significativas entre tratamientos y el control. $P < 0.05$.

VI.5 PCR punto final y secuenciación

La identidad de las seis cepas de psicrotrofos con actividad bacteriocinogénica se determinó por métodos moleculares. Para ello se realizaron reacciones de PCR punto final con tres pares de primers (27F-519R, 519F-1301R y 27F-1301 que amplificaran el gen 16S ribosomal y la estrategia seguida para la amplificación de este gen se observa en la Figura 7. Se obtuvieron dos productos de amplificación (Figura 5 y 6), los cuales se mandaron a secuenciar con el primer 27F y el 518F respectivamente a Macrogen Inc. Se obtuvieron dos secuencias que se ensamblaron mediante el programa BLAST® obteniéndose en conjunto productos de alrededor de 1270 pares de bases y se compararon con la base de datos de secuencias de cepas bacterianas de GenBank a nivel nucleotídico.

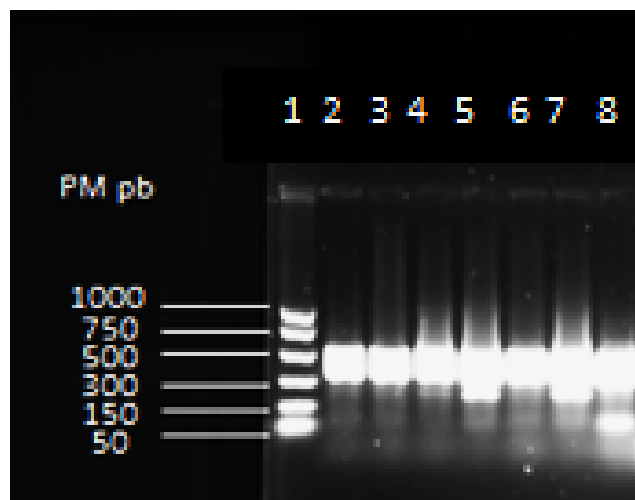


Figura 5. Productos de amplificación de los iniciadores: 27F-519R. Carril 1: Marcador de peso molecular 1000 pb, carril 2: control positivo, carriles 3-8: aislados de psicrotrofos. Se observan productos amplificación de alrededor de 450 pb.

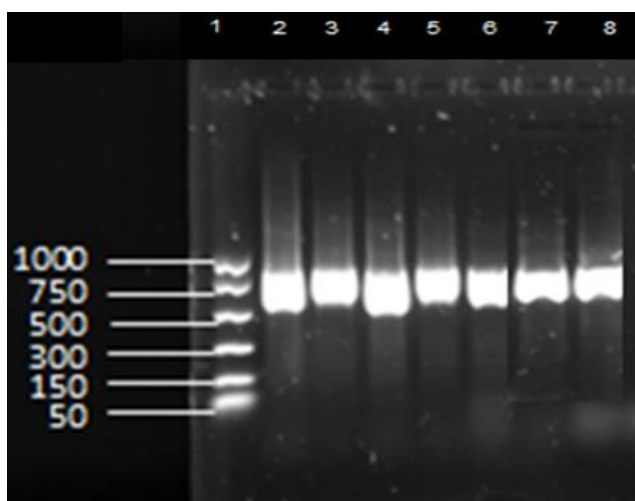


Figura 6. Productos de amplificación de los iniciadores: 519F-1301R. Carril 1: Marcador de peso molecular 1000 pb, carril 2: control positivo, carriles 3-8: aislados de psicrótrofos. Se observan productos amplificación de alrededor de 780 pb.

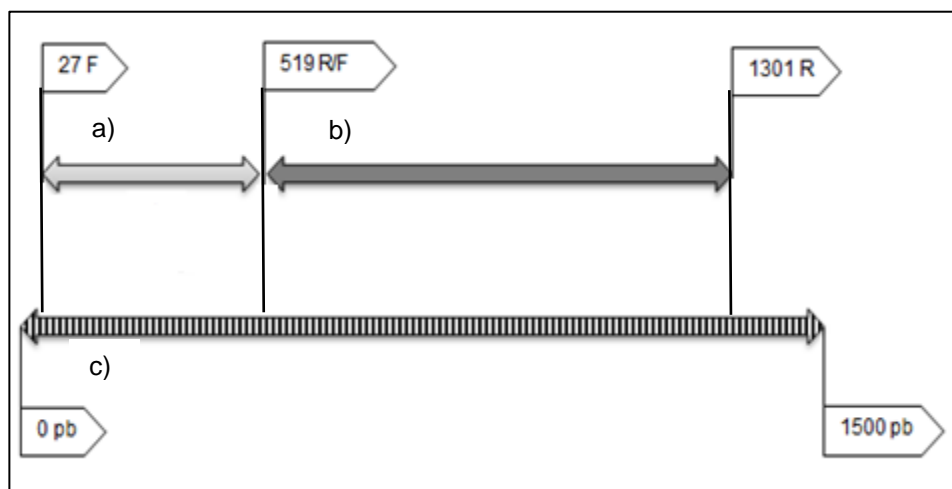


Figura 7. Diagrama de amplificación del gen 16S ribosomal. a) Iniciadores 27F-519R, b) iniciadores 519F-1301R y c) longitud del Gen 16S ribosomal de 1500 pb (Luostarinen, 2015).

El análisis de las secuencias en las bases de datos de genes (GenBank) indicó que las cepas pertenecían a los géneros, *Serratia* sp o *Enterobacter* sp. Los cuales están reportados como productores de bacteriocinas (Ananou *et al.*, 2004). Las cepas 1 y 2 fueron identificadas como *Serratia marcescens* con un 99-98% de identidad, así como la cepa 4 como *Enterobacter* sp. CIFRI D-TSB-86 con un 99% de identidad. Las cepas 3 y 6 también fueron identificadas como *Enterobacter* sp. con porcentajes de 97-99%. Solamente la cepa 5 tiene una identidad del 99% para candidatos de géneros diferentes *Serratia* sp y *Enterobacter* sp (Cuadro 10). Esto debido a que se realizó la identificación molecular en esta cepa en una región muy conservada para los dos géneros (Luostarinen, 2015).

El presente trabajo es una aportación que se suma a las nuevas tecnologías para la reducción de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos causadas por patógenos. Se espera que más estudios con resultados contundentes aplicados *in situ* en alimentos, puedan emplearse más pronto a nivel comercial, para beneficio de los consumidores.

Cuadro 10. Identificación molecular de los aislados con actividad bacteriocinogénica por comparación de las secuencias en el banco de genes (GenBank).

Número de aislado	Identificación	% de identidad	Número de acceso GenBank
1	<i>Serratia marcescens</i>	98	KJ127188.1
2	<i>Serratia marcescens</i> Cepa 2BGN4	99	HM161859.1
3	<i>Enterobacter hormaechei</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> Cepa p62 <i>Enterobacter cloacae</i>	97 97 97	JQ829397.1 JQ829356.1 CP010384.1
4	<i>Enterobacter</i> sp. Cepa CIFRI D-TSB-86	99	KP117096.1
5	<i>Serratia</i> sp. Cepa CH-B17 <i>Enterobacter cloacae</i> Cepa GG78	99 99	KP325089.1 KF096973.1
6	<i>Enterobacter</i> sp. Cepa CIFRI D-TSB-86 <i>Enterobacter asburiae</i> Cepa KNUC5007	99 99	KP117096.1 JQ682630.1

VII. CONCLUSIONES

Los extractos proteicos de las bacterias psicrótrofas aisladas de cilantro, pertenecen a los géneros *Serratia* sp. y *Enterobacter* sp y presentan actividad bacteriocinogénica *in vitro* frente a *Salmonella* Saintpaul y *E. coli* O157:H7 e *in vivo* frente a *S. Saintpaul* como contaminante de espinaca (*Spinacia oleracea*).

El efecto antagónico de tres de las seis cepas, es debido a la presencia de pequeños péptidos con actividad bacteriocinogénica.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahn C., Stiles A., 1990. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed meats. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 302-310.
- Allende A., Martinez B., Selma V., Gil M.I., Suarez J.E., Rodriguez A. 2007. Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce. *Food Microbiol.* 24: 759–766.
- American Society for Quality (ASQ). HACCP Auditor Certification – CHA [ASQ Store Web site]. Available at: www.asq.org/certification/haccp-auditor/. Accessed January 23, 2009.
- Ananou S., Valdivia E., Martínez-Bueno M., Gálvez A., Maqueda M. 2004. Effect of combined physico-chemical preservatives on enterocin AS-48 activity against the enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* CECT 976 strain. *J Appl Microbiol* 97: 48–56.
- Andrade Bustamante G. 2014. “Aislamiento e identificación de bacterias psicotrofas en cilantro (*Coriandrum sativum* L.) y su actividad antagonista Vs *Salmonella* Saintpaul y *E. coli* O157:H7”. Tesis de maestría inédita. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). Hermosillo, Sonora. México.
- Bari M.L., Nakauma M., Todoriki S. *et al.* 2005. Effectiveness of irradiation treatments in inactivating *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables at refrigeration temperature. *J Food Prot.* 68: 318-323
- Barreto A.G., Sedrés C.M., Rodríguez T.H., Guevara V.G. 2010. Agentes bacterianos asociados a brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) aislados de coprocultivos-Bacterial agents associated to foodborne outbreaks isolated from foods and faecal samples. *REDVET.* 11:1-16.
- Benhamou N. 2004. Potential of the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to protect citrus fruit against *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold: A comparison with the effect of chitosan. *Phytopathology* 94:693-705.

- Beuchat. L.R. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. FSU.
- Bjornsson L., Hugenholtz P., Tyson G.W., Blackall L. 2002. Filamentous *Chloroflexi* (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiol.* 148: 2309–2318.
- Brandl M.T. 2008. Plant lesions promote the rapid multiplication of *Escherichia coli* O157:H7 on postharvest lettuce. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 5285–5289.
- Brandl M.T., Amundson R. 2008. Leaf age as a risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2298–2306.
- Bruno M.E., Montville T.J. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic Acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 59: 3003-3010.
- Cálix-Lara T.F., Rajendran M., Smith S.B., Talcott S.T., Miller R.K., Castillo A., Sturino J.M., Taylor M.T. 2014. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on spinach and identification of antimicrobial substances produced by a commercial Lactic Acid Bacteria food safety intervention. *Food Microbiol* 38: 192-200.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) disponible en: <http://www.cdc.gov/>. Última vez accesado en Junio de 2013.
- Chehimi S., Delalande F., Sablé S., Hajlaoui M.R., Van Dorsselaer A., Limam F., Pons A.M. 2007. Purification and partial amino acid sequence of thuricin S, a new anti-*Listeria* bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.* 53(2):284-290.
- Chung K.T., Dickson J.S., Crouse J.D. 1989. Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. *Appl Environ Microbiol* 55: 1329-1333.
- Cintas L., Casaus P., Hernández E. (2000). Actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas (II). *Alimentación, Equipos y Tecnología*. Septiembre (7): 109-119
- Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F., Chikindas M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* 71: 1-20.
- Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. 2005 Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* 3: 777-788.
- De Graaf F., Tieze G., Wendelaar B., Stouthamer A. 1968. Purification and Genetic Determination of Bacteriocin Production in *Enterobacter cloacae*. *J. Bacteriol.* p. 631-640.

- Drider D., Fimland G., Héchard Y., McMullen L.M., Prévost H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 564-582.
- Ercolini D., Russo F., Nasi A., Ferranti P., Villani F. 2001. Mesophilic and Psychrotrophic Bacteria from Meat and Their Spoilage Potential In Vitro and in Beef. *Appl Environ Microbiol.* 75(7): 1990–2001.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2013. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance pyrethrins. P: 8.
- FDA (Food and Drug Administration). Disponible en: <http://www.fda.gov/> Última vez accesado en Junio 2013.
- Field D., Begley M., O'Connor P.M., Daly K.M., Hugenholtz F., Cotter P.D. *et al.* 2012. Bioengineered nisin A derivatives with enhanced activity against both Gram positive and Gram negative pathogens. *PLoS ONE* 7:e46884. doi: 10.1371/journal.pone.0046884
- Foulds J.D., Shemin D. 1969. Concomitant synthesis of bacteriocin and bacteriocin inactivator from *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 99:661-666.
- Gaamouche S., Arakrak A., Bakkali M., Laglaoui A. 2014. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and bacteriocins isolated from a traditional brine table olives against pathogenic bacteria, *J.Curr.Microbiol.App.Sci* 3:(11)657-666.
- Gardener B.B., Fravel D.R. 2002. Biological control of plant pathogens. *Plant Health Progress.*
- Gillor O., Etzion A., Riley M.A. 2008. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 81: 591-606.
- González de Llano D., Rodríguez A., Cuesta P. 1996. Effect of lactic starter cultures on the organic acid composition of milk and cheese during ripening-analysis by HPLC. *J. Appl. Bacteriol.* 80 (5): 570-576.
- Guasch J.F., Enfedaque J., Ferrer S., Gargallo D., Regué M. 1995. Bacteriocin 28b, a chromosomally encoded bacteriocin produced by most *Serratia marcescens* biotypes. *Res Microbiol.* 146(6):477-83.
- Ha., Duk-Mo., Dong-Soo C., Seung-Guk H. Identification of Bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria from Kimchi and Partial Characterization of their Bacteriocin. 1994. *J MICROB BIOT* (4): 305-315.
- Henderson J.T., Chopko A.L., van Wassenaar P.D. 1992. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch. Biochem. Biophys.* 295, 5–12.

- Jaramillo-Giraldo D., Meléndez A., Sánchez-Medina O.F. 2010. Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de Lactobacilos y Bifidobacterias. *RVCTA* 1(2):193-209.
- Luostarinen T. 2015. DNA sequence analysis. Disponible en: <http://www.alimetrics.net/en/index.php/dna-sequence-analysis>. Última vez accesado en 26 de Noviembre de 2015.
- Magnusson J., Schnürer J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1-5
- Martin N.I., Sprules T., Carpenter M.R., Cotter P.D., Hill C., *et al.* 2004. Structural characterization of lacticin 3147, a two-peptide lantibiotic with synergistic activity. *Biochemistry* 43: 3049-3056.
- Medicine. 2010.10(51):3426-31
- Mezaini A., Chihib N.E., Bouras A.D., Nedjar-Arroume N., Hornez J.P. 2008. Antibacterial Activity of Some Lactic Acid Bacteria Isolated from an Algerian Dairy Product. *J Environ Public Health*.
- Mezaini A., Chihib N., Bouras A.D., Nedjar-Arroume N., Hornez J.P. 2009. Antibacterial Activity of Some Lactic Acid Bacteria Isolated from an Algerian Dairy Product. *J Environ Public Health*.
- Miller R.M. 1995. Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. *Environ. Health Perspect.* 103: 59-62
- Müller E., Radler F. 1993. Caseicin, a bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Folia Microbiol.* 38:441–446.
- National Center for Biotechnology Information. Pubchem Compound Database; CID=16219761, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16219761> (accessed Nov. 26, 2015).
- Nes I.F., Diep D.B., Håvarstein L.S., Brurberg M.B., Eijsink V. *et al.*, 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70: 113-128.
- Ochoa-Villarreal M., Vargas-Arispuro I., Islas-Osuna M.A., Gonzalez-Aguilar G., Martínez-Téllez M.A. 2011. Pectin-derived oligosaccharides increase color and anthocyanin content in Flame Seedless grapes. *J Sci Food Agric* 91: 1928-1930.
- Oh S., Kim H., Worobo W. 2000. Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *J. Dairy Sci.* 83 (12): 2747-2752.

- Okkers D.J., Dicks L.M.T., Silvester M., Joubert J.J., Odendaal H.J. 1999. Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with fungistatic effect on *Candida albicans*. *J. Appl. Microbiol.* 87: 726-734
- Pal K.K., Gardener M.B. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Piard J., Desmazeaud M. 1991a. Inhibiting factors produced by Lactic Acid Bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait.* 71: 525-541.
- Piard J., Desmazeaud M. 1991b. Inhibiting factors produced by Lactic Acid Bacteria. 2. Bacteriocins and others antibacterial substances. *Lait.* 72: 113-142.
- Raloff J. 1998. Staging germ warfare in foods: Science harnesses bacteria to fend off food poisoning and spoilage. *Sci News* 153(6): 89-90.
- Riley M. A. Wertz J. E. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol* 56: 117-137.
- Ruiz-Larrea F., Rojo-Bezares B., Saénz Y., Navarro L., Díez L., Zarazaga M., Torres C. 2007. Bacteriocinas para la estabilización microbiológica y reducción de la dosis de SO₂. En International Symposium Microbiology and Food Safety of Wine Micro safety wine. España. 20-21.
- Seija V. 2002. Cocos Gram positivos aspectos prácticos. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2019.pdf>. Última vez accesado en 26 de Noviembre de 2015.
- Schaeffer T.L., Cantwell S.G., Brown J.L., Watt D.S., Fall R.R. 1979. Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 742-746.
- Szala B., Paluszak Z., Motyl I. 2012. Antagonistic Effect of Lactic Acid Bacteria on *Salmonella* Seftenberg in Mix Cultures. *Pol. J. Environ. Stud.* 21:5 1399-1403.
- Upreti G.C., Hinsdill R.D. 1975. Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob Agents Chemother* 7: 139-145.
- Urbizu L., Sparo M., Bruni S.S. 2013. Bacterial Antagonist Mediated Protein Molecules. *Clin Exp Pharmacol.* 3: 2.
- Vélez J.M., Gutiérrez L.A., Montoya O.I. Bactericidal Evaluation of Lactic Acid Bacteria Isolated in Sow Colostrum Against *Salmonella* tiphymurium. 2015. *Rev Fac Nal.Agr.* 68(1): 7481-7486.

Voisard C., Keel C., Haas D., Defago G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root of tobacco under gnotobiotic conditions. EMBO J. 8:351-358.

Wilson A., Sigeo D., Epton H. 2005. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. J. Appl. Microbiol. 99 (6): 1516-1521.

