



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

**ESTABILIDAD FÍSICO-QUÍMICA DE UNA
BACTERIOCINA OBTENIDA DE *Lactobacillus graminis*
CON POTENCIAL CONTROL DE BACTERIAS
PATÓGENAS Y FITOPATÓGENAS**

Por:

Yuri Edith Aguirre Guzmán

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Yuri Edith Aguirre Guzmán, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



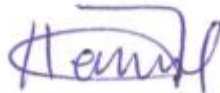
Dra. Irasema Vargas Arispuro
Directora de Tesis



Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez
Asesor



Dr. Alfonso García Galaz
Asesor



M.C. 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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACyT por el apoyo prestado para la realización de este posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. por darme todas las herramientas necesarias para llevar a cabo mi maestría en ciencias.

Doy muchas gracias a mi directora de tesis, la doctora Irasema Vargas Arispuro, por la oportunidad que me brindó para poder seguir con mis estudios bajo su cargo y por el cuidado que ha tenido conmigo tanto como estudiante como a nivel personal, siempre preocupándose por mí.

Al doctor Miguel Ángel Martínez Téllez, por permitirme realizar mi experimental en su laboratorio y permanecer al tanto de mi desarrollo durante toda mi maestría, así como por sus aportaciones a este trabajo.

Al doctor Alfonso García Galaz, por su gran ayuda y aportaciones en este trabajo. Por ser una excelente guía y por su disposición, siempre con gran amabilidad.

Con especial cariño al M. en C. Emmanuel Aispuro Hernández, por sus aportaciones a esta tesis y experimental. Estoy sumamente agradecida por haber contado con su apoyo en todo momento y por sus constantes enseñanzas. Un excelente asesor, compañero de laboratorio y hermano por elección.

A Francisco Javier Soto por su amistad y apoyo técnico en el desarrollo de este trabajo.

Gracias a Cony y Soco por todo su apoyo y sus consejos en los tiempos más difíciles y en los de mayor satisfacción. Por todo su cariño y cuidado.

A Pao, Ale Amavizca, Alvis, Ale Preciado, Karen, Aracely, Gaby, por su amistad y su apoyo.

A Ale y Eloy, por ser tan buenos amigos y siempre estar al pendiente de mí. Por acompañarme en mis viajes de fin de semana al laboratorio solo por cuidarme y siempre hacerme ver el lado positivo de las cosas. Se los agradezco de todo corazón.

A mi mejor amiga, Cynthia Laura, por ser la mejor compañera de laboratorio. Gracias por hacer tan divertidas todas esas horas interminables de experimental. Por compartir alegrías, frustraciones, tristezas y risas hasta de divague cuando el cansancio ya era demasiado. Por siempre estar al pendiente de mí, por no abandonarme en los momentos más difíciles que he pasado en mi vida y por haberme ayudado a sobreponerme. Gracias por tu gran amistad.

Un enorme agradecimiento a mi nueva familia obtenida durante la maestría. A mis mimis Vic y Zhío por su invaluable amistad, por compartir tantísimas mañanas, tardes y noches de tareas y estudio; por compartir tantos momentos invaluable, siempre estar ahí para escucharme en mis momentos de crisis, por sus consejos, y por todo su cariño. A Deya y Cris por ser los ñoñis más lindos que he conocido; gracias por todo su tiempo y esfuerzo durante incontables horas de asesorías, por ser tan buenos amigos y siempre estar a mi lado. A Yulien y Carmen por su amistad y su apoyo en momentos críticos, por estar cuando los necesitaba y compartir esta experiencia inolvidable. A todos, incluyendo a mimi Cynthia Laura, muchísimas gracias por haber hecho de esto, una de las mejores experiencias de mi vida, por convertir este reto en una gran aventura. Sepan cuanto los quiero.

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mi mamá, porque si no fuera por ella nada de esto sería posible. Gracias por tus cuidados y todo tu amor. Gracias por ser mi luz y mi fortaleza.

A mi papá por siempre estar al pendiente de mi desarrollo y de mi salud tanto física como emocional. Gracias por todo tu amor.

Y a mis hermanos que no importa lo que pase, siempre están ahí con tanto amor.

A Dios, por permitirme seguir mi camino y tener un éxito más.

Los amo con todo mi corazón

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II.1 Bacteriocinas: Una Alternativa de Biocontrol	4
II.2 Origen y Aplicación de Bacteriocinas	9
II.2.1 Uso de Bacteriocinas como Herramienta en la Inocuidad Alimentaria	12
II.2.2 Bacteriocinas como Biocontrol de Fitopatógenos	15
II.3 Mecanismo de Acción de las Bacteriocinas	16
II.4 Clasificación de Bacteriocinas	17
II.4.1 Clase I	18
II.4.2 Clase II	19
II.4.2.1 Clase IIa	19
II.4.2.2 Clase IIb	19
II.4.2.3 Clase IIc	19
II.4.3 Clase III	20
II.4.4 Clase IV	20
II.5 Características de las Bacteriocinas para su Efectividad “ <i>in vivo</i> ”	20
II.6 Criopreservación de Bacterias con Actividad Antagónica	21
III. HIPÓTESIS	22
IV. OBJETIVOS	23
IV.1 Objetivo General	23
IV.2 Objetivos Particulares	23
V. METODOLOGÍA	24
V.1 Selección de Aislados Antimicrobianos	24
V.1.1 Cepas y Condiciones de Cultivo	24
V.1.2 Evaluación de Actividad Antimicrobiana Célula-Célula	24
V.2 Obtención de Extractos Concentrados	25
V.2.1 Obtención de Extractos Crudos	25
V.2.2 Concentración de Extractos por Liofilizado	25
V.3 Eliminación de Metabolitos no Proteicos	26
V.4 Estabilidad Físico-Química	26
V.4.1 Evaluación de Estabilidad Térmica	26
V.4.2 Evaluación del pH Sobre la Estabilidad Proteica	27

V.4.3 Estabilidad ante Exposición Enzimática	27
V.4.4 Estabilidad ante Solventes Orgánicos, Metales y Surfactantes	27
V.5 Actividad del Extracto Concentrado contra Patógenos Productores de ETA's y Fitopatógenos	28
V.6 Cuantificación Protéica	28
V.7 Identificación del Aislado Bactriocinogénico	29
V.8 Análisis estadístico	29
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
VI.1 Evaluación de la Capacidad Antagónica	31
VI.2 Selección de Cepa Bacteriocinogénica	33
VI.3 Estabilidad Físico-Química	36
VI.3.1 Resistencia Térmica	36
VI.3.2 Estabilidad a Distintos pH	37
VI.3.3 Respuesta a Exposición Enzimática	38
VI.3.4 Estabilidad ante Surfactantes	40
VI.3.5 Estabilidad ante Solventes	41
VI.3.6 Estabilidad ante Sales Metálicas	43
VI.4 Inhibición de Patógenos y Fitopatógenos	45
VI.5 Identificación molecular del aislado productor de la bacteriocina	47
VII. CONCLUSIÓN	49
VIII. REFERENCIAS	50

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Efecto de los tratamientos enzimáticos sobre la actividad bacteriocinogénica del extracto de A1 sobre <i>Salmonella</i> Saintpaul	39
2	Efecto de los tratamientos con solventes sobre la actividad bacteriocinogénica del extracto de A1 sobre <i>Salmonella</i> Saintpaul	42
3	Efecto de los tratamientos con sales metálicas sobre la actividad bacteriocinogénica del extracto de A1 sobre <i>Salmonella</i> Saintpaul	44
4	Actividad de la bacteriocina producida por A1 sobre <i>Salmonella</i> Typhi y <i>Saccharomyces pastorianus</i>	45
5	Amplificación del gen 16S ribosomal por PCR del aislado bacteriocinogénico	48

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Características de bacteriocinas y antibióticos	8
2	Bacteriocinas con actividad inhibitoria sobre distintos microorganismos	11
3	Brotos producidos por ingesta de alimentos frescos contaminados con patógenos	14
4	Aislados con actividad antagonista contra <i>Salmonella</i> Saintpaul	32
5	Aislados con actividad inhibitoria contra <i>Salmonella</i> Saintpaul mediada por bacteriocinas.	34
6	Actividad bacteriocinogénica de extractos obtenidos de A1 y <i>L. animalis</i> a las 24 y 48 horas	34
7	Evaluación de la estabilidad térmica de la bacteriocina producida por el aislado 1	37
8	Evaluación de la estabilidad de la bacteriocina producida por el aislado 1 a distintos pH	38
9	Estabilidad de la bacteriocina producida por el aislado 1 tratado con distintas enzimas hidrolíticas	40
10	Resultados de exposición de la bacteriocina producida por el aislado 1 a distintos surfactantes	41
11	Resultados de exposición de la bacteriocina a solventes orgánicos	42
12	Resultados de exposición de la bacteriocina producida por el aislado 1 a sales metálicas	44
13	Actividad antimicrobiana sobre bacterias patógenas y fitopatógenas por efecto de bacteriocina producida por el aislado 1	45

RESUMEN

A pesar de las propuestas prometedoras de múltiples bacteriocinas descubiertas en estudios *in vitro*, pocas han logrado mantener su actividad en las aplicaciones, debido a condiciones que provocan su inactivación. La estabilidad físico-química, es un parámetro importante en la caracterización de una bacteriocina. Por ello el objetivo de este trabajo fue obtener un concentrado de bacteriocina producida por un aislado crioconservado por dos años y que fue obtenido de frutos, para caracterizar su estabilidad físico-química y evaluar su efectividad contra bacterias patógenas y fitopatógenas. De los 369 aislados bacterianos antagonistas crioconservados por dos años, se observó que 49 de éstos mantuvieron la actividad antagónica, y solamente dos, presentaron actividad bacteriocinogénica sobre *Salmonella* Saintpaul. La producción de bacteriocina del aislado con mayor halo de inhibición (A1), se evaluó a las 24 y 48 horas, y su efectividad se comparó con la de *Lactobacillus animalis* (control). El A1 mantuvo una actividad constante entre las 24 y 48 horas y el sobrenadante del cultivo de 24 horas, con una concentración de 17.8 5mg/mL de proteína, presentó mayor halo de inhibición (28 mm) que *L. animalis* (17 mm) sobre la cepa indicadora. La bacteriocina producida por A1, resultó ser estable en un amplio rango de temperaturas, pH y ante distintos solventes, metales y surfactantes. Además fue resistente a proteasa, proteinasa K, tripsina y lipasa. Adicionalmente, resultó efectiva para controlar el crecimiento de *S. Typhi*, *S. Typhimurium*, *S. choleraesuis*, *E. coli* O157:H7 y *Erwinia carotovora*. La identificación molecular del aislado mediante la secuenciación del gen 16S ARN ribosomal, indicó un 99% de identidad con *Lactobacillus graminis*. Basados en las características de estabilidad físico-química y la efectividad contra otra bacteria se infiere que la bacteriocina producida por esta cepa representa una potencial alternativa de biocontrol sobre el fitopatógeno *Erwinia carotovora* y sobre patógenos contaminantes en frutos y hortalizas.

Palabras clave: Bacteriocina, *Lactobacillus graminis*, *Salmonella*, *E. coli* O157: H7, bacterias fitopatógenas.

ABSTRACT

Despite promising proposals of multiple bacteriocins, a large number of these substances have failed in maintaining their activity during applications, where these substances are confronted with conditions that may inactivate them. The physicochemical stability is an important parameter in the characterization of a bacteriocin. Therefore the aim of this work was to obtain a bacteriocin concentrate produced by an isolate obtained from fruits, characterize its physical-chemical stability and to evaluate its effectiveness against pathogenic and phytopathogenic bacteria. After the evaluation of 369 antagonistic bacterial isolates cryopreserved for two years, 49 isolates remained active and only two presented bacteriocinogenic. The isolate with the highest inhibition zone (A1) over *Salmonella* Saintpaul was selected for further evaluations. When evaluating the 24 and 48 hour extracts of both (A1) and *Lactobacillus animalis* (control), the A1 24-hour extract was found to have an inhibition zone of 28 mm while *L. animalis* produced an inhibition of 17 mm over the indicator strain. A1 maintained a constant bacteriocinogenic activity between 24 and 48 hours. A protein concentration of 17.85mg/mL was determined in the supernatant of the A1 24-hour culture. The bacteriocin was stable against different solvents, metals, surfactants, at a wide temperature range and at pH 3 to 7. It was also resistant to protease, protease K, trypsin and lipase. Moreover it had activity over *S. Typhi*, *S. Typhimurium*, *S. choleraesuis*, *E. coli* O157:H7 and *Erwinia carotovora*. Molecular identification of the isolate indicated a 99% identity with *Lactobacillus graminis*. The bacteriocin produced by this strain represents a potential biocontrol alternative over phytopathogens like *Erwinia carotovora* and pathogens contaminating fruits and vegetables.

Keywords: Bacteriocin, *Lactobacillus graminis*, *Salmonella*, *E. coli* O157: H7, phytopathogens.

I.INTRODUCCIÓN

A pesar del extendido uso de antibióticos para luchar contra los organismos causantes de enfermedades específicas (Rivero G., 2004), estos biocidas han estado prohibidos para su uso en los alimentos. Para resolver esta ausencia, la industria alimentaria ha enfocado esfuerzos a la prevención de propagación de microorganismos mediante la aplicación de buenas prácticas como medida de control (Bihn y Gravani, 2006).

La aplicación de buenas prácticas durante la producción hortifrutícola en campo y el manejo postcosecha, reduce al mínimo la contaminación biológica, química o física, proporcionando mayor fiabilidad al consumidor. Sin embargo, a pesar de una excelente implementación de los programas de buenas prácticas, se han reportado contaminaciones en alguna etapa de la cadena de producción del cultivo (Arispe y Soledad, 2007). Los contaminantes más persistentes son los de carácter microbiológico por no ser detectables a simple vista, con el riesgo de producir una infección a los consumidores.

Por otro lado, en la agricultura los productores se enfrentan constantemente a situaciones donde sus cultivos se ven infectados por bacterias fitopatógenas que afectan el rendimiento en sus cosechas, conllevando a grandes pérdidas económicas (Utnique y Smith, 1990), sin estar autorizado el uso de antibióticos sobre tales cultivos (Sheikh et al., 2009). Estos antecedentes, ponen en evidencia la necesidad de incrementar la búsqueda de agentes de biocontrol ya que hasta el momento existen alternativas limitadas. Los tratamientos de ozono y radiación UV son eficientes en la desinfección de frutas o vegetales de superficie lisa, mas no logran eliminar las bacterias adheridas en los pliegues de vegetales de hoja

como lechuga o espinaca y en cavidades superficiales como las del melón cantaloupe. Los desinfectantes en solución como las distintas formulaciones con cloro, ácido cítrico y peróxido de hidrógeno provocan cambios en el color, afectando la presentación del alimento, por lo que se deben utilizar concentraciones mínimas, que en algunos casos pueden no ser suficientes para la eliminación total de los patógenos (Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2013).

Aunque algunos métodos químicos han demostrado eficiencia, se ha observado que su uso tiene un impacto negativo en la salud de los consumidores, lo que ha llevado a explorar alternativas naturales que sustituyan el uso de métodos químicos (Kochamit et al., 2015). En esta búsqueda de alternativas innovadoras para la resolución a dicha problemática, se ha propuesto el aprovechamiento de microorganismos no patogénicos antagonistas de bacterias patógenas desarrolladas en los mismos nichos biológicos (Vásquez et al., 2009).

Actualmente se han aislado diversas bacterias con propiedades antagonistas, que por sus características son empleadas en la industria alimentaria, y otras más que se encuentran en investigación (Udhayashree et al., 2012; Andrade-Bustamante, 2014). Se han descrito varios metabolitos que pueden conceder la propiedad antagonista a una bacteria (Jiang et al., 2004) entre los que se encuentra una amplia gama de sustancias proteicas denominadas bacteriocinas, conocidas como antimicrobianos naturales, que ejercen actividad inhibitoria a patógenos que comparten su mismo hábitat (Inglis et al., 2013).

Sin embargo a pesar de las propuestas prometedoras de múltiples bacteriocinas evaluadas *in vitro*, solo nisina ha sido comercializada, ya que el resto no cumple con los requerimientos de la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA), o no mantiene su actividad antagonista *in vivo* e *in situ*.

Dentro de los principales parámetros a considerar para la evaluación *in vivo*, se encuentra la estabilidad de la bacteriocina ante distintas condiciones físicas y

químicas, en las que se demuestre que mantiene la actividad antagónica después de la exposición a distintas enzimas, sales metálicas, solventes y surfactantes, así como a amplios rangos de temperatura y pH. Un aspecto importante a considerar cuando se evaluó una bacteriocina para utilizarse en el control de patógenos de alimentos, es que estas sustancias puedan ser degradadas fácilmente por enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal, convirtiéndolas en un producto seguro para el consumo humano (Rorof et al., 2012). Una bacteriocina que cumpla con todos los requisitos de estabilidad físico-química, tiene mayores posibilidades de mantener la efectividad en la validación para su utilización como biocontrol (Rojas y Vargas, 2008). Por lo que en este trabajo nos hemos planteado el objetivo de obtener y evaluar la estabilidad físico-química de un extracto concentrado de bacteriocina producida por un aislado bacteriano criopreservado en glicerol 20% a -80 °C por dos años que fue obtenido de la superficie de frutos frescos.

II. ANTECEDENTES

II.1 Bacteriocinas: Una Alternativa de Biocontrol

En la naturaleza existen sustancias proteicas producidas por una gran variedad de bacterias tanto Gram positivas como negativas, a las cuales se les ha atribuido capacidad de actividad antimicrobiana, siendo estas denominadas como bacteriocinas (Zacharof et al., 2012). Se piensa que la mayoría de las especies bacterianas poseen la capacidad de producir tales metabolitos. Esto debido a que su maquinaria de defensa es relativamente sencilla y frecuentemente la producción de estas sustancias se encuentran asociadas a elementos conjugativos tales como transposones o plásmidos (Pérez et al., 2014). Por lo que se asume una vasta presencia de estas sustancias con potencial antibacteriano dentro de la misma naturaleza que rodea a varios patógenos de interés.

La primera bacteriocina identificada por Gratia en el año de 1925 como una proteína antimicrobiana, fue extraída de *Escherichia coli* y fue llamada colicina (Pinheiro et al., 2013). Para el año de 1988, otra bacteriocina llamada nisina, fue lanzada comercialmente, como un aditivo considerado seguro y aprobado por la FDA. En los años 90 se tomó una mayor atención hacia el desarrollo de alternativas para la sustitución de antibióticos, sobre todo tomando en cuenta el aumento de resistencia que se sigue presentando con el uso de antibióticos (Snyder y Worobo, 2014). Para el año de 1995, ya se conocían más de 100 bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (BAL).

Durante las últimas décadas, una gran cantidad de estudios se han enfocado a la detección, producción, forma de acción, caracterización bioquímica, propiedades bactericidas y microorganismos inhibidos por las bacteriocinas. A consecuencia de los resultados de estos estudios, es que surgió el término de bacteriogenicidad, el cual se define como la capacidad bacteriana de sintetizar y secretar proteínas de actividad antagónica sobre otros microorganismos que comparten el mismo nicho biológico y están en constante competencia por nutrientes y espacio (Vásquez et al., 2009).

Estos metabolitos son en general pequeñas proteínas de naturaleza catiónica, heterogéneas, que suelen estar conformadas por 20 a 60 residuos de aminoácidos, con un punto isoeléctrico elevado, y características anfipáticas. Dichas características varían de forma considerable, dependiendo del microorganismo productor, lo que determina desde su tamaño, propiedades bioquímicas, hasta su espectro de actividad antibacteriana (Moreno et al., 2002).

En referencia a su síntesis, se ha encontrado que estas sustancias son sintetizadas ribosomalmente y solo algunas de ellas son modificadas de manera postraduccional. Los genes para su codificación e inmunidad, generalmente son organizados en grupos de operones y pueden ser localizados en elementos movilizables tales como cromosomas asociados a transposones o plásmidos (Castillo et al., 2013).

Las bacteriocinas son sintetizadas primeramente en forma de pre-péptidos o prébacteriocinas biológicamente inactivas. Algunos de estos contienen una secuencia de 18 a 27 aminoácidos que presentan dos glicinas en la región terminal. La función de esa secuencia, es evitar que la bacteriocina sea biológicamente activa dentro de la célula productora y servir finalmente como señal de reconocimiento para el sistema de transporte de proteínas ABC, el cual es el accesorio de transporte para su secreción (Moreno et al., 2002). Posteriormente, antes de ser liberados, algunos péptidos son modificados por

otro grupo de proteínas o aminoácidos codificados por el mismo grupo de genes para bacteriocinas, de forma que puedan llevar a cabo su función efectiva (Zacharof et al., 2012).

Algunas de las propiedades generales que han sido señaladas para las bacteriocinas son que pueden ejercer un efecto bactericida o bacteriostático, dependiendo de la concentración aplicada; pueden presentar un pequeño o amplio espectro de actividad; son capaces de reaccionar con sitios de unión específicos o inespecíficos en las bacterias sensibles y en su mayoría presentan un mecanismo de acción de desestabilización de la fuerza protónica de la membrana celular (Moreno et al., 2002). Culminando así con la desintegración de la membrana de la bacteria antagonizada.

La mayoría de las bacteriocinas encontradas provenientes de bacterias ácido lácticas, son péptidos pequeños de un tamaño generalmente menor a 10 kDa, termoestables, anfipáticas y permeabilizantes de membrana. Muchas de estas bacteriocinas parecen presentar una baja especificidad de absorción. Aun así, estas son capaces de presentar una gran efectividad de actividad inhibitoria sobre determinadas bacterias, dado que la pared celular de las bacterias Gram positivas permiten el paso de moléculas relativamente grandes. Además, tal efectividad es debida, en gran parte, a que las bacterias Gram positivas poseen una superficie aniónica, relacionada con su composición de polímeros de tipo ácido teicoico y lipoteicoico; punto clave en la interacción aniónica (Chen y Hoover, 2003).

Las bacteriocinas, han tomado gran relevancia en distintas áreas de la industria alimentaria como una alternativa de biocontrol. Sus aplicaciones, incluyen desde el control de patógenos en alimentos procesados en donde la adición de bacteriocinas ha sido estudiada para poder sustituir conservadores, abriendo una ventana hacia la disminución de aditivos sintéticos (Vásquez et al., 2009), hasta su aplicación en alimentos de consumo en fresco, para el control de patógenos

y fitopatógenos de interés en el área agroalimentaria. Para todas estas aplicaciones que impactan en productos de consumo humano es requerido llevar a cabo un estudio a profundidad de sus características (Vijai et al., 2005).

Las bacteriocinas aunque eficientes contra una amplia gama de patógenos, no pertenecen al grupo de los antibióticos u otro tipo de sustancias antimicrobianas. Además de definir los aspectos y ventajas que presentan las bacteriocinas en comparación con los antibióticos, es importante definir sus diferencias desde el punto de vista legal, el cual podría limitar su aplicación industrial (Güllüce et al., 2013). Dichos aspectos y diferencias son señaladas y resumidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de bacteriocinas y antibióticos. Diferencias básicas entre un metabolito primario y secundario de actividad antimicrobiana.

Características	Antibióticos	Bacteriocinas
Modo de producción	Sintetizado por enzimas	Sintetizada ribosomalmente
Fase de producción	Metabolismo secundario	Metabolismo primario
Mecanismo de acción	Diversos	Membrana citoplasmática
Aplicación	Clínica	Alimentos/Química
Resistencia microbiana	Existen cepas resistentes	Existen cepas resistentes
Acción de enzimas proteolíticas	No son digeridas	Son digeridas
Espectro de actividad	Mayormente amplio	Mayormente reducido
Estabilidad térmica	Baja	Alta
Rango de actividad de pH	Estrecho	Amplio
Color/Sabor/Olor	Si	No
Mecanismos de adaptación celular como resistencia	Determinante genéticamente transferible que inactiva el compuesto activo	Modificaciones de composición de membrana
Toxicidad a células eucariotas	Si	Relativamente negativa
Intensidad de bioactividad	micro-mili molar	nano-micro molar
Posibilidades de bioingeniería	No	Si

(Moreno et al., 2002; Perez et al., 2014)

II.2 Origen y Aplicación de las Bacteriocinas.

La búsqueda de nuevas alternativas a los antibióticos, se ha fortalecido por las demandas de los consumidores hacia la industria alimentaria, exigiendo alimentos libres de residuos químicos (Corsetti et al., 2008). El aislamiento y evaluación de microorganismos ha sido uno de los procesos más importantes para la obtención de productos biológicos activos, con finalidad de aplicación clínica y comercial. Ciertamente, esta aseveración aplica en gran manera para las BAL. Dado que estas bacterias han sido utilizadas en la producción de alimentos por cientos de años, por lo que se ha asumido que no representan un riesgo a la humanidad, razón por la cual la FDA determinó que esta cualidad les permite pertenecer a la categoría de microorganismos Generalmente Reconocidos como Seguros (GRAS), es decir, ser clasificados como de grado alimenticio (Perez et al., 2014; Vijai et al., 2005).

Esta clasificación ha permitido considerar la opción de agregar a los alimentos sustancias producidas por microorganismos de grado GRAS (Zapata et al., 2009; Davidson et al., 2013). Tal es el caso de las bacteriocinas producidas por BAL, que representan un potencial ideal para su uso como conservador, al controlar el desarrollo de microorganismos de deterioro en los alimentos procesados y ampliar su vida de anaquel de manera segura para la salud del consumidor, así como al proteger alimentos frescos del desarrollo de patógenos (O'Connor et al., 2015; Yu et al., 2010). Sin embargo queda claro que para la obtención de sustancias antibacterianas, específicas contra patógenos que contaminan de manera usual alimentos de consumo fresco, es importante considerar la obtención de bacterias antagonistas que compartan el mismo nicho biológico.

La única bacteriocina considerada como segura según la Organización de Agricultura y Alimentos (FAO) y utilizada comercialmente es la nisina producida por *Lactococcus lactis* (Pinheiro et al., 2013; Gahnbari et al., 2013); bacteriocina más conocida y aplicada en alimentos, dado su reconocimiento y permiso emitido

por la FDA. Además, bacteriocinas como la pediocina PA-1, producida por *Pediococcus acidilactici* (Zapata et al., 2009) y bacteriocinas secretadas por una cepa de *Bacillus subtilis* (genética y fisiológicamente caracterizada) (Kochamit et al., 2015) muestran un futuro prometedor.

Entre otras especies bacteriocinogénicas se encuentran *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus atropheus*. Entre las bacteriocinas producidas por *Bacillus* se encuentra la subtilosina, que es altamente estable a altas temperaturas y en un amplio rango de pH y además exhibe un efecto bactericida de amplio espectro sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Incluso se ha observado que subtilosina A1; que es una variante de subtilosina A producida por *B. subtilis*, también presenta actividad hemolítica severa sobre bacterias Gram positivas como *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus carnosus* y *Listeria monocytogenes* (Cleveland et al., 2001).

La aplicación de las bacteriocinas ha logrado una disminución significativa en la aplicación de conservadores químicos y tratamientos físicos como la refrigeración y calentamientos drásticos (Gahnbari et al., 2013). En la Tabla 2 se muestran distintas bacteriocinas que han sido aisladas de una amplia variedad de productos, entre ellos frutos; todas éstas con actividad inhibitoria sobre varios microorganismos de interés, relacionado con su rol en la descomposición y afección a alimentos procesados, e incluso frescos, donde se pueden desarrollar brotes por ingesta de frutos o vegetales contaminados.

Tabla 2. Bacteriocinas con actividad inhibitoria sobre distintos microorganismos.

Microorganismo productor	Microorganismo inhibido	Autores
<i>Bacillus subtilis</i> KKU213	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Enterococcus faecalis</i>	Kochamit et al., 2015
<i>Bifidobacterium animalis</i> BB04	<i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. aureus</i>	Liu et al., 2015
<i>Bacillus thuringiensis</i> 524 subsp. Tolworthi	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. xylosum</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Shigella flexneri</i> y <i>Shigella sonnei</i> .	Barboza-Corona et al., 2014
<i>Weissella hellenica</i> D1501	<i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Candida albicans</i>	Dong et al., 2014
<i>Lactococcus garvieae</i> LG34	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Streptococcus thermophiles</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Sarcina flava</i> , <i>E. coli</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gao et al., 2014
<i>Streptococcus salivarius</i> NU10, YU10 GT2 y K12	<i>Corynebacterium. spp</i> GH17, <i>L. monocytogenes</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Micrococcus luteus</i>	Philip y Barbour, 2014

II.2.1 Uso de Bacteriocinas como Herramienta en la Inocuidad Alimentaria.

Actualmente la conciencia del consumidor sobre el efecto de la ingesta de alimentos contaminados ha provocado una mayor demanda en cuanto a la calidad e inocuidad de alimentos. Esta situación es debida a un mayor conocimiento sobre las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Aunque estas enfermedades pueden ser producidas por la ingestión de alimentos o agua contaminados con agentes químicos o microbiológicos, la mayor parte de los brotes (ETA) son producidos por microorganismos (Arispe y Soledad, 2007). La contaminación de los alimentos, tanto de consumo en fresco como procesados, puede deberse a la deficiencia en el proceso de elaboración, manipulación, conservación, transporte, distribución o comercialización (Caballero et al., 2008). De manera que es importante realizar un control de desinfección sobre los alimentos frescos no procesados que se encuentran constantemente expuestos, y a su vez encontrar nuevas fuentes y productos desinfectantes aplicables en los distintos puntos de contaminación de dichos alimentos (Bihn y Gravani, 2006).

Actualmente se encuentran pocos estudios para la aplicación de bacteriocinas en alimentos de consumo fresco, en comparación con los múltiples estudios realizados sobre bacteriocinas añadidas a productos cárnicos y procesados. Esta situación ha impactado en la proliferación de brotes por patógenos en alimentos de consumo en fresco, reportados por la FDA en Estados Unidos, donde se tiene un riguroso control de seguridad en los alimentos. En la Tabla 3 se muestran brotes de enfermedades transmitidas por alimentos no procesados según los reportes del Centro de Control de Enfermedades (CDC, 2016).

Pocos trabajos se encuentran publicados acerca del aislamiento de microorganismos pertenecientes a la microbiota natural de frutos y hortalizas, las cuales se encuentran constantemente expuestas a contaminaciones. Entre estos trabajos publicados, encontramos el de Todorov y colaboradores (2011), quienes consiguieron aislar *L. plantarum* de la superficie de papaya. Esta bacteria posee

la capacidad de producir una bacteriocina con actividad inhibitoria sobre *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Listeria monocytogenes*, patógenos que se encuentran en la superficie de frutos frescos

Por otra parte Gálvez y colaboradores (2005) determinaron la eficiencia de la inmersión de vegetales crudos en soluciones que contenían enterocina AS-48 para estimar el control sobre la contaminación por *L. monocytogenes*. Para este proceso se utilizaron brotes de soya, espárragos verdes y alfalfa fresca. En todos los vegetales se encontró una disminución significativa de la cepa indicadora al sumergir los vegetales en soluciones de 5g/mL y 25g/mL de enterocina AS-48.

Tabla 3. Brotes producidos por ingesta de alimentos frescos contaminados con patógenos. Se incluyen únicamente los brotes reportados por la CDC en los últimos 5 años.

Producto	Fecha	Casos	Patógeno
Germinado de alfalfa	Agosto 2016	37	<i>Salmonella</i> Reading <i>Salmonella</i> Abony
Germinado de alfalfa	Febrero 2016	26	<i>Salmonella</i> Kentucky
Germinado de alfalfa	Febrero 2016	11	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
Germinado de soya	Noviembre 2014	115	<i>Salmonella</i> Aboni
Pepinos	Septiembre 2015	907	<i>Salmonella</i> Poona
Pepinos	Septiembre 2014	275	<i>Salmonella</i> Newport
Varios germinados	Junio 2014	5	<i>Listeria monocytogenes</i>
Pepinos importados	Abril 2013	84	<i>Salmonella</i> Saintpaul
Mango	Septiembre 2012	127	<i>Salmonella</i> Braenderup
Melón cantaloupe	Agosto 2012	228	<i>Salmonella</i> Tiphymurium
Melón cantaloupe	Agosto 2012	33	<i>Salmonella</i> Newport
Lechuga romana	Marzo 2012	58	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
Melón cantaloupe	Diciembre 2011	33	<i>Listeria monocytogenes</i>
Papaya	Agosto 2011	106	<i>Salmonella</i> Agona

II.2.2 Bacteriocinas como Biocontrol de Bacterias Fitopatógenas

En general, las infecciones bacterianas en plantas representan un reto en cuanto a su biocontrol, ya que existen pocos químicos efectivos para erradicar esta clase de fitopatógenos. Aunque se ha planteado la opción del uso de antibióticos para la erradicación de tales infecciones en plantas, esta propuesta ha sido rechazada como alternativa. La razón de tal negativa es debido a que las aplicaciones de estos fármacos conllevarían a una pronta resistencia por parte de los microorganismos, teniendo como consecuencia una exposición de los consumidores a graves infecciones por posibles bacterias patógenas resistentes a tratamiento clínico (Nishie et al., 2012).

Por otro lado, dentro de los tratamientos efectivos contra los ataques de algunos fitopatógenos bacterianos, como lo son distintas especies de, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* y algunas especies de *Agrobacterium* (Cho et al., 2001) se encuentra el uso de cobre, sin embargo éste puede llegar a presentar un efecto tóxico sobre la planta. En este contexto, es que se plantea la necesidad de la búsqueda de nuevas opciones para el tratamiento de estas enfermedades, las cuales llegan a afectar múltiples cultivares, produciendo pérdidas económicas de gran magnitud en diversos países (Sheikh et al., 2009).

Uno de los posibles tratamientos planteados en las últimas décadas mas no ampliamente estudiado ha sido la aplicación de microorganismos productores de bacteriocinas que posean una actividad inhibitoria sobre los fitopatógenos de particular interés. Así de igual manera, ha sido considerada la aplicación directa de las bacteriocinas sobre los cultivos infectados.

Pootjes y MacCardell (1979) reportaron que la adición de agrocina 84 producida por *Agrobacterium radiobacter* podía resultar en la muerte de hasta el 50% de *Agrobacterium tumefaciens* causante de la enfermedad de la corona en varios cultivos. Mientras que López et al., (1989) comenzaron a estudiar la resistencia

de dos cepas de *A. tumefaciens* resistentes a agrocin 84 producida por distintas cepas de *A. radiobacter*.

II.3 Mecanismo de Acción de las Bacteriocinas.

El mecanismo de acción de las bacteriocinas ha sido estudiado en algunos lantibióticos, que son una clase de bacteriocinas que poseen las características de ser péptidos pequeños y relativamente termoestables, revelando que el daño de las bacteriocinas ocurre en la membrana citoplasmática. Como se mencionó anteriormente, el efecto de la bacteriocina puede ser tanto bacteriostático como bactericida, dependiendo de la concentración utilizada. Estas actúan permeabilizando las membranas de las células sensibles, por medio de la formación de poros, lo que causa un desbalance iónico. La estructura de estos péptidos, α -hélice o β -laminar, formaría dos caras, una hidrofílica y otra hidrofóbica, creando oligómeros que atravesarían la membrana formando poros, en los que el lado apolar de la molécula se situaría próxima a los lípidos de la membrana, y el lado polar miraría al centro del poro (Vásquez et al., 2009).

A consecuencia de la formación de estos poros, se lleva a cabo la disipación de la fuerza motriz protónica (FMP), la cual está relacionada directamente con la producción de ATP, fosforilación de proteínas, síntesis y rotación de flagelos, así como de las proteínas de transporte. Con la disipación de la fuerza protónica, 98.9% del ATP es hidrolizado en el intento de mantener la FMP. El transporte activo de los aminoácidos y la reserva de aminoácidos son liberados por la célula a través del poro formado. De manera que a partir de ese trastorno primario, se genera la lisis celular. Durante la primera etapa se implica la formación de los poros por interacciones electrostáticas entre las cargas positivas de los residuos polares de la bacteriocina con un fosfolípido aniónico presente en la bicapa lipídica; en esta etapa la bacteriocina puede ser susceptible a enzimas proteolíticas. En la segunda fase el proceso es irreversible, lo que implica

cambios letales en cepas sensibles a la bacteriocina (Moreno et al., 2002; Cotter et al., 2012). Teniendo en cuenta la información experimental hasta la fecha, se estima que la formación de poros tiene lugar en tan solo milisegundos (Cruz et al., 2013).

A pesar de la larga historia del uso de las bacteriocinas, existen escasos reportes de resistencia bacteriana. Una de las posibles razones es que estas sustancias tienen un rápido mecanismo de acción, formando poros en los blancos de la membrana bacteriana, incluso a concentraciones muy bajas (Perez et al., 2014), lo cual les confiere una mayor ventaja para su aplicación en el control de patógenos de interés para la industria alimentaria y agroalimentaria.

Es de esperarse que surjan nuevas investigaciones enfocadas a la implementación y optimización de dichas sustancias. Sin embargo éstas deben pasar por una larga serie de evaluaciones para poder obtener la aprobación de los Expertos en Aditivos de la Organización Mundial de la Salud, así como de la Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos (Perez et al., 2014).

II.4 Clasificación de las Bacteriocinas

La clasificación de las bacteriocinas generalmente ha sido determinada según sus características químicas, físicas y genéticas, así como por su espectro de actividad (Vásquez et al., 2009; Mondragón 2013). Algunos autores han coincidido en aplicar la siguiente clasificación.

En la clase I se categorizan los péptidos de un tamaño entre 2 y 6 kDa, y son modificados postraduccionalmente mediante la deshidratación de serina y treonina con una posterior adición de cisteína para formar los aminoácidos antionina y metilantionina. La clase II corresponde a péptidos no modificados postraduccionalmente, son termoestables y presentan un rango de actividad

bastante limitado. A la clase III pertenecen proteínas con un peso superior a 30 kDa y sensibles al calor. La clase IV está conformada por un grupo heterogéneo de proteínas que presentan adiciones de carbohidratos y lípidos (Vásquez et al., 2009; Mondragón 2013).

La clasificación anteriormente presentada ha sido ampliada en especificaciones de características después de una constante revisión a través de los últimos años, la gran mayoría de los autores, ha optado por aplicar esta clasificación, considerándola como la más adecuada tomando los resultados de extensas investigaciones recientes (Pérez et al., 2014).

II.4.1 Clase I lantibióticos

Péptidos pequeños (19-38 aminoácidos) que poseen lantionina o β -metilantionina. Estos residuos inusuales forman puentes covalentes entre los aminoácidos, lo que produce anillos internos que resultan en lantibióticos. Esto le confiere rasgos estructurales característicos a esta clase de bacteriocinas (Cotter et al., 2005; Nishie et al., 2012). Su biosíntesis comienza con la traducción del pre-péptido, el cual consiste de un péptido señal y un péptido modificable. El péptido procede a ser modificado y sigue al péptido señal hasta ser translocado en la membrana donde el péptido señal es retirado por enzimas proteolíticas específicas.

Los genes que codifican las proteínas de la inmunidad, así como las proteínas implicadas en la regulación de la producción de bacteriocinas, generalmente se encuentran localizados en el clúster alrededor del gen estructural de la bacteriocina (Lubelski et al., 2008).

II.4.2 Clase II no lantibióticos

Péptidos pequeños (<10 kDa), lineales y sin modificaciones postraduccionales, termoestables y con una estructura anfipática helicoidal que permite que actúen a nivel de la membrana plasmática, causando la muerte de la célula sensible (Deegan et al., 2006).

II.4.2.1 Clase II a. Son péptidos activos que contienen la secuencia consenso en la región N-terminal YGNGVXC (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys), la cual es responsable de la alta potencia contra patógenos presentes en alimentos tales como *Listeria monocytogenes*. Estas bacteriocinas poseen de 37-48 aminoácidos y poseen carga positiva. Además, que se estabiliza por dos cisteínas que forman un puente disulfuro, y la parte C-terminal hidrófoba y / o anfifílica que consiste en una o dos α -hélices (Castillo et al., 2013). Ejemplos de éstas son pediocina PA-1 y sakacina P. (González-Martínez et al., 2003).

II.4.2.2 Clase II b. Formadores de complejos, requieren de dos péptidos para una mejor actividad antimicrobiana y dar paso a la formación de poros. Miembros de este grupo son lactococcina G, plantaricinas EF y JK, lactacina F (Oppegard et al., 2010; Zacharof et al., 2012).

II.4.2.3 Clase II c. Pequeños péptidos, termoestables, no modificados y que son transportados por péptidos líder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B. (González-Martínez et al., 2003).

II.4.3 Clase III

Esta clasificación agrupa a péptidos más grandes (>30 kDa), termolábiles (Rea et al., 2012) y con actividad y estructura compleja. Algunos ejemplos son helveticina J. V, acidofilicina A y lactacinas A y B (Mondragón et al., 2013).

II.4.4 Clase IV

Esa clasificación ha sido reservada para aquellas bacteriocinas que requieren restos no proteínicos para la actividad, pero aún no hay miembros de esta clase demostrados de forma convincente, por lo que no han incluido esta clase en la nueva propuesta (Cotter et al., 2005; Rea et al., 2011).

Dada la amplia gama de bacteriocinas según su clasificación, existen distintas oportunidades de aplicación según las características que presenten los microorganismos que se deseen erradicar o controlar en su desarrollo. Además, la importancia del conocimiento de su clasificación hace más sencillo dirigir los objetivos del uso de cada una de ellas al considerar las condiciones ambientales e incluso el tipo de superficie en donde se desee aplicar.

II.5 Características de las Bacteriocinas para su Efectividad *in vivo*

Para llevar a cabo la aplicación de un antimicrobiano natural a un producto alimenticio, es necesario tratar con algunos factores de importancia. Esto debido a que dichos factores pueden afectar la actividad del antimicrobiano y la calidad del producto. Es necesario estudiar a profundidad el tipo de antimicrobiano, tipo de alimento, condiciones de almacenamiento, tipos de procesos aplicados sobre el alimento y con gran importancia debe determinarse el tipo de microorganismo que desea atacarse (Davidson et al., 2013).

De manera que una vez estudiada y concretada la efectividad de una bacteriocina sobre los microorganismos de interés, tanto de forma *in vitro* como *in vivo*, se deben evaluar sus características biofísicoquímicas. Estas evaluaciones deben ser determinadas meticulosamente, dado que en dependencia de los resultados obtenidos a partir de su comportamiento con respecto a la estabilidad o inestabilidad frente a distintas condiciones y efectos químicos, podrá determinarse su viabilidad para aplicaciones industriales.

II.6 Criopreservación de Bacterias con Actividad Antagónica

Comúnmente la criopreservación es utilizada como técnica de conservación de bacterias (Kanmani et al., 2011), este método físico-químico permite la conservación de microorganismos viables, los cuales pueden por un tiempo no sufrir cambios genotípicos (Sánchez et al., 2005). Sin embargo este método trae consigo efectos indeseables tanto para las membranas bacterianas como para su metabolismo (Kanmani et al., 2011). Los defectos indeseables se presentan dado a que en este proceso se involucra el agua como microambiente y es ella la que cambia su estado de líquido a sólido; de otro lado, la bacteria inmersa en este medio debe adaptarse a las condiciones de este nuevo ambiente, transformar la velocidad de su metabolismo, conservar su viabilidad y evitar que los cristales de hielo formados por el cambio de temperatura del agua le ocasione algún daño (Sánchez et al., 2005).

Aunque la capacidad que tienen los microorganismos de transformar las propiedades físicas, químicas y biológicas del ambiente en que se encuentran en cualquier condición, se acentúa aún más en condiciones no favorables en las cuales se ven abocados a originar cambios significativos y rápidos en sus actividades metabólicas (Sánchez et al., 2005).

Aunque la respuesta del estrés bacteriano por frío aún no ha sido caracterizada de forma detallada, se sabe que está directamente relacionada con la composición de la membrana, la fase de crecimiento y el metabolismo respiratorio de cada célula. Se ha encontrado que dicho estrés se relaciona con la activación o represión de genes; siendo la represión lo más común. Los sistemas regulatorios que controlan las respuestas al estrés en *Saccharomyces cerevisiae*, conlleva a efectos a nivel transcripcional (Randez-Gil et al., 2002).

III. HIPÓTESIS

Aislados bacterianos con dos años de criopreservación y que fueron obtenidos de la superficie de frutos frescos, mantienen la capacidad de producir al menos una bacteriocina con características físico-químicas que le permitirán su utilización *in vivo* como agente de biocontrol sobre patógenos causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos y fitopatógenos.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo General

Caracterizar la estabilidad físico-química y actividad antimicrobiana de un extracto concentrado de bacteriocina producida por un aislado bacteriano criopreservado por dos años y realizar su identificación molecular.

IV.2 Objetivos Particulares

- a) Reevaluar la capacidad antagónica de 369 aislados mesófilos, psicrófilos y coliformes y BAL criopreservados contra *Salmonella* Saintpaul y obtener un extracto concentrado de los aislados activos.
- b) Evaluar la estabilidad físico-química en el extracto crudo con actividad bacteriocinogénica y determinar su actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas productoras de ETA's y fitopatógenos.
- c) Identificar el aislado productor de bacteriocina mediante la secuenciación del gen 16S ARN ribosomal.

V. METODOLOGÍA

V.1. Selección de Aislados Antimicrobianos.

V.1.1 Cepas y Condiciones de Cultivo.

Los aislados crioconservados que fueron obtenidos de frutas, utilizados en este estudio fueron provistos por el laboratorio de Fisiología Vegetal de CIAD A.C. Se seleccionaron 369 aislados de mesófilos, psicrótrofos y coliformes que habían presentado antagonismo contra *Salmonella* Saintpaul, durante su evaluación en el 2013. Como cepa indicadora se seleccionó *Salmonella* Saintpaul, la cual fue donada por la Universidad de Texas A&M. *Lactobacillus animalis* se utilizó como control positivo en la producción de bacteriocina. Todas las bacterias fueron almacenadas en caldo de cultivo con 20 % de glicerol a -80° C hasta su uso. El total de los aislados fueron cultivados en caldo soya tripticasa (TSB) (BD Difco) y agar soya tripticasa (TSA). Mientras que *S. Saintpaul* se cultivó en agar XLD y *L. animalis* en caldo o agar MRS (Ndlovu et al., 2015).

V.1.2 Evaluación de Actividad Antimicrobiana célula-célula.

La actividad antimicrobiana se detectó mediante el método de gota en agar (Schillinger y Lucke, 1989). Se colocó un microlitro (1 µL) de cultivo de 18 horas de cada uno de los aislados sobre agar soya tripticasa (TSA) y se incubaron a 35° C por 24 horas. Se inocularon 10 mililitros de agar suave soya

tripticosa (0.4%) con 1 mL a una concentración de 1×10^{-2} UFC/mL de *Salmonella* Saintpaul (aprox.0.07 log UFC/mL), dicha mezcla se utilizó como recubrimiento sobre los aislados de 24 horas. Las placas se incubaron a 35° C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, las placas fueron examinadas en busca de zonas claras indicadoras de inhibición alrededor de cada colonia, lo cual podría indicar la producción de bacteriocinas. Los aislados que mostraron actividad antimicrobiana contra la cepa indicadora fueron elegidos para la evaluación de mecanismos antimicrobianos.

V.5 Obtención de Extractos Concentrados.

V.2.1 Obtención de Extractos Crudos.

La extracción de bacteriocinas se realizó por el método de Schillinger y Lucke (1989) con modificaciones de Chaimanee et al. (2009). Se realizó un cultivo inicial de la cepa productora la cual fue sembrada en medio TSB durante 24 horas a 35° C, a su vez se realizaron cultivos de 24 horas de la cepa control *L. animalis*. Posteriormente se llevó a cabo la centrifugación del cultivo bacteriano a 8000 rpm a 4 °C (Saiqa et al., 2016) en el equipo SORVALL- RC 5C Plus, con la finalidad de obtener el sobrenadante libre del paquete celular. Una vez separadas las células, se tomó el sobrenadante como el extracto crudo de bacteriocinas (Callewaert et al. 1999).

V.2.2 Concentración de Extractos Crudos por Liofilizado.

Los extractos crudos fueron congelados a -80°C, procediéndose al liofilizado de los extractos en el equipo FreeZone 4.5 de LABCONCO®. Las muestras fueron retiradas del equipo hasta observar ausencia total de agua en las muestras. Una vez obtenidos los extractos liofilizados se almacenaron a -80°C hasta su uso (Jian

y Nail, 1998). Al momento de resuspenderse los extractos fueron esterilizados por filtros de poro 0.22 μ m (Delgado et al., 2001).

V.3 Eliminación de Metabolitos Antagónicos no Proteicos.

Para determinar el mecanismo por el cual las bacterias ejercen su efecto antagónico se tomaron los extractos y se les ajustó el pH a 7 para la neutralización de los ácidos orgánicos, posteriormente se les agregó catalasa para eliminar el peróxido de hidrógeno (1mg/mL) (Ogunbanwo et al., 2003). La determinación consistió en evaluar el extracto crudo sin modificaciones, el extracto a pH 7, el extracto con catalasa, y el extracto a pH 7 con catalasa.

La evaluación de los extractos se realizó mediante la técnica de pocillo en placa de Mayr-Harting y colaboradores (1972), utilizándose un inóculo de 1 mL a 1×10^{-2} de *Salmonella* Saintpaul en 20 mL de TSA. Se colocaron 50 μ L de extracto en cada pocillo de 7mm de diámetro. Las placas se incubaron a 4°C por 24 horas y posteriormente 24 horas a 35°C. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. La actividad fue medida según los milímetros de la zona de inhibición excluyendo el diámetro del pocillo.

V.4 Estabilidad Físico-Química de la Bacteriocina.

V.4.1 Evaluación de Estabilidad Térmica.

Con la finalidad de probar la resistencia térmica de la bacteriocina, se tomaron alícuotas de 300 μ L del extracto concentrado, los cuales se expusieron a -80, -20, 4, 40, 60, 80 °C, durante 30 min, así como a un ciclo de autoclave (121° C/15 psi) durante 15min. Pasado el tiempo establecido, se tomaron los purificados en suspensión y se evaluó su actividad inhibitoria frente a *S. Saintpaul*, esto mediante la técnica de pocillos en agar TSA, aplicando 50 μ L de bacteriocina en

cada pocillo. Finalmente se tomó lectura de los halos de inhibición a las 24 horas. El procedimiento se realizó por triplicado.

V.4.2 Evaluación del pH sobre la Estabilidad Proteica.

Según el método descrito por Karaoglu y colaboradores (2003), el extracto concentrado de bacteriocina fue expuesto a pH's que variaron de 3 a 10. Los ajustes se realizaron con soluciones de NaOH 1N y HCl 1N. La solución de bacteriocina expuesta a los distintos pH se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas y ajustado a 6 posteriormente para su evaluación. Finalmente fue evaluado mediante la técnica de pocillos en agar descrita anteriormente.

V.4.3 Estabilidad ante Tratamiento Enzimático.

La acción de las enzimas proteolíticas y lipolíticas fue probada sobre el extracto, aplicando proteasa, lipasa (bacteriana), proteinasa K (fúngica) y tripsina (de origen animal). Se prepararon soluciones de cada enzima a 1 mg/mL. El tiempo de exposición fue de 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió con la evaluación por la técnica de pocillos en agar (Sheikh et al., 2009).

V.4.4 Estabilidad ante Solventes Orgánicos, Sales Metálicas y Surfactantes.

Los efectos de los surfactantes fueron evaluados mediante la adición de SDS, Tween 20, Tween 80 y EDTA. Éstos se utilizaron a concentración final 0.5% v/v a excepción del EDTA que se utilizará a 5 mM (Rasool y Sehar, 2013).

Para la evaluación de solventes orgánicos se utilizaron acetona, butanol, cloroformo, etanol, metanol y propanol. A una concentración final de 5.0%. Por otro lado se evaluó el efecto de la exposición de la bacteriocina ante sales

metálicas como BaCl₂, CdCl₂, CuSO₄, CsCl₂, FeSO₄, MgSO₄, MnCl₂, NiSO₄ y ZnSO₄. Para ésta evaluación se aplicaron 100 µL de cada sal (2 mM) sobre 100 µL del purificado parcial de la bacteriocina, utilizándose para la evaluación la prueba de pocillos en agar (Sheikh et al, 2009).

V.5 Actividad Antimicrobiana Contra Patógenos Productores de ETA's y Fitopatógenos.

Se evaluó la actividad del extracto contra *Salmonella* Typhimurium ATCC CDC-10, *Salmonella* Typhi ATCC CDC-99, *Salmonella choleraesuis* ATCC 13312, *E. coli* O157:H7, *Erwinia carotovora* ATCC 2345, y *Saccharomyces pastorianus* ATCC 15713. La actividad del extracto se llevó a cabo por la técnica de pocillo en placa previamente descrita en el apartado 5.3 utilizándose un inóculo de 1 mL a 1×10^{-2} de cada uno de los patógenos evaluados. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. La actividad fue medida según los milímetros de la zona de inhibición excluyendo el diámetro del pocillo.

V.6 Cuantificación de Proteína.

Se utilizó el juego de reactivos comerciales para el método de Bradford. La técnica se desarrolló según lo indicado por el fabricante (BioRad). Se realizó una curva con albumina para la cuantificación proteica de las muestras (extracto de *L. graminis*, extracto de *L. animalis* y extracto de caldo puro). La curva se graficó en base a seis diluciones y las muestras se analizaron en una dilución 1:10 por triplicado. Las mediciones se llevaron a cabo en el espectrofotómetro BioSpec.1601 DNA/PROTEIN/ENZYME Analyzer Shimadzu® a 595 nm.

V.7 Identificación Molecular del Aislado Bacteriocinogénico.

Se preparó un cultivo puro en placa con el fin de obtener ADN genómico del aislado con el kit de purificación QIA amp DNA. El gen 16S rADN se amplificó mediante PCR punto final utilizando los oligonucleótidos específicos, sentido: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'); y tres oligonucleótidos antisentido: 1301 (5'-TACTAGCGATTCCGACTTC -3'). De forma seguida se preparó la mezcla de la reacción compuesta por templado de ADN (100 ng/13.1 μ L), 1.5 μ L de cada primer, 18.64 μ L de agua y 16.75 μ L de master mix Taq. La amplificación se realizó usando el termociclador (Perkin-Elmer P15389, N.J.) con una desnaturalización inicial a 95°C por 5min, desnaturalización a 95°C por 1 min, hibridación a 55°C por 1 min, extensión de 72°C por 2 min, extensión final a 72° por 10 min y conservación a 4°C.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis horizontal (SCIENTIFIC COMPANY, INC.) en gel agarosa (SIGMA, St. Louis MO) al 1% por 1 hora y 60 volts constantes (BIO-RAD Power Pac 300). Se tiñeron en Gel Red (BIOTIUM), y se observaron en un transiluminador UV (UVP) y se documentaron con un equipo digital Kodak Gel Logic 100. Los productos de amplificación se purificaron con un juego de reactivos comerciales ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) y se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. (Seul. Korea).

V.9. Análisis Estadístico

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Los resultados mostrados en las tablas representan los valores medios con su respectiva desviación estándar. Para el análisis de efecto inhibitorio de la bacteriocina sobre los distintos patógenos y fitopatógenos así como para la comparación de medias inhibitorias entre extractos de 24 y 48 horas, se aplicó un diseño completo al azar

con un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, estableciendo diferencias significativas con una $P \leq 0.05$ por medio de la prueba de Tukey. El análisis de datos se realizó en el paquete estadístico NCSS 2007.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Evaluación de la Capacidad Bacteriocinogénica.

De los 369 aislados seleccionados por haber presentado antagonismo contra *Salmonella* Saintpaul y *E. coli* en la temporada 2013, 49 mantuvieron la actividad antagónica contra *Salmonella* Saintpaul después de dos años de criopreservación (Tabla 4), con halos de inhibición entre 1.2mm y 3.5mm. Este número de aislados representa el 13.85% del total de aislados evaluados. De este resultado, es notorio el bajo porcentaje de aislados que mantuvieron la actividad antagónica después de la crioconservación por dos años, y aunque pueden ser muchos los factores que afecten a las bacterias crioconservadas, la razón más destacada es un posible cambio genético en los aislados, ya que el estrés que provoca a las bacterias la crioconservación, conlleva a cambios fenotípicos y genotípicos en el cual se haya suprimida la producción de metabolitos secundarios de actividad antimicrobiana (Sánchez et al., 2005).

El estrés provocado a las bacterias por la crioconservación, es una situación que condiciona cambios de adaptación en la bacteria, normalmente este es un estado transitorio que le permite tener condiciones de resistencia a la hostilidad, situación que finaliza cuando las condiciones de estrés se eliminan (Alexandre et al., 2003). Uno de los mayores problemas a los que puede llevar este estrés es generar cambios que pueden ser permanentes en su actividad enzimática y capacidad antagónica (Sánchez et al., 2005).

Otra razón a la pérdida de actividad independiente a la criopreservación, es la inactivación de genes que controlan la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos por la falta de estímulo, previamente observado en algunas bacterias (Bainton et al., 1992; Williamson et al., 2006; Lu et al., 2016).

Tabla 4. Aislados que mantuvieron la actividad antagonista contra *Salmonella Saintpaul* después de dos años de crioconservación. Medición de halos de inhibición de los 49 aislados sobre la cepa indicadora en el ensayo célula-célula.

# Aislado	mm de inhibición	±DS	# Aislado	mm de inhibición	±DS
1	28.33	1.52	26	20.33	0.57
2	15	1	27	15.33	0.57
3	16	0	28	14.66	0.57
4	27	1.73	29	21.66	0.57
5	14.33	0.57	30	15.66	1.15
6	19.33	1.15	31	24.33	0.57
7	15.33	0.57	32	22.33	0.57
8	19	1.73	33	25	0
9	19	1.73	34	22.66	2.30
10	14.66	0.57	35	23	1.73
11	14.33	1.15	36	20.33	0.57
12	22.66	0.57	37	15.33	0.57
13	27.66	0.57	38	26	2
14	20.33	0.57	39	21.33	0.57
15	13	0	40	23	0
16	20.33	0.57	41	13.33	0.57
17	17	1.73	42	16.33	0.57
18	15	2	43	15.33	1.15
19	12.66	0.57	44	14.66	1.15
20	12.33	0.57	45	15.33	1.15
21	14.66	1.15	46	18	0
22	15.33	1.15	47	21	0
23	20.33	2.30	48	16	0
24	20.66	0.57	49	16	3.46
25	15	0			

Los 49 aislados bacterianos que mantuvieron la actividad antagónica, se utilizaron para obtener extractos crudos, que consistieron en el sobrenadante libre del paquete celular. Cada extracto crudo, se llevó a sequedad mediante la liofilización, con el propósito de mantener la actividad de la bacteriocina, ya que este método es uno de los mejores para conservar proteínas (Prestrelsky et al., 1993) y se ha demostrado que previene la pérdida de actividad o disminución de la estabilidad de la bacteriocina (Moreira, 1993).

En razón de que los aislados que mantuvieron la actividad antagónica contra *S. Saintpaul* resultaron ser bacterias ácido lácticas, un paso esencial para la identificación de actividad por bacteriocinas residió en la neutralización de pH a los extractos con el propósito de inactivar a los ácidos orgánicos, como el ácido láctico y acético que pueden presentar actividad antibacteriana (Settanni et al., 2015).

Como resultado de la neutralización de pH en los extractos crudos, el 91.9% de los aislados con capacidad antagonista, no presentó actividad inhibitoria. El 8.1% de los aislados restantes, representados por 4 aislados de los cuales, dos disminuyeron su actividad hasta en un 90% después de adicionarles catalasa 1mg/mL (Ogunbanwo et al., 2003) para eliminar el peróxido de hidrógeno, el cual también tiene un efecto antimicrobiano (Corsetti y Settani, 2008; Todorov et al., 2015; Zbrun et al., 2013). Como resultado dos aislados presentaron actividad bacteriocinogénica, después del proceso de inactivación de peróxido de hidrógeno y neutralización de ácidos.

VI.2 Selección de Cepa Bacteriocinogénica.

En la Tabla 5 se muestran los valores de los halos de inhibición que presentaron los extractos crudos de los dos aislados con actividad bacteriocinogénica contra *S. Saintpaul*. Con este resultado, se seleccionó el aislado 1 (A1) ya que presentó

el halo de inhibición mayor para continuar con la evaluación de la estabilidad físico química.

Tabla 5. Aislados con actividad inhibitoria contra *Salmonella Saintpaul* mediada por bacteriocinas.

Aislado	Halo de inhibición (mm)	±DS
A1	27.66	0.57
A2	20.33	0.57

Con el propósito de determinar el tiempo de incubación al cual el aislado produjo la mayor concentración de bacteriocinas, se evaluaron tiempos de incubación de 24 y 48 horas. En la Tabla 6 se muestra los resultados de esta evaluación donde se observa que la actividad inhibitoria del A1 fue estadísticamente similar a las 24 y 48 horas, lo que podría sugerir que la cantidad de bacteriocinas activas se mantuvo constante. También se observó que A1 presentó una actividad inhibitoria mayor que la cepa control *L. animalis* ($P \leq 0.05$) en ambos tiempos de muestreo.

Tabla 6. Actividad bacteriocinogénica de extractos obtenidos de A1 y *L. animalis* a las 24 y 48 horas. Los valores representan los valores medios de tres repeticiones ± desviación estándar.

Extracto	Actividad inhibitoria (mm)	± DS
<i>L. animalis</i> 24 hrs	17 ^c	0
<i>L. animalis</i> 48 hrs	23 ^b	0
A1 24 hrs	28 ^a	0
A1 48 hrs	28 ^a	0

*Las literales indican una diferencia con una $P \leq 0.05$.

La diferencia entre las actividades inhibitorias de los extractos de A1 y *L. animalis*, obtenidos a distintas horas, está relacionado con las fases de crecimiento propias de cada bacteria, ya que se ha observado que la recolección de los sobrenadantes debe realizarse tomando en cuenta la fase de crecimiento (Yang y Ray 1994).

La producción de la bacteriocina de *L. animalis* coincide con su fase logarítmica, continuando durante su fase logarítmica tardía, razón por la que mantiene una producción a las 48 horas (Degnan et al., 1992). Otros autores han reportado la producción de bacteriocinas durante la fase exponencial tardía y una máxima producción durante su fase estacionaria, seguida de un decremento en la actividad durante las siguientes 16 horas (Liu et al., 2015). El decremento en la actividad antimicrobiana que se observa después de una incubación prolongada puede ser debida a la degradación de las bacteriocinas por enzimas proteolíticas presentes en el medio (Sivaramasamy et al., 2014).

Está reportado que las condiciones óptimas para el desarrollo bacteriano y secreción de bacteriocinas varían de manera drástica entre bacterias del mismo género (Castillo-Martínez et al., 2013). En base a este resultado, se seleccionó el extracto de 24 horas de crecimiento del A1 para las pruebas de estabilidad físico-química y las evaluaciones de inhibición del crecimiento contra bacterias patógenas y fitopatógenas.

Antes de continuar con las evaluaciones, se determinó la concentración proteica del extracto crudo tanto del A1 como de la cepa control. El análisis arrojó una concentración de 178.75 mg de proteína/mL en el extracto crudo de A1, el cual demostró una mayor inhibición del desarrollo de *S. Saintpaul*, a pesar de que el extracto de 24 horas de *L. animalis* presentó una mayor concentración de proteína (601.24 mg/mL). La actividad inhibitoria no puede ser extrapolada de forma proporcional según la producción proteica entre distintas bacterias, ya que esta actividad dependerá de la naturaleza de la bacteriocina misma, según sus

características moleculares que le provean afinidad y condiciones ideales (Chen et al., 1997; Ishizaki et al., 2000).

Chen y colaboradores (1997) encontraron que la composición lipídica de la membrana blanco es un factor determinante para la modulación de la acción de pediocina PA-1, particularmente la afinidad de esta bacteriocina por las vesículas lipídicas aumenta con el aumento de su contenido de lípidos aniónicos. También se ha encontrado que la afinidad de unión de algunas bacteriocinas a las membranas diana está determinada por el pH. Por ejemplo, se ha demostrado que la disminución del pH de 7.5 a 6.0 mejora la unión y permeabilización de la Pediocina PA-1 (Chen et al., 1997). Por otra parte, la formación de poros por bavaricina MN es óptima a pH 6.0 y menos eficiente a otros valores de pH (Kaiser y Montville, 1996). Ciertas bacteriocinas de carga neta positiva tiene mayor facilidad para adherirse a los grupos fosfato de la cabeza de fosfolípidos cargados negativamente (Ishizaki et al., 2000).

VI .3 Estabilidad Físico-Química.

VI.3.1 Resistencia Térmica.

La actividad de la bacteriocina de A1 no disminuyó de forma significativa después de su exposición a los tratamientos térmicos, manteniendo en todos ellos una actividad superior al 90% (tabla 7). Generalmente las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son termo resistentes. Esto indica que su actividad puede recaer en estructuras pequeñas y poco complejas, con una alta probabilidad de carecer de una estructura terciaria (Sen y Nilsson 2012; Moreira 1993). No obstante los criterios de termoestabilidad de las bacteriocinas son difíciles de definir, pues dependen de su purificación y de factores tales como pH, fuerza iónica y presencia de moléculas protectoras (Moreira, 1993).

Tabla 7. Evaluación de la estabilidad térmica de la bacteriocina producida por el aislado 1.

Temperatura	Resistencia
- 80°C (30min)	++++
4 °C (30 min) *	++++
40°C (30 min)	++++
60°C (30 min)	+++
80°C (30 min)	+++
115°C (psi, 15 min)	+++

* Indica la condición de temperatura control. ++++ 95 - 100% de actividad con respecto al control positivo, +++ 85 - 94% de actividad con respecto al control positivo.

VI.3.2 Estabilidad a Distintos pH

La bacteriocina producida por A1 presentó una estabilidad en un rango de pH de 3-7 (Tabla 8), con una notable disminución hasta de un 66% en la actividad inhibitoria sobre la cepa indicadora, al exponerla a un pH mayor. Este resultado coincide con los trabajos reportados para las bacteriocinas producidas por aislados de *Lactobacillus sp.*, *L. curvatus*, *L. graminis* y *Staphylococcus warneri*, donde la estabilidad de todas las bacteriocinas mostraró sensibilidad a pH superiores a 8, mientras que resistió a pH 5 y 6 (Saiqa et al., 2016). De la misma manera Avaiyarasi y colaboradores (2016) trabajaron con la bacteriocina GM3 de *L. sakei*, la cual se encontró con actividad después de ser expuesta a un rango de pH 2 hasta pH 10, aunque se observó una disminución en la actividad a pH 8, 9 y 10. Lo anterior sugiere que las bacteriocinas son más tolerantes a los pH ácidos que a los alcalinos. Excepcionalmente, se han reportado la existencia de bacteriocinas que presentan estabilidad hasta pH de 10, como la laterosporulina secretada por *Brevibacillus sp.* GI-9 (Korpole et al., 2012).

Tabla 8. Evaluación de la estabilidad de la bacteriocina producida por el aislado 1 a distintos pH.

pH	Resistencia
3	++++
4	++++
5	++++
6	++++
7 *	++++
8	+
9	+
10	+

* Indica el pH del extracto control. ++++ 95 – 100 % de actividad con respecto al control positivo; + 33 – 49 % de actividad con respecto al control positivo

VI.3.3 Estabilidad Enzimática.

La bacteriocina producida por el A1 no resultó afectada después de la acción de enzimas como lipasa, proteasa, tripsina y proteinasa K (Tabla 9), pues mantuvo la efectividad para inhibir el crecimiento de *S. Sainpaul* (Figura 1). Este resultado es contrario a lo que esperábamos, ya que para utilizar bacteriocinas en alimentos, éstas deben inactivarse al menos por un enzima proteolítica, dentro de las que se pueden mencionar las de origen pancreático (tripsina y alfa-quimiotripsina) y gástrico (pepsina) (Moreira, 1993). La hidrólisis por alguna de estas enzimas pudiera inactivar la bacteriocina durante su paso por el tracto gastrointestinal, sin ser absorbidos como compuestos activos y sin causar efectos secundarios; requisito para considerar a estos metabolitos bacterianos sustancias seguras para ser incluidas como biocontrol en los alimentos (Vásquez et al., 2008).

Se ha reportado que enzimas hidrolíticas pueden mermar la actividad de diversas bacteriocinas. La bacteriocina GM3 producida por *Lactobacillus sakei* pierde

actividad después de ser expuesta a las enzimas pepsina, papaína y proteinasa K (Avaiyarasi et al., 2016); La bacteriocina producida por *Lactobacillus paracasei* subsp. Tolerans, disminuye su actividad inhibitoria sobre *E. coli* al ser expuesta a pepsina y tripsina, sin llegar a inactivarse. Es importante tomar en cuenta que el rol de las modificaciones post-traduccionales aún se desconoce, y es probable que estas modificaciones le provean resistencia a enzimas endógenas, lo que podría aumentar su estabilidad (Cao et al., 2014).

La estabilidad a enzimas digestivas que presentó la bacteriocina de A1 podría representar una limitante en la aplicación de este producto como biocontrol en superficie de alimentos de consumo fresco. Sin embargo hay muchas otras enzimas digestivas que podrían ser evaluadas en busca de una que sea capaz de inactivar esta bacteriocina. Aún con este resultado, la bacteriocina del A1 sigue representando una alternativa factible para su aplicación en campo, en el control de bacterias fitopatógenas.

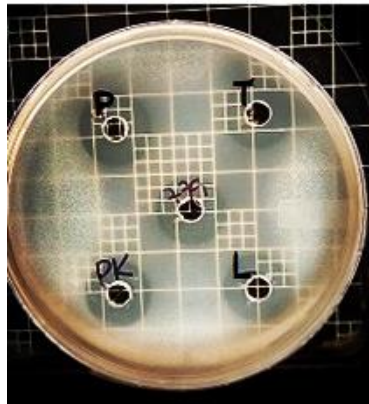


Figura 1. Efecto de los tratamientos enzimáticos sobre la actividad bacteriocinogénica del extracto de A1 sobre *Salmonella Saintpaul*. Pocillo P: bacteriocina + proteasa; pocillo T: bacteriocina + tripsina; pocillo pK: bacteriocina + proteinasa K; pocillo L: bacteriocina + lipasa y pocillo 779: extracto de bacteriocina sin tratamiento.

Tabla 9. Estabilidad de la bacteriocina producida por el aislado 1 tratado con distintas enzimas hidrolíticas.

Enzimático	Halo de inhibición	
	Control negativo (solo sal)	Tratamiento (extracto + sal)
Proteasa	-	++++
Proteinasa K	-	++++
Lipasa	-	++++
Tripsina	-	++++

++++ 95 – 100 % de actividad con respecto al control positivo
 - Halo de inhibición no observado

VI.3.4 Estabilidad ante Surfactantes.

La actividad de la bacteriocina producida por A1, no fue alterada por el contacto con los surfactantes evaluados que se muestran en la Tabla 10. Este resultado concuerda con reportes que especifican que las bacteriocinas son capaces de mantener su actividad, incluso después de adicionar distintos surfactantes a los extractos. Se ha reportado que la estabilidad ante surfactantes de las bacteriocinas producidas por *Bacillus subtilis* KKU213 (Kochamit et al., 2015) y *Agrobacterium radiobacter* NA6 (Sheikh et al., 2009) es similar. La estabilidad en surfactantes es una propiedad deseada para formar emulsiones y permitir la preparación de distintas formulaciones para protección de cultivos o para el revestimiento de alimentos frescos, para lo cual se debe cumplir con los requerimientos de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) (Farn, 2006).

Tabla 10. Resultados de exposición de la bacteriocina producida por el asilado 1 a distintos surfactantes.

Tratamiento	Zona de inhibición	
	Control negativo (solo sal)	Tratamiento (extracto + sal)
Surfactantes		
SDS	-	++++
Tween20	-	++++
Tween80	-	++++
EDTA	-	++++

++++ 95 – 100 % de actividad con respecto al control positivo
 - Halo de inhibición no observado

VI.3.5 Estabilidad ante Solventes.

La estabilidad de la bacteriocina del A1, no fue afectada por los distintos solventes, como se muestra en la Tabla 11 y Figura 2. Este resultado es concordante con lo reportado para la bacteriocina agrocina NA6 producida por *Agrobacterium radiobacter* NA6, que es afectada por solventes como X, Y y Z (Sheikh et al., 2009).

Tabla 11. Evaluación de la exposición de la bacteriocina producida por el aislado 1 a solventes orgánicos.

Tratamiento	Zona de inhibición	
	Control negativo (solo sal)	Tratamiento (extracto + sal)
Metanol	-	++++
Etanol	-	++++
Propanol	-	++++
Butanol	-	++++
Acetona	-	++++
Cloroformo	-	++++

++++ 95 – 100 % de actividad con respecto al control positivo
 - Halo de inhibición no observado

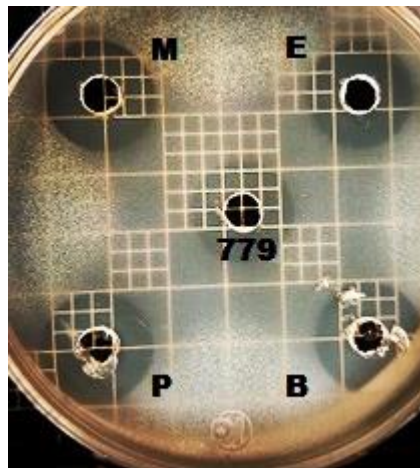


Figura 2. Efecto de los tratamientos con solventes sobre la actividad bacteriocinogénica del extracto de A1 sobre *Salmonella* Saintpaul. Pocillo M: bacteriocina + metanol; pocillo E: bacteriocina + etanol; pocillo P: bacteriocina + propanol; pocillo B: bacteriocina + butanol y pocillo 779: extracto de bacteriocina sin tratamiento.

VI.3.4 Estabilidad ante Sales Metálicas

La bacteriocina en estudio no fue afectada por la exposición a metales pesados, como se observa en la Tabla 12. Únicamente el $MnCl_2$ pudo disminuir levemente la actividad inhibitoria sobre la cepa indicadora. Este resultado está de acuerdo con lo reportado para la bacteriocina producida por *Bacillus subtilis* KKU213, cuya actividad resistió el tratamiento con metales pesados ($CdCl_2$, $CuSO_4$, $FeCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $NiSO_4$ y $ZnCl_2$) (Kochamit et al., 2015). También los resultados presentados por Sheikh y colaboradores (2009) indican que la bacteriocina producida por *Agrobacterium radiobacter* NA6 es estable ante las mismas sales metálicas evaluadas en nuestro estudio. Estos mismos autores reportaron que la solución de $CdCl_2$ tiene por sí misma un efecto antagónico sobre *Agrobacterium tumefaciens* B6 y un efecto sinérgico con la bacteriocina NA6; a su vez se observó un ligero decremento en la actividad ocasionado por $MnCl_2$, $NiSO_4$ y $ZnSO_4$. Esto indica una variación de respuesta que depende de la bacteria que se desee inhibir, y de la naturaleza de cada bacteriocina (Sheikh et al., 2009).

El mantenimiento de la actividad bacteriocinogénica del extracto crudo producido por A1 (Figura 3) ante los distintos metales pesados que se evaluaron, indica la estabilidad que puede presentar al ser expuesta a ellos por contaminaciones de metales introducidos a través de suelos, aguas y equipos durante la elaboración de alimentos procesados.

Tabla 12. Resultados de exposición de la bacteriocina producida por el aislado 1 a sales metálicas.

Tratamiento	Zona de inhibición	
	Control negativo (solo sal)	Tratamiento (extracto + sal)
Sales metálicas		
BaCl ₂	-	++++
CdCl ₂	-	++++
CuSO ₄	-	++++
FeSO ₄	-	++++
MgSO ₄	-	++++
MnCl ₂	-	+++
NiSO ₄	-	++++
ZnSO ₄	-	++++

++++ 95 - 100% de actividad con respecto al control positivo
 - No muestra halo de inhibición

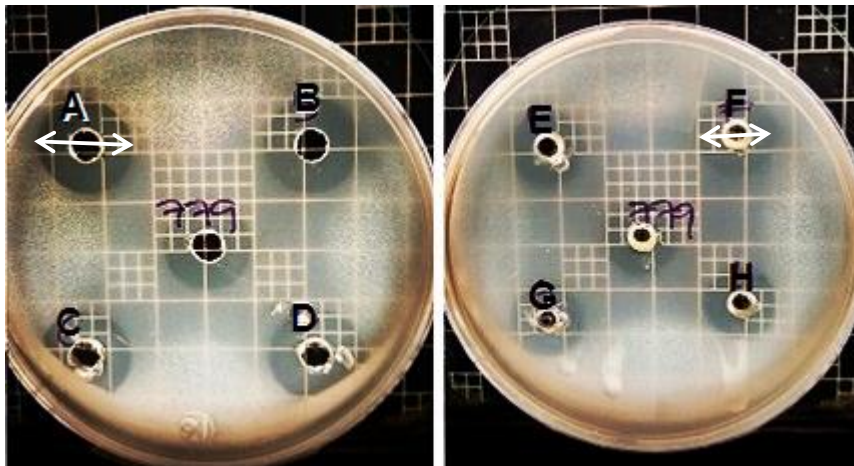


Figura 3. Efecto de los tratamientos con sales metálicas sobre la actividad bacteriocinogénica del extracto de A1 sobre *Salmonella* Saintpaul. Pocillo A: bacteriocina + BaCl₂; pocillo B: bacteriocina + CdCl₂; pocillo C: bacteriocina + CuSO₄; pocillo D: bacteriocina + CsCl₂; pocillo E: bacteriocina + FeSO₄; pocillo F: bacteriocina + MgSO₄; pocillo G: bacteriocina + MnCl₂; pocillo H: bacteriocina + NiSO₄ y pocillos 779: extracto de bacteriocina sin tratamiento.

VI.5 Inhibición de Bacterias Patógenas y Fitopatógenas

El extracto crudo y concentrado producido por A1 a las 24 horas presentó una actividad inhibitoria sobre *Salmonella* Saintpaul, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* choleraesius, *E. coli* O:157 H7 y *Erwinia carotovora*, más no produjo inhibición alguna sobre *Saccharomyces pastorianus* (Tabla 13).

Tabla 13. Actividad antimicrobiana sobre bacterias patógenas y fitopatógenas por efecto de bacteriocina producida por el aislado 1.

Cepa indicadora	Actividad inhibitoria (mm)	± DS
<i>Salmonella</i> Saintpaul	28 ^a	0.57735
<i>Salmonella</i> Typhi	28 ^a	0.57735
<i>Salmonella</i> Typhimurium	27.66667 ^a	0.57735
<i>Salmonella</i> choleraesius	27.66667 ^a	0.57735
<i>E. coli</i> O157:H7	27.33333 ^a	0.57735
<i>Erwinia carotovora</i>	26.66667 ^b	0.57735
<i>Saccharomyces pentosaseus</i>	0 ^c	0

*Las literales indican una diferencia con una $P \leq 0.05$.

Dentro de las evaluaciones que se han realizado en los estudios de otras bacteriocinas se ha detectado la actividad inhibitoria de *Salmonella enterica* y *E. coli* (Sivaramasamy et al., 2014), por la bacteriocina producida por *Lactobacillus coryniformis* XN8, con halos de inhibición de 19 y 25mm, respectivamente. Por otro lado Avaiyarasi y colaboradores (2016) encontraron diferencias entre la inhibición de *Salmonella enterica* MTCC 3219 y *Salmonella typhi* MTCC 734 por efecto de la bacteriocina producida por *Lactobacillus sakei* GM3, que discrepan con nuestros resultados, donde no se muestran diferencias ($P \leq 0.05$) entre los distintos serotipos de *Salmonella* por la bacteriocina producida por A1. Aunque la actividad de las bacteriocinas sobre los patógenos *E. coli* y *Salmonella*

podrían parecer comunes, no todas las bacteriocinas son capaces de controlar el desarrollo de estos patógenos. Tal es el caso de la bacteriocina producida por *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* CICC 6165, la cual fue incapaz de inhibir *S. enterica* subsp. *enterica* y de igual manera contra dos cepas *E. coli* CTCC (Pei et al., 2013).

Dentro de los pocos estudios realizados en la búsqueda de bacteriocinas como biocontrol sobre fitopatógenos, se encuentra la evaluación de una bacteriocina producida por *Bacillus subtilis* DJM.51, la cual inhibe a *Erwinia carotovora*. Al igual que agrocina NA6 producida por *Agrobacterium radiobacter* NA6 la cual no tuvo actividad sobre *Erwinia carotovora* NA5 y NA8 (Sheikh et al., 2009). Jabrane y colaboradores (2002) comprobaron la inhibición del crecimiento de *Erwinia amylovorus* por efecto de serracina P, producida por *Serratia plymithicum* J7.

En contra parte, a diferencia de los resultados de actividad sobre los distintos serotipos de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7, los trabajos de Sheikh y colaboradores (2009) así como de Jabrane y colaboradores (2002) demuestran un efecto limitado en donde se ve afectada *Erwinia* mas no *Salmonella* y *E. coli*. Lo que indica una ventaja de la bacteriocina de A1, que posee la capacidad de inhibir tanto bacterias productoras de ETA's como fitopatógenas (Figura 4).

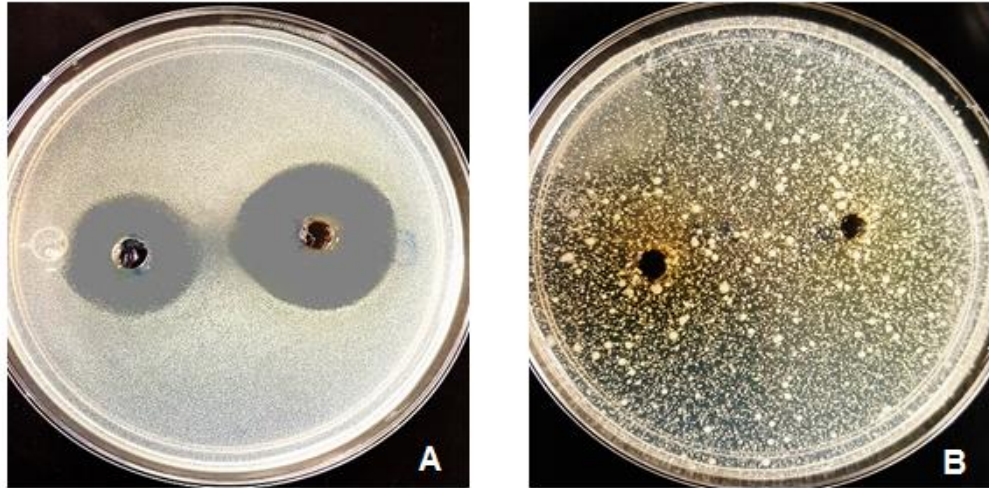


Figura 4. Actividad de la bacteriocina producida por A1 sobre *Salmonella Typhi* y *Saccharomyces pastorianus*. A: cultivo de *S. Typhi*, el pozo izquierdo contiene el control (*L. animalis*), el pozo derecho contiene el extracto de A1. B: cultivo de *S. pastorianus*, los extractos igual que en A.

El efecto antimicrobiando de A1, indican un espectro de actividad bacteriocinogénica sobre bacterias Gram negativas y una actividad nula sobre levaduras. La inhibición total del crecimiento de *E. carotovora* y del resto de los patógenos, representa la posibilidad de una alternativa de biocontrol para frutos y hortalizas así como para el control de enfermedades bacterianas en plantas.

VI.6 Identificación Molecular del Aislado Productor de la Bacteriocina

En la Figura 5 se observa una banda cercana a los 1500pb, que corresponde al tamaño esperado para el amplicón del gen 16S ribosomal con el que fue posible su identificación molecular. El análisis de la secuencia de las bases del gen 16D ribosomal de A1 presentó un 99% de similitud al de *Lactobacillus graminis* reportado en la base de datos de genes del NCBI, donde hasta la fecha solo existe reportado el genoma de *Lactobacillus graminis* DSM 20719 NODE_43 (NCBI, 2016). El análisis de comparación de secuencias también indicó una

similitud de 98% a *Lactobacillus curvatus*. Con este resultado inferimos que A1 es *L. graminis*.

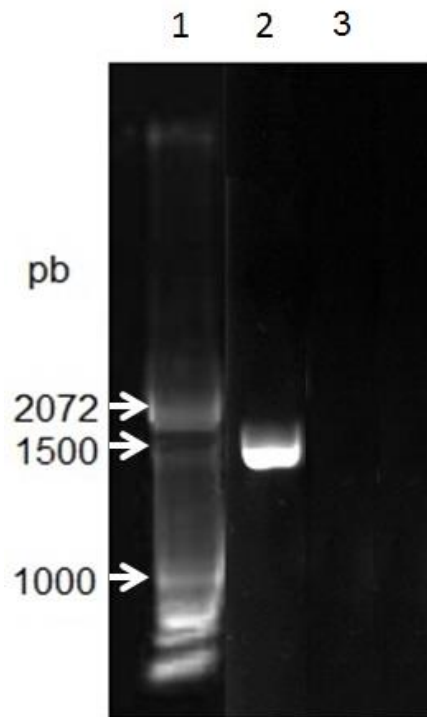


Figura 5. Amplificación del gen 16S ribosomal por PCR del aislado bacteriocinogénico. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, carril 2 se encuentra el producto de amplificación del ADN de A1 y en el carril 3 se encuentra el control negativo.

VII. CONCLUSIÓN

El 13.85 % de los aislados criopreservados mantuvieron su actividad antimicrobiana después de dos años de almacenamiento en caldo y glicerol al 20%. El 0.55% de los aislados crioconservados posee actividad bacteriocinogénica. Uno de estos aislados se identificó como *L. graminis* que produce una bacteriocina estable ante distintos factores físicos y químicos como: solventes, metales, surfactantes, a temperaturas extremas e hidrólisis por enzimas proteolíticas. Además es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas productoras de ETA's y fitopatógenas, representando una potencial alternativa de biocontrol bacteriano.

VIII. REFERENCIAS

- Andrade-Bustamante G. 2014. Aislamiento e Identificación de bacterias psicrótrofas con actividad antagonista contra *Salmonella* Saintpaul y *E. coli* O157:H7 en cilantro (*Coriandrum sativum* L.). Maestría en Ciencias, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. 56p.
- Alexandre G., Greer S. y Zhulin I. 2003. Ecological role of energy taxis in microorganisms. *Microbiology Reviews*. 28:113-126.
- Arispe I. y Soledad T.M. 2007. Inocuidad y Calidad: Requisitos Indispensables para la Protección de la Salud de los Consumidores. *Agroalimentaria*. 24:105-117.
- Avaiyarasi N. D., Ravindran A. D., Venkatesh P. y Arul V. 2016. In vitro selection, characterization and cytotoxic effect of bacteriocin of *Lactobacillus sakei* GM3 isolated from goat milk. *Food Control*. 69:124-133.
- Aymerich M.T., Hugas M. y Monfort J.M. 1998. Review : Bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products *Food Science and Technology International*. 4:141-158.
- Bainton N. J., Bycroft B. W., Chhabra S. R., Stead P., Gledhill L., Hill P. J., Rees C. E. D., Winson M. K. y Salmond G. P C. 1992. A general role for the *lux* autoinducer in bacterial cell signalling: control of antibiotic biosynthesis in *Erwinia*. *Gene*. 116:87-91.

- Bermúdez-Aguirre D. y Barbosa-Cánovas G. V. 2013. Disinfection of selected vegetables under nonthermal treatments: Chlorine, acid citric, ultraviolet light and ozone. *Food Control*. 29(1):82-90.
- Bihn E. A. y Gravani R. B. 2006. Role of Good Agricultural Practices in Fruit and Vegetable Safety. *Microbiology of Fresh Produce*. ASM. Washington D.C. 2:21-53.
- Caballero T. A. E. Leyva C. V., Martino Z. T, Puig P. Y., Fernández-Tevejo E. O., García R. M., García D. G., Rubí V. I., Macías M. C., Mosquera D., Lombard B. A., Díaz L. T., Cardóna G. M. y Morejón P. 2008. Temas de higiene de los alimentos. La Habana: Editorial Ciencias Médicas. 379p.
- Callewaert, R., Holo H., Devreese B., Van Beeumen J., Nes I. y De Vuyst L. 1999. Characterization and production of amylovorin L471, a bacteriocin purified from *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 by a novel threestep method. *Microbiology*. 45:2559-2568.
- Castillo M., Balciunas E., Convertu A. y Cotter P.D. 2013. Bacteriocin production by *Bifidobacterium spp.* A review. *Biotechnology Advances*. 31:482-488.
- Cao Y., Ou Y., Miao J., Guo H., Liu G. y Fang X. y Liao Z. 2014. Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China. *Food Control*. 42:48-53.
- Chaimanee, V., Sakulsingharoj, C., Deejing, S., Seetakoses, P. y Niumsup, P. 2009. Screening and characterization of bacteriocin-producing bacteria capable of inhibiting the growth of bovine mastitis. *Maejo International Journal of Science and Technology*. 3:43-47.

- Chen H. y Hoover D. G. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2:82-100.
- Chen Y., Shapira R., Eisenstein M. y Montville T.J. 1997. Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:524-531.
- Cho M., Heu s., Oh J., Kang Y. y Ryu S. 2001. *gly* Gene Cloning and Expression and Purification of Glycinecin A, a Bacteriocin Produced by *Xanthomonas campestris* pv. *Glycines*. *Applied and environmental microbiology*.67(9):4105-4110.
- Cleveland J., Montville T., Nes I. y Chikandas M. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 71:1-20.
- Corsetti A. y Settani L. 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Journal of Food Microbiology*. 121:123-138.
- Corsetti, A., Settanni, L., Chaves-L_opez, C., Felis, G.E., Mastrangelo, M. y Suzzi, G. 2007. A taxonomic survey of lactic acid bacteria isolated from wheat (*Triticum durum*) kernels and non-conventional flours. *Systematic Applied Microbiology*. 30:561-571.
- Cotter P.D., Ross R.P. y Hill C. 2012. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*. 11:95-105.
- Cotter P.D., Hill C. y Ross R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 3:777-788.

- Cruz V., Ramos J., Melo N. y Martínez S. 2013. Bacteriocin AS-48 binding to model membranes and pore formation as revealed by coarse-grained simulations *Biochimica et Biophysica*. 2524-2531.
- Davidson P.M., Critzer F.J. y Taylor T.M. 2013. Naturally occurring antimicrobials for minimally processed foods. *Annual Review of Food Science and Technology*. 4:163-190.
- Deegan L.H., Cotter P.D. y Hill C., Ross P. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*. 16:1058-1071.
- Degnan A.J., Yousef A.E. y Luchansky J.B. 1992. Use of *Pediococcus acidilactici* to control *Listeria monocytogenes* in temperature-abused vacuum-packaged wieners. *Journal of Food Protection*. 55:98-103.
- Delgado A., Brito D., Fevereiro P., Peres C. y Marques J. 2001. Antimicrobial activity of *L. plantarum*, isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives. *Le Lait, INRA EDP Sciences*. 81:203-215.
- Dong M., Chen C., Chen X., Mei J. y Rui W. 2014. A newly discovered bacteriocin from *Weissella hellenica* D1501. *Food Control*. 42: 116-124.
- Farn R. J. 2006. *Chemistry and Technology of Surfactants*. Blackwell Publishing, UK. 2006. 1:4-5.
- Fontes S. M. A., Figved N., I. y Baracat-Pereira C., Vieira M., Cuquetto M. H. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD6.9. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*. 2014. 6(5): 79-87.

- Gálvez A., Molinos, A.C., Abriouel, H., Ben Omar, N., Valvidia, E., Lucas-López, R., Maqueda, M. y Martínez-Cañamero. 2005. Effect of immersion solutions containing enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetable foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:7781-7787.
- Gao Y., Li D., Liu S. y Zhang L. 2015. Garviecin LG34, a novel bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae*. *Food Control*. 50:896-900.
- Gao Y., Jia S., Gao Q. y Tan Z. 2010. A novel bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus sake* C2, isolated from traditional Chinese fermented cabbage. *Journal Food Control*. 21:76-81.
- Ghanbari M., Jami M., Domig K.J. y Kneifel W. 2013. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria — a review. *Food of Science and Technology*. 54:315-324.
- González–Martínez B.E., Gómez–Treviño M. y Jiménez-Salas Z. 2003. Bacteriocinas de probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*. 2:1-4.
- Güllüce M., Karaday M. y Özlem Barış. 2013. Bacteriocins: Promising Natural Antimicrobials. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. 1016-1027.
- <http://www.cdc.gov/>. 2016.
- Inglis R. F., Bayramoglu B. y Gillor O., Ackermann M. 2013. The role of bacteriocins as selfish genetic elements. *Biology Letters*. 9:1-4.
- Ishizaki A., Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K. y Ishizaki. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*. 24:85-106.

- Jabrane A., Sabri A., Compe're P., Jacques P., Vanderberghe I., Van Beeumen J. y Thonart P. 2002. Characterization of serracin P, a phage-tail-like bacteriocin, and its activity against *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:5704-5710.
- Jiang S., Yin L. y Wu C. 2004. Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *Food Chemistry*. 5:1146-1151.
- Józefiak D., Sip A., Rutowski A., Rawsky A., Laczmarek S., Wolun-Cholewa M., Engberg R. M. y Hojberg. 2012. Lyophilized *Carnobacterium divergens* AS7 bacteriocin preparation improves performance of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *Poultry Science*. 91:1899-1907.
- Kaiser A.L. y Montville T.J. 1996. Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:4529-4535.
- Kanmani P., Arul V., Pattukumar V., Paari K.A., Yuvaraj N., Kumar R. S.. 2011. Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium. *Biochemical Engineering Journal*. 140-147.
- Kochamit N., Siripornadulsil S., Sukon P. y Siripornadulsila W. 2015. Antibacterial activity and genotypic–phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: Potential as a probiotic strain. *Microbiological Research*. 170:36-50.
- Korpole S., Patil P. B., Singh P. K., Ashish C. y Sharma V. 2007. Identification, Purification and Characterization of Laterosporulin, a Novel Bacteriocin Produced by *Brevibacillus* sp. Strain GI-9. *PlosOne*. 7:1-8.

- Liu G., Ren L., Song Z., Wang C. y Sun B. 2005. Purification and characteristics of bifidocin A, a novel bacteriocins produced by *Bifidobacterium animals* BB04 from centenarians intestine. *Food Control*. 50:889-895.
- Lopez, M.M., Gorris M.T., Salcedo C.I., Montojo A.M. y Miró M. 1989. Evidence of biological control of *Agrobacterium tumefaciens* strains sensitive and resistant to agrocin 84 by different *Agrobacterium radiobacter* strains on Stone Fruit Trees. *Applied Environmental Microbiology*. 55(3):741-746.
- Lu, T. Blanchard, A. E. y Liao, C. 2016. An Ecological Understanding of Quorum Sensing-Controlled Bacteriocin Synthesis. *Cellular and Molecular Bioengineering*. Biomedical Engineering Society. 1-12.
- Lü X., Yo L., Dang J., Zhang L., Wu Y. y Liu B. 2016. Purification, characterization and bactericidal mechanism of a broad spectrum bacteriocin with antimicrobial activity against multidrugresistant strains produced by *Lactobacillus coryniformis* XN8. *Food Control*. 67:53-62.
- Lubelski J., Rink R., Khusainova R. y Moll G. 2008. Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin *Cellular and Molecular Life Science*. 65:455-476.
- Mayr-Harting, Hedges A. J. y Barkeley R. C. W. 1992. Method of studying bacteriocin. *Methods in Microbiology*. 7A: 315-422.
- Mondragón P., Escalante M., Castro O., Ibarra J., Chávez M. y Aguilar G. 2013. Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*. 21: 64-70.
- Moreira Do Santos W. L. 1993. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producidas por *Pediococcus sp* 347 de origen cárnico. Tesis

Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Nutrición y Bromatología III. 266p.

Moreno C. y Franco B. 2002. Bacteriocinas de Bacterias Lácticas. *ConScientiae Saúde*. 9-15.

Nishie M., Nagao J. y Sonomoto K. 2012. Antibacterial peptides “bacteriocins”: an overview of their diverse characteristics and applications. *Journal of Biocontrol Science*. 17:1-16.

Ndlovu B., Schoeman H., Franz C. y Toit M. 2015. Screening, identification and characterization of bacteriocins produced by wine-isolated LAB strains. *Journal of Applied Microbiology*. 2015. 118:1007-1022.

O'Connor P.M., Ross P.R., Hill C. y Cotter P.D. 2015. Antimicrobial antagonists against food pathogens: a bacteriocin perspective. *Current Opinion in Food Science*. 2:51-57.

Ogunbanwo S.T, Sanni A.I. y Onilude A. A. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology*. 2:219-227.

Oppegard C., Meyer-Nissen J., Rogne P. y Haugen H. 2010. Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb). *Probiotics & Antimicrobial Proteins*. 2:52-60.

Pacheco-Canoa R. D., Fuente-Salcido N. M., Salcedo-Hernández R., León-Galvána F., Bideshid D. K., Hernández-Guzmána G. y Barboza-Corona E. 2014. Characterization, N-terminal sequencing and classification of Tolworthicin 524: A bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Tolworthi*. *Microbiological Research*. 169:948-953.

- Perez R., Zendo T. y Sonomoto K. 2014. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*. 13:1-3.
- Pei J., Yuan Y. y Yue T. 2013. Characterization of bacteriocin bificin C6165: a novel Bacteriocin. *Journal of Applied Microbiology* ISSN. 114:1273-1284.
- Philip K. y Barbour A. 2014. Variable Characteristics of Bacteriocin-Producing *Streptococcus salivarius* Strains Isolated from Malaysian Subjects. *PLOS ONE*. 9(6):1-16.
- Pinheiro S. O. R., Balciunas M.E., Castillo M. F. A, Dimitrov T. S. Gombossy M. y F. Coverti. 2013. A. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Journal of Food Control*. 32:134-142.
- Pootjes C. F. y MacCardell B. A. 1976. Chemical Nature of Agrocin 84 and its effect on a virulent strain of *Agrobacterium tumefaciens*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 7:498-502.
- Prestrelsky S. J., Tedeshi N., Awakawa T. y Carpentert J. F. 1993. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophysical Journal*. 65:661-671.
- Randez-Gil F., Sonia Rodriguez-Vargas S., Estruch F. 2002. Gene Expression Analysis of Cold and Freeze Stress in Baker's Yeast. *Applied and Environmental Microbiology*. 6(68):3024-3030.
- Rea M.C., Ross R.P. y Cotter P.D., Hill C. 2011. Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Springer-Verlag*. 29-53.

- Rivero G. 2004. Penicillin. The very important achievement in the XX century. *Revista Médica en Línea*. 26:4:165-169.
- Rojas C. y Vargas P. 2004. Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. *Tecnología en Marcha*. 21(2):9-16.
- Saiqa A., Nazish M., Bushra Mazhar., Iram K. y Bushra K. 2009. Antibacterial activity and optimization of bacteriocin producing lactic acid bacteria isolated from beef (red meat) samples. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*. 59:85-98.
- Sánchez L. L. C. y Corrales R. L. C. 2005. Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. *NOVA – Publicación Científica en Ciencias Biomédicas* ISSN. 3(3):109-113.
- Sen S. y Nilsson L. 2012. Thermostable proteins, structural stability and design. CRS Press, U.S. Florida. (2):187p.
- Settanni L., Ventimiglia G., Alfonzo A., Galluzzo P., Corona O., Francesca N., Caracappa S. y Moschetti G. 2015, Codominance of *Lactobacillus plantarum* and obligate heterofermentative lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Food Microbiology*. 51:57-68.
- Schillinger, U. y Lucke, F.K. 1989. Identification of *lactobacilli* from meat and meat products. *Food Microbiology*. 4:199-208.
- Sheikh A.R., Nusrat J., Huma G., Syed A., Mushtaq H. y Munnaza A. 2009. Biophysicochemical characterization of bacteriocins from indigenously isolated *Agrobacterium radiobacter* NA6. *Pakistan Journal of Botanicals*. 41(6):3227-3237.

- Sheikh A. R. y Sehar A. N. 2013. Isolation, production and characterization of bacteriocins produced by strains from indigenous environments. *Pakistan Journal of Botany*. 45(1): 261-267.
- Sivaramasamy E., Neelamegam A., Packiyam M. y Thangavel B. 2014. Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. (1): S305-S311.
- Snyder A.B. y Worobo R.W. 2014. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 94:28-44.
- Todorov S.D., Barbosa M. S., Ivanova I., Chobert J.M., Haertl T., Gombossy B. D. 2015. Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. *Food Microbiology*. 46:254-262.
- Todorov S.D., Prévost H., Lebois M., Dousset X., LeBlanc J. G. y Franco D. G. 2011. M. B. Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*) — From isolation to application: Characterization of a bacteriocin. *Food Research International*. 44:1351-1363.
- Udhayashree N., Senbagam D. y Senthilkumar B. 2012. Production of bacteriocin and their application in food products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 406-410.
- Utnique R. S. y Smith E. M. 1990. Effect of Fumigants and *Agrobacterium radiobacter* Strain 84 in Controlling Crown Gall of Apple Seedlings. *Journal of Phytopathology*. 128:4: 265-270.

- Vásquez S.M., Suárez H. y Zapata S. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*. 36(1): 64-71.
- Vijai P., Jamuna M. y Jeevaratnam K. 2005. Isolation and Characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria from south indian special dosa. *Journal of Culture Collections*. 53-60.
- Williamson N.R., Fineran P. C., Leeper F. J. y Salmond G. P. 2006. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nature Reviews of Microbiology*. 4:887-899.
- Yang R. y Ray B. 1992. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiology*. 11:281-91.
- Yu P., Haider K., y Steve F. 2010. Enterocins in food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 121: 1-10.
- Zacharof M.P. y Lovitt R.W. 2012. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria. A review article. *APCBEE Procedia*. 2: 50-56.
- Zapata S., Muñoz J., Ruiz O.S., Montoya O.I. y Gutiérrez P.A. 2009. Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 16: 75-82.
- Zbrun B. E., Signorini M. V., Romero-Scharpen M., A, Altina, Frizzo M. G., Sequeira L. S., Rosmini G. J. y Soto M. R. 2013. Identification of lactic acid bacteria with bio-preservative potential isolated from contaminated avian blood obtained at the slaughterhouse. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 45:273-282.

Zhang M., Jiang J., Shi B., Zhu DF., Cai Q., Chen Y., Li J. y Qi K. 2012.
Characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei*
LSJ618 isolated from traditional Chinese fermented radish. Food Control
23: 338-344.