

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS
POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE UNA BACTERIA ÁCIDO
LÁCTICA BACTERIOCINOGÉNICA Y SU APLICACIÓN EN EL
CONTROL DE *Listeria monocytogenes* EN QUESOS FRESCOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

M.en C. RICARDO ALANIZ DE LA O

DIRECTOR:

Dra. María del Refugio Torres Vitela

ASESORES:

Dr. Agustín Ramírez Álvarez

Dr. Efraín Pérez Torres

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., Diciembre del 2001



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS

COORDINACIÓN DE POSGRADO

COORDINACIÓN DE POSGRADO DE LA
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE.

Por éste conducto nos permitimos enviar la **VERSION FINAL DE LA TESIS** que desarrolló el pasante de Doctorado en el Posgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias de la Universidad de Guadalajara, M en C Ricardo Alaniz de la O, cuyo título es:

"Aislamiento e identificación de una bacteria ácido láctica bacteriocinogénica y su aplicación en el control de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos."

Trabajo dirigido por: Dra. Ma. Refugio Torres Vitela.

Los que suscriben la presente avalan esta versión, la cual fue revisada y reúne los requisitos teóricos y metodológicos necesarios.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. a 1 Noviembre del 2001

REVISOR

Dr. HUGO CASTAÑEDA VAZQUEZ

REVISOR

Dr. EFRAÍN PÉREZ TORRES

REVISOR

Dr. JACINTO BAÑUELOS PINEDA

REVISOR

Dr. AGUSTÍN RAMÍREZ ALVAREZ

REVISOR

Dr. DANIEL A. F. VILLANUEVA ZAVALA

CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	vii
RESUMEN	ix
I.-INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	16
OBJETIVOS	17
HIPÓTESIS	17
II.- METODOLOGÍA	18
III.- RESULTADOS	35
IV.- DISCUSIÓN	54
V.- CONCLUSIONES	61
VI.- BIBLIOGRAFÍA	63

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Título	Página
1	Mecanismo de acción de bacteriocinas	8
2	Aislamiento de bacterias ácido lácticas	20
3	Determinación de la actividad antagónica de las cepas de bacterias ácido lácticas a <i>L. monocytogenes</i>	21
4	Detección de actividad bacteriocinogénica de las bacterias ácido lácticas antagónicas (Fase I)	23
5	Detección de actividad bacteriocinogénica de las bacterias ácido lácticas antagónicas (Fase II)	24
6	Susceptibilidad del agente inhibidor a enzimas proteolíticas	25
7	Efecto de la temperatura sobre la actividad de la bacteriocina	27
8	Efecto del pH sobre la actividad de la bacteriocina	28
9	Destino de cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> durante la elaboración y almacenamiento de quesos frescos inoculados artificialmente y adicionados o no de <i>Lactobacillus crispatus</i> bacteriocinogénico	31
10	Obtención de cultivos de <i>L. monocytogenes</i> y <i>L. crispatus</i> empleados para inocular la leche usada para la elaboración de quesos	33
11	Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> por siembra directa en placa	34
12	Antagonismo mostrado por 6 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de quesos frescos contra <i>L. monocytogenes</i> 1633 retados por la técnica de picadura	37
13	Inhibición de <i>L. monocytogenes</i> 1633 por el sobrenadante tratado (ajustado a pH 6.5 y expuesto a catalasa) de <i>Lactobacillus crispatus</i> retados por el método de la gota sobre la superficie	38
14	Sobrevivencia de <i>L. monocytogenes</i> 1633 expuesta al sobrenadante de <i>L. crispatus</i> con o sin enzima proteolítica según pH del sobrenadante incubado a 37°C por 2 horas	41

- 15 Comportamiento de *Listeria monocytogenes* 1633 durante la fabricación y almacenamiento de queso ranchero inoculado en ausencia o presencia de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico 44
- 16 Comportamiento de las bacterias ácido lácticas durante la fabricación y almacenamiento de queso ranchero inoculado con *Listeria monocytogenes* 1633 en ausencia o presencia de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico 45
- 17 Comportamiento del pH durante la fabricación y almacenamiento de queso ranchero inoculado con *Listeria monocytogenes* 1633 en ausencia o presencia de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico 46
- 18 Comportamiento de *Listeria monocytogenes* 40144 durante la fabricación y almacenamiento de queso panela inoculado en ausencia o presencia de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico 47
- 19 Comportamiento de las bacterias ácido lácticas durante la fabricación y almacenamiento de queso panela inoculado con *Listeria monocytogenes* 40144 en ausencia o presencia de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico 49
- 20 Comportamiento del pH durante la fabricación y almacenamiento de queso panela inoculado con *Listeria monocytogenes* 40144 en ausencia o presencia de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico 50
- 21 Comportamiento de *Listeria monocytogenes* R01 durante la fabricación y almacenamiento de queso adobera inoculado en ausencia o presencia de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico 51
- 22 Comportamiento de las bacterias ácido lácticas durante la fabricación y almacenamiento de queso adobera inoculado con *Listeria monocytogenes* R01 en ausencia o presencia de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico 52
- 23 Comportamiento del pH durante la fabricación y almacenamiento de queso adobera inoculado con *Listeria monocytogenes* R01 en ausencia o presencia de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico 53

ÍNDICE DE CUADROS

No.	Título	Página
1	Cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> empleadas en la determinación del espectro de acción del sobrenadante bacteriocinogénico	30
2	Efecto de la temperatura y tiempo de exposición sobre la actividad de la bacteriocina	40
3	Espectro de acción antimicrobiana del sobrenadante de <i>Lactobacillus crispatus</i> sobre cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	42

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

HCl	Ácido clorhídrico
ADN	Ácido ácido
ARN	Ácido ácido
APN	Agar Actidiona-Polimixina-Nitrito
ABAPNm	Agar Base Actidiona-Polimixina-Nitrito modificado
ABAPNmb	Agar Base Actidiona-Polimixina-Nitrito modificado blando
ASTEL	Agar de Soya y Tripticasa
CBAPNM	Caldo Base Actidiona-Polimixina-Nitrito
cel	Células
ETA	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
EUA	Estados Unidos de Norteamérica
FDA	Food and Drugs Administration
GRAS	Generalmente Reconocidas como Seguras
g	Gramos
NaOH	Hidróxido de sodio
h	Horas
KDa	Kilodaltons
log	logaritmos
>	Mayor que
<	Menor que
mg	Miligramos

ml	Mililitros
mm	Milímetros
min	Minutos
M	Molar
N	Normal
p	Probabilidad
rpm	Revoluciones por minuto
U	Unidades
UA	Unidades Arbitrarias
ufc	Unidades Formadoras de Colonias
VP	Vaciado en Placa

RESUMEN

Con el propósito de aislar e identificar una bacteria ácido láctica bacteriocinogénica y determinar su potencial para inhibir "in situ" el desarrollo de cepas de *Listeria monocytogenes* durante la elaboración y almacenamiento de quesos frescos inoculados artificialmente, se recolectaron 34 muestras de quesos frescos procedentes de expendios ubicados en la zona metropolitana de Guadalajara y de fábricas que los elaboran en la región. Se aislaron bacterias lácticas mediante la técnica de inoculación por extensión en superficie en el medio de Agar Actidiona-Polimixina-Nitrito (APN) e incubación a 30 °C por 72 h. La actividad antagonica de los lácticos aislados se probó contra la cepa de *L. monocytogenes* 1633 (cepa indicadora) por el método de inoculación por picadura empleando la base del medio de APN modificado blando (ABAPN mb: sin tween 80, ajustado a pH de 6.5 y con una concentración de glucosa del 0.2 % y de agar de 0.75 %) e incubación a 30 °C por 18-24 h . La bacteriocinogenicidad de los cultivos lácticos antagonistas se identificó siguiendo los fundamentos de la técnica de la gota sobre la superficie (spot-on-lawn) y utilizando los medios de ABAPN mb y la versión en caldo del mismo medio (CBAPNm). Se determinó la termoestabilidad, el efecto del pH, el espectro de acción sobre 30 cepas de *L.monocytogenes* y la susceptibilidad a 4 enzimas proteolíticas a la bacteriocina producida por el láctico bacteriocinogénico identificado. Por último se estudió el comportamiento de 3 cepas de *L.monocytogenes* inoculadas individualmente y en ausencia o presencia del láctico bacteriocinogénico en leche pasteurizada empleada para la fabricación de 3 variedades de quesos frescos. El seguimiento del patógeno se realizó mediante el recuento hecho en Agar Vogel Johnson Modificado (AVJM) a muestras obtenidas en varias etapas del proceso y almacenamiento del producto. A estas mismas se les realizó el recuento de bacterias lácticas y se determinó potenciométricamente el pH. De las 340 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de los quesos estudiados, solo 6 de ellas inhibieron el desarrollo de la cepa indicadora empleada en la prueba de antagonismo. Una de estas cepas antagonicas, identificada como *Lactobacillus crispatus* , conservó su actividad antilisteria después de que el sobrenadante del cultivo fue ajustado a pH 6.5 y se expuso a la enzima catalasa, evidenciando que el efecto inhibitor fue debido a una sustancia antimicrobiana distinta excretada en el caldo. Cuando el sobrenadante de *L. crispatus* fue tratado y expuesto a las enzimas tripsina, alfa-quimiotripsina y proteinasa K, su acción antimicrobiana fue anulada, confirmando la naturaleza proteica del agente inhibitor y definiéndola como bacteriocina. La bacteriocina conservó su actividad antilisteria aún después de ser tratada a 96 ° C / 60 min y ajustar el sobrenadante a pH's entre 3.5 y 7.5 . La bacteriocina inhibió a 25 de las 30 cepas de *L. monocytogenes* probadas, una resultó resistente y 4 fueron moderadamente resistentes. Cuando se determinó el comportamiento de las 3 cepas de *L. monocytogenes* en quesos elaborados con leche pasteurizada inoculada exclusivamente con éstas, se observó que el patógeno, independientemente de la cepa, encuentra en ellos un buen sustrato para su desarrollo que no es evitado por la conservación del alimento a 4 °C.

En los quesos inoculados con las distintas cepas del patógeno en conjunto con *L. crispatus*, se encontró que el grado de inhibición sufrido por *L. monocytogenes* fue dependiente de la susceptibilidad o resistencia de la cepa probada. El resurgimiento del patógeno en el producto hasta alcanzar un poco mas allá del inóculo inicial, al finalizar el almacenamiento (21 d a 4°C), pudo deberse a factores relacionados con la susceptibilidad de la cepa del patógeno, el número de listerias inoculadas, la interacción de los constituyentes del queso con la bacteriocina y la actividad proteolítica originada por otros microorganismos presentes en el producto.

I.- INTRODUCCIÓN

A través de su existencia, el hombre se ha enfrentado con el problema que representa la limitada vida de anaquel de los alimentos que ha venido empleando para subsistir.

Los primeros intentos que realizó para conservar alimentos se basaron en la aplicación de procesos que estuvieron a su alcance, tales como el enfriamiento, el salado, la desecación, la fermentación y el ahumado, entre otros (Jay,1992). Estos procesos que controlan la actividad microbiana en un mayor o menor grado fueron aplicados antes que su mecanismo de acción fuera entendido (Baird-Parker,2000).

Las bases científicas que establecieron la participación de los microorganismos en la descomposición de los alimentos fueron dadas a mediados del siglo 19 por Louis Pasteur, aunque ya otros personajes habían sugerido tal asociación (Subcommittee on microbiological criteria for foods and food ingredients,1985).

Actualmente la conservación de los alimentos se realiza más frecuentemente mediante el control y reducción de la contaminación microbiana; la conservación a bajas temperaturas; el procesamiento del alimento a altas temperaturas; el control de la actividad de agua; el control del pH; la irradiación; la fermentación; el empleo de atmósferas controladas y modificadas; la adición de aditivos químicos; la bioconservación y la interacción de varios de los factores mencionados anteriormente que afectan el desarrollo de los microorganismos (sistema "hurdle") (Sofos,1993).

De estos métodos, la bioconservación, que se refiere al uso de microorganismos o sus metabolitos con potencial para inhibir o destruir microorganismos indeseables en alimentos (Schillinger *et al.*,1996), ha sido objeto de intensa investigación en los últimos años en virtud de los beneficios que representa su empleo.

No existe duda que la conservación de alimentos por métodos físicos y químicos ha sido una de las más importantes contribuciones a la seguridad de alimentos en la segunda mitad del siglo XX (Dooley y Roberts,2000) , sin embargo, actualmente el consumidor está demandando alimentos mínimamente procesados y libres de aditivos químicos, es decir, más naturales, frescos y microbiológicamente seguros (Leistner y Gorris, 1995;Grahame,2000; Sofos,2000).

Esta demanda se fundamenta en la preocupación del consumidor de que los aditivos químicos sintetizados industrialmente : a) representen un riesgo a la salud del consumidor, como ha sido constatado con los nitritos y sulfitos que pueden

causar asma, náusea, vómito y dolor de cabeza en algunas personas (Sarre,2000), b) comprometan la calidad nutricional del alimento y c) enmascaren características indeseables (Sofos,2000). De ahí que el procesador de alimentos, percibiendo la inquietud del consumidor, esté interesado en reemplazar estos agentes por antimicrobianos que comúnmente se encuentran en la naturaleza.

Entre las fuentes importantes de antimicrobianos naturales están las cortezas, tallos, hojas, flores y frutos de plantas así como la leche, huevos y bacterias ácido lácticas empleadas en la fermentación de alimentos (Sofos,2000).

La fermentación, uno de los más antiguos métodos de conservación de alimentos conocidos, sigue siendo empleada con bastante éxito debido a que el consumidor considera que este proceso permite contar con alimentos sanos y naturales (Friedman,2000). Este proceso es comúnmente empleado para conservar o engrandecer los atributos organolépticos y asegurar la calidad microbiológica de alimentos (Leroy y de Vuyst,1999). Los microorganismos responsables de la fermentación pueden ser bacterias, levaduras o mohos que ingresan de manera fortuita al alimento o que son añadidas intencionalmente bajo condiciones controladas para asegurar y engrandecer la producción de compuestos deseados (Smith y Palumbo,1981).

Por su típica asociación con la fermentación de alimentos, las bacterias ácido lácticas han sido tradicionalmente empleadas, empíricamente o deliberadamente, en la elaboración de productos lácteos (quesos, mantequilla, yogurt), vegetales fermentados (encurtidos, aceitunas, col agria), productos cárnicos (mortadelas, salami), bebidas (sidras), entre otros (Fetlisinski y Stepaniak,2000; Herrero *et al.*,1996), por décadas y sin aparente daño a la salud, lo que les ha permitido ser consideradas como bacterias "Generalmente Reconocidas como Seguras" (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica (Montville y Winkowsky,1997).

Los lácticos son un grupo heterogéneo de bacterias gram positivas, no esporuladas, catalasa negativa, anaerobias pero aerotolerantes, los cuales producen ácido láctico como principal producto final de la fermentación de carbohidratos (Herrero *et al.*,1996 ;Axelsson,1998). Este grupo ha sufrido cambios en su conformación, sin embargo, históricamente los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*,

Pediococcus y *Streptococcus* forman la esencia del mismo (Axelsson,1998). Actualmente se reconocen 16 géneros en el grupo cuya clasificación está basada principalmente en su morfología, tipo de fermentación de la glucosa, desarrollo a diversas temperaturas, configuración del ácido láctico producido, capacidad para desarrollar a altas concentraciones de cloruro de sodio y tolerancia a la acidez y alcalinidad (Axelsson,1998).

Las bacterias ácido lácticas han sido divididas en dos grupos con base a los productos finales formados durante la fermentación de la glucosa: las homofermentativas, las cuales producen ácido láctico como único o principal producto final y las heterofermentativas que producen además de ácido láctico, cantidades apreciables de CO₂, ácido acético y etanol (Axelsson,1998).

Las bacterias lácticas están ampliamente diseminadas en la naturaleza y se han asociado con ambientes ricos en nutrientes tales como la leche, carne, vegetales y bebidas, pero algunos son miembros de la flora normal de la boca, intestino y vagina de mamíferos (Axelsson,1998).

Los cambios químicos generados en los alimentos fermentados por los lácticos no solo se traducen en ventajas de índole organoléptico sino que además, pueden ser un serio obstáculo para el desarrollo de microorganismos deterioradores y para aquellos que representan un riesgo a la salud del consumidor.

Tanaka *et al.* (1980) demostraron la incapacidad de *Clostridium botulinum* para producir toxina en tocino inoculado con el patógeno a niveles de 1×10^3 esporas por gramo del alimento conjuntamente con el *Lactobacillus plantarum*. Goodfellow (1979) y Andres (1979) por su parte, indican que el ácido producido por el láctico, no solo evita la producción de la toxina botulínica sino que, además, reduce los niveles de nitritos y previene la formación de nitrosaminas durante el freído del tocino.

Daly *et al.* (1972) encontraron que *S. lactis* subsp. *diacetylactis* inhibió el desarrollo de *S. aureus* añadidos a carne molida de res conservada a 25 °C.

Park y Marth (1972) encontraron que el desarrollo de *S. typhimurium* fue reprimido cuando la leche descremada en la que inocularon al patógeno, fue fermentada con *S. cremoris* o *S. lactis* o una mezcla de ambos lácticos.

Batish *et al.* (1991) encontraron que *S. lactis* subsp. *lactis* inhibió el desarrollo de *Aspergillus fumigatus* cuando fueron inoculados conjuntamente en leche.

Megalla y Mohran (1984) reportaron la transformación de aflatoxina B₁ a aflatoxina B_{2a} y aflatoxicol (Ro) en leche fermentada con *Streptococcus lactis*. La aflatoxina B_{2a} es atóxica mientras que el aflatoxicol es menos tóxico que la aflatoxina B₁. Estos efectos benéficos producidos por las bacterias lácticas son llevados a través de diversos mecanismos entre los que se encuentra la producción de compuestos antimicrobianos.

Aunque la producción de ácidos orgánicos (láctico y acético) es reconocido como el principal mecanismo antagónico que presentan los lácticos contra microorganismos deterioradores y patógenos, otras sustancias inhibitorias han sido descritas (Daeschel,1989).

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que debe su efecto antimicrobiano a su poder oxidativo, es activo contra bacterias gram positivas, gram negativas (Ouwehand,1998) y esporas (Mishra y Lambert,1996) y su aplicación en la industria de los alimentos es limitada debido a los efectos indeseables que puede producir en la calidad de los alimentos, como la decoloración en carnes procesadas, sin embargo, su aplicación en el procesamiento de algunos alimentos e higienización de equipo, está siendo estudiada (Juven y Pierson,1996; Ray,1996).

El bióxido de carbono (CO₂), que es formado por los lácticos heterofermentativos, puede realizar su efecto antimicrobiano por varias vías: a) creando un ambiente anaeróbico ; b) inhibiendo las descarboxilaciones enzimáticas y, c) alterando el funcionamiento de la membrana celular al acumularse el gas en la bicapa lipídica (Mishra y Lambert,1996;Ouwehand,1998).

El diacetilo (2,3, butanodiona), que es sintetizado a partir del piruvato por algunas especies de bacterias ácido lácticas y es el responsable del aroma y sabor de la mantequilla, es más activo contra bacterias gram negativas, levaduras y mohos que contra bacterias gram positivas (Mishra y Lambert,1996;Ouwehand,1998). Aunque esta sustancia es generalmente reconocida como segura (GRAS), su empleo como conservador de alimentos es limitado debido a las grandes cantidades requeridas para funcionar como tal y a su intenso aroma y volatilidad (Daeschel,1989).

La reuterina, un compuesto de bajo peso molecular, altamente soluble y de naturaleza no proteica, es producido por algunas cepas de *Lactobacillus reuterii*

(Daeschel, 1989). Esta sustancia posee un amplio espectro de acción antimicrobiana y es efectiva contra *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida*, *Trypanosoma* y virus (Daeschel, 1989; Axelsson, 1998), aunque también bacterias lácticas, como *L. reuterii*, son sensibles a ella (Axelsson, 1998). Esta sustancia es producida solo cuando el glicerol está presente en el medio donde desarrollan las cepas productoras de la reuterina, lo que reduce su empleo en la conservación de alimentos (Ray, 1996).

Otro grupo de sustancias producidas por las bacterias ácido lácticas que han acaparado la atención de científicos e industriales de la rama alimenticia y farmacéutica en los últimos años, son las bacteriocinas.

Las bacteriocinas son péptidos o pequeñas proteínas sintetizadas ribosomalmente que actúan inhibiendo especies de bacterias cercanamente relacionadas a las cepas bacteriocinogénicas, aunque algunas pueden llegar a afectar a un amplio rango de bacterias gram positivas, y bajo ciertas condiciones, aún a bacterias gram negativas (Montville y Winkowsky, 1997). Su incapacidad para inhibir a la cepa productora y su naturaleza proteica son los 2 criterios aceptados para definir a este grupo de sustancias (Montville y Kaiser, 1993).

La información genética que codifica la producción de las bacteriocinas y la inmunidad a ella puede estar localizada en plásmidos, en el cromosoma o en ambos (Klaenhammer, 1993; Montville y Winkowsky, 1997). Un plásmido puede aportar los determinantes genéticos para más de una bacteriocina y más de un plásmido, con información para 2 o más bacteriocinas, pueden encontrarse en una misma cepa (Jack *et al.*, 1995).

Klaenhammer (1993) clasificó a las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas en 4 clases:

Clase I. (lantibióticos). Son péptidos pequeños que contienen los inusuales aminoácidos: dihidroalanina, dihidrobutirina, lantionina y beta metil-lantionina. Estos aminoácidos son sintetizados postranslacionalmente a partir de aquellos prescritos por el código genético. La nisina, lactosina S y la salivaricina son ejemplos de estas bacteriocinas (Ouwehand, 1998).

Clase II. Este grupo está conformado por péptidos pequeños (<10KDa) y relativamente termoestables. Está dividido en 3 subclases sobre la base de la secuencia N-terminal del péptido, su mecanismo de acción antimicrobiana (formación

de poros en la membrana) y la presencia de un grupo funcional sulfhidrilo (Jack *et al.*,1995; Ouwehand,1998). Es el grupo con mayor cantidad de bacteriocinas identificadas, ejem.: sakacina A y P, plantaricina A, C, S y T, pediocina AcH y JD, entre otras.

Clase III. Formada por las más grandes proteínas (>30Kda) termolábiles antimicrobianas identificadas, entre las cuales tenemos a la helveticina J y V, lactocinas A y B, caseicina 80 y las carnobacteriocinas (Klaenhammer,1993;Jack *et al.*,1995;Ouwehand,1998).

Clase IV. Formada también por proteínas grandes y complejas conteniendo lípidos y/o carbohidratos en sus moléculas. Ejemplo de esta clase de bacteriocinas lo son la leuconocina S, lactocina 27 y pediocina SJ-1 (Jack *et al.*,1995;Montville y Winkowsky,1997; Ouwehand,1998).

El mecanismo de acción de las bacteriocinas producidas por las bacterias ácido lácticas está siendo aún investigado, sin embargo, se tienen avances en el conocimiento de algunos correspondientes a bacteriocinas de la clase I y II.

El grupo de los lantibioticos tipo A, al que pertenece la nisina, ejercen su acción antibacteriana a través de la formación de poros transitorios en la membrana citoplasmática de células sensibles. Este proceso conduce al desvanecimiento del potencial de membrana y promueve una rápida salida de metabolitos pequeños (aminoácidos y nucleótidos) lo que a la vez detiene abruptamente el proceso de biosíntesis celular (Brötz *et al.*,1998) (Figura 1).

La lactococcina A, que es una bacteriocina clase II, al parecer requiere de receptores específicos proteicos para unirse y luego destruir la integridad de la membrana por la formación de poros con las consecuencias señaladas anteriormente (Jack *et al.*,1995; Ouwehand,1998).

Otras bacteriocinas de esta clase han mostrado la capacidad para inhibir la síntesis de ADN, ARN, proteínas e inhibición de transporte de precursores y salida de moléculas pequeñas esenciales de la célula (Ouwehand,1998).

Los mecanismos de acción de las bacteriocinas clase III y IV permanecen en gran medida desconocidos (Ouwehand,1998).

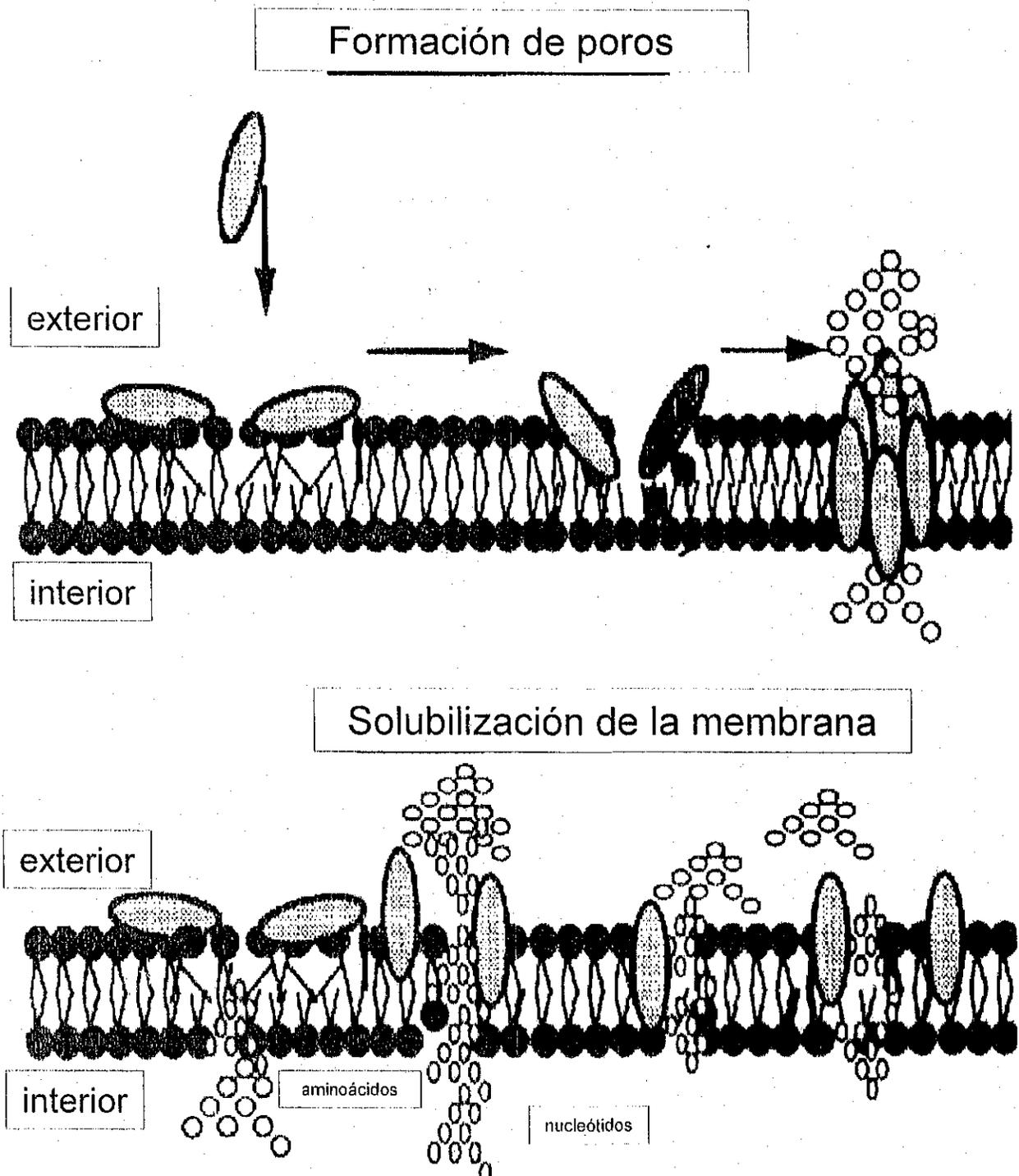


Figura 1. Mecanismo de acción de bacteriocinas
(Tomada y adaptada de Montville y Winkowsky, 1997)

Se han descrito más de 80 bacteriocinas (Ralof,2000) y sólo algunas de ellas han sido estudiadas para determinar la factibilidad de su empleo como bioconservadores de alimentos.

Las bacteriocinas han sido usadas en numerosas aplicaciones experimentales contra *L. monocytogenes*, incluyendo el empleo de cultivos productores de bacteriocinas como microorganismos biocontroladores, como cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos o añadiendo directamente la bacteriocina purificada a los alimentos (Muriana, 1996).

La nisina, una bacteriocina producida por ciertas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, ha sido empleada por más de 30 años en diversos alimentos con buenos resultados y sin perjuicio a la salud. La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos Americanos, designó en 1988 a la nisina, como una sustancia GRAS (Federal Register,1988) y más de 45 países la emplean en forma autorizada como conservador de alimentos (Delves-Broughton,1990;Mishra y Lambert,1996). Esta bacteriocina es un péptido de 3.5 KDa que inhibe a bacterias gram positivas que incluyen a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* y *Brochotrix thermosphacta* (Jenson *et al.*,1994;Cutter y Siragusa,1995;Mishra y Lambert,1996;Cutter y Siragusa,1998). Algunas investigaciones han mostrado además que su espectro de acción puede extenderse a bacterias gram negativas cuando estas últimas son tratadas previamente con agentes quelantes como el EDTA que modifican la permeabilidad de la membrana externa de estas bacterias permitiendo a la bacteriocina llegar al sitio blanco (Cutter y Siragusa,1995;Stevens *et al.*, 1991).

La nisina es también efectiva contra esporas de bacterias gram positivas. Este potencial es de mucho valor en virtud de que estas estructuras son resistentes al calor y a otros métodos empleados para procesar y conservar alimentos (Hoover,2000).

Alimentos en los cuales ha sido usada como conservador incluye quesos pasteurizados, sopas y verduras enlatadas, huevo líquido pasteurizado (Delves-Broughton,1990;Cutter y Siragusa,1998), mayonesa y alimentos para bebés (Montville y Winkowsky,1997), aunque también se ha aplicado a vinos (Daeschel *et al.*,1991) y cerveza (Ogden *et al.*,1988).

Actualmente, sólo la nisina está comercialmente disponible para su aplicación en forma pura, pero la eficacia de otras bacteriocinas ha sido demostrada (Montville y Winkowsky, 1997).

La pediocina PA-1, producida por *Pediococcus acidilactici*, ha mostrado ser efectiva en la inhibición de *L. monocytogenes* en alimentos como la crema, queso cotagge y salchichas (Pucci *et al.*, 1988; Foegeding *et al.*, 1992), entre otros.

Morgan *et al.* (1999), empleando lacticina 3147 producida por *Lactococcus lactis* DPC 3147 lograron destruir a más del 99% de *Listeria monocytogenes* (10^4 cel/ml) inoculada en una formulación de leche en polvo infantil, donde un 5% del 15% de leche en polvo empleada en la preparación del alimento, fue sustituida por un preparado lácteo en polvo del cultivo bacteriocinogénico.

McAuliffe *et al.* (1999), usando el mismo cultivo bacteriocinogénico como cultivo iniciador en la elaboración de queso cotagge, demostraron la eficacia del láctico para reducir hasta en un 99% el número de *Listeria monocytogenes* inoculada en el mismo, en un lapso de 5 días y conservado a 4 °C.

Ruiz-Barba *et al.* (1994), demostraron que *L. plantarum* LPCO10 fue capaz de producir su bacteriocina durante la producción de aceitunas estilo español y con ello controlar la actividad de flora microbiana propia involucrada en el deterioro del producto.

Un estudio realizado por Goff *et al.* (1996) en carne de pollo tratada con pediocina Ach e inoculada con *Listeria monocytogenes*, mostró la eficacia del tratamiento antilisteria antes y después de cocción del alimento ofreciendo una medida de protección al consumidor contra alimentos contaminados pos-proceso y/o insuficientemente cocidos.

Ennahar *et al.* (1998), por su parte, empleando a *Lactobacillus plantarum* WHE92, productor de pediocina Ach, lograron inhibir a *Listeria monocytogenes* 4d cuando una suspensión del láctico (1×10^5 ufc/ml) fue rociada sobre la superficie de un queso blando inoculado con el patógeno (<50 ufc/g) y madurado por 21 días.

Nilsson *et al.* (1999), empleando una cepa bacteriocinogénica de *Carnobacterium piscicola* (A9b) prolongaron a 7 días la fase lag de una cepa de *Listeria monocytogenes* nativa y luego redujo su número por más de 2 logaritmos después de una conservación de 32 días a 5 °C en jugo de salmón ahumado.

La enterocina CCM 4231 (3200 unidades arbitrarias/ml), producida por una cepa de *Enterococcus faecium*, inhibió a *Listeria monocytogenes* Ohio (1×10^6 ufc/ml) en 24 h y redujo en 3.5 log una cepa de *Staphylococcus aureus* (1×10^8 ufc/ml) inoculadas en leche de soya (Lauková y Czikková, 1999).

Un estudio realizado por Nuñez *et al.* (1997) en queso manchego, mostró la capacidad de una cepa bacteriocinogénica de *E. faecalis* (INIA 4) para reducir hasta 6 logaritmos en 7 días a *Listeria monocytogenes* cepa Ohio inoculada en la leche empleada para la fabricación del queso. Cuando esto mismo se realizó usando *Listeria monocytogenes* cepa Scott A solo se redujo al patógeno en 2 logaritmos y después de 60 días de iniciada su fabricación.

Wan *et al.* (1997), en una investigación realizada en quesos camembert elaborados con leche pasteurizada e inoculados con *Listeria monocytogenes* y piscicolina 126, reportaron una cuenta viable del patógeno de 3-4 log menos que aquellos a los que no se añadió la bacteriocina. Los autores observaron, además, el surgimiento de aislamientos de *L. monocytogenes* resistentes a la bacteriocina que explica en buena medida la recuperación del patógeno a los 21 y 47 días de fabricado el queso.

Aymerich *et al.* (2000), en un estudio realizado en productos cárnicos, reportan la reducción de *Listeria innocua* por 7.9 log en rebanadas de jamón cocido y 9 log en paté cuando se inocula juntamente con 4,800 UA/g de enteriocina A y B, se conservan a 7°C por 37 días y se comparan con los controles (sin bacteriocina). En pechuga de pollo inoculada con *L. innocua* y la bacteriocina (4,800 UA/g) y almacenada a 7°C por 7 días, la reducción observada en la bacteria fue de 5.2 log.

Berry *et al.* (1990), encontraron que una cepa de *Pediococcus spp.* productora de bacteriocina produjo una reducción de 2 log en *L. monocytogenes* (1×10^6 ufc/g) inoculada en salchichas, mientras que una cepa no bacteriocinogénica solo la redujo en menos de 1 log.

Luchansky *et al.* (1992) reportaron, durante la elaboración de embutido de pavo, que un cultivo iniciador productor de pediocina disminuyó en 3.4 log a *Listeria monocytogenes*, mientras que un cultivo no productor de la bacteriocina ocasionó solo una reducción de 0.9 log.

Schillinger *et al.* (1991) consignaron que *Lactobacillus sake* lb706 (productor de sakacina A) redujo un poco más de 1 log el nivel de *Listeria monocytogenes* comparado a la inhibición lograda por *L. sake* 706-13 productor de menos bacteriocina en carne molida fresca almacenada por una semana.

Maisnier-Patin *et al.* (1992) demostraron que una cepa iniciadora productora de nisina logró disminuir 2.4 log de *L. monocytogenes* coinoculados en leche empleada en la fabricación de queso camembert en comparación con una cepa no productora de nisina.

Como se ha observado, uno de los microorganismos contra el que insistentemente se ha venido investigando la actividad de las bacteriocinas es *Listeria monocytogenes*.

Esta bacteria, cuya participación como patógeno transmitido por alimentos quedó plenamente demostrada en la década de los 80's (Farber y Peterkin, 1991), es, hasta la fecha, objeto de constante investigación.

Su importancia estriba, en buena medida, a la alta letalidad que provoca (cercana al 30%), al potencial que tiene para producir secuelas siguientes a la enfermedad, al impacto económico que produce, a la capacidad para causar epidemias (Tappero *et al.*, 1995), a su habilidad para desarrollar a bajas temperaturas y establecerse en el medio ambiente de plantas procesadoras de alimentos (Muriana, 1996), y, finalmente, a su hallazgo tanto en alimentos crudos como procesados (Farber y Peterkin, 1991).

En 1981 ocurrió un brote en Canadá que involucró a una ensalada de col donde 17 de 41 (41.5%) personas que enfermaron, murieron de listeriosis (Schlech *et al.*, 1983). Dos años más tarde 3 brotes acaecidos en Alemania (Nicolai-Scholten *et al.*, 1985) y en los Estados Unidos de Norteamérica (EUA) (Canfield *et al.*, 1984; Fleming *et al.*, 1985) produjeron 84 casos, el último de ellos citado, incriminó a leche pasteurizada e incluyó 14 muertes (29 % de letalidad).

En junio de 1985, en Los Angeles, Cal. (Linnan *et al.*, 1988), un brote asociado al consumo de queso fresco tipo mexicano marca Jalisco que produjo 142 casos (48 muertes), vino a dejar en claro la capacidad de *L. monocytogenes* para ser incluida en las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).

Durante en período de 1983 a 1987 ocurrió un brote en el Oeste de Suiza con 122 casos de listeriosis (31 muertes) asociado al consumo de queso blando Vacherin Montd'or (Bula *et al.*, 1994).

Once brotes más (8 en Europa y 2 en EUA y 1 en Australia), han sido registrados de 1987 a 1997 donde se han implicado el paté en 2 de ellos (366 casos), a la lengua de puerco (279 casos) y al maíz dulce, el cual produjo el mayor brote de listeriosis hasta hoy conocido con 1594 casos (Ryser, 1999).

A pesar de estar subestimada, la listeriosis se ha asociado en otros países con un importante costo económico generado por los gastos relacionados con la enfermedad, muertes, productividad y con los ocasionados a la industria de alimentos (The National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 1991).

Tood (1988) calculó en 1.89 millones de dólares el costo total del brote ocurrido en Massachusetts en 1983 que involucró a leche pasteurizada y donde murieron 14 personas.

El brote de listeriosis vehiculizado por queso fresco estilo mexicano que afectó a 142 consumidores en Los Angeles, Cal. (Linnan *et al.*, 1988), produjo gastos a la compañía "Jalisco Mexican Products, Inc." que incluyeron una multa de \$9,300 dólares al vicepresidente de la firma, \$617,204 dólares por costos de investigación del brote y se cree que, aproximadamente, \$700 millones de dólares por demandas impuestas por algunos de los afectados (Ryser, 1999).

En nuestro país, los datos sobre la listeriosis son muy escasos: en 1981 sólo se conocían 16 casos de la enfermedad, 12 de meningoencefalitis y 4 de septicemia (Barriga *et al.*, 1981). En un estudio realizado en 9,283 recién nacidos vivos y atendidos en el Instituto Nacional de Perinatología durante 1987 y 1988, destacan la importancia que tiene *Listeria monocytogenes* como agente causal de la infección neonatal (Alaniz y Luis Juan, 1998). Debido a que la listeriosis en México no es una enfermedad de reporte obligatorio es razonable pensar que su incidencia es mucho mayor a la reportada hasta hoy.

La leche y los quesos frescos han destacado por su frecuente participación en brotes y casos esporádicos de listeriosis alimentaria reportados en la literatura extranjera (The National Advisory Committee on Microbiological Criteria for

Foods,1991) y la ocurrencia del patógeno en esos productos ha oscilado entre 0 y 45% para el primero, y entre 0.5 y 10% para los últimos (Farber y Peterkin,1991).

Pocos son los estudio realizados en México sobre la distribución, frecuencia y dinámica de *L. monocytogenes* en los alimentos, sin embargo, los resultados de algunos de ellos y considerando la pobre calidad sanitaria de los alimentos que consumimos, hace pensar que el patógeno frecuentemente se encuentra contaminando los alimentos.

Luis Juan *et al.* (1992a,1992b), en estudios llevados a cabo en quesos frescos tipo rancho y panela recolectados de mercados de Guadalajara (México), encontraron una tasa de contaminación con el patógeno de 23% y 27%, respectivamente.

Covarrubias *et al.* (1999) encuentran en estos mismos tipos de quesos recolectados en mercados de 11 municipios del estado de Michoacán (México) una positividad del 23% para el queso rancho y del 16% para la panela.

En 1997, Luis Juan *et al.* reportan una frecuencia del 16% para *Listeria monocytogenes* en queso tipo adobera elaborado con leche pasteurizada y expandido en tiendas de autoservicio y mercados de Guadalajara, Jal.(México).

Una investigación sobre el comportamiento de *Listeria monocytogenes* en queso panela preparada con leche cruda artificialmente contaminada, mostró que la bacteria podía multiplicarse durante la elaboración y almacenamiento aún en refrigeración del producto, indicando que este tipo de alimento es un buen sustrato para el desarrollo del patógeno, aumentando con ello el riesgo a la salud del consumidor (Luis Juan *et al.*, 1994).

Son pues, los quesos frescos que se producen y consumen en nuestra región, una fuente importante del patógeno con una frecuencia mayor a la reportada por otros países y un buen sustrato para su desarrollo.

Ante este panorama, convendría contar con una medida adicional a la pasteurización y a las buenas prácticas de higiene para producir quesos frescos sin el riesgo ya citado.

Como fue mencionado previamente, existen cepas de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas, que sin causar daño alguno, podrían ser empleadas en la producción de alimentos más seguros bacteriológicamente hablando.

Si bien, las bacterias lácticas regularmente están presentes en los quesos frescos que se elaboran en nuestro medio, cepas generadoras de bacteriocinas podrían faltar, ser inhibidas, estar en bajo número, o no desarrollar, lo que reduciría significativamente el mecanismo de autoprotección del producto. Importante sería entonces producir quesos frescos en donde existieran siempre y en cantidades suficientes, cepas de lácticos con la capacidad de desarrollar y antagonizar a patógenos como *Listeria monocytogenes*.

JUSTIFICACIÓN

- 1.- La listeriosis es una enfermedad que desde la década de los ochenta ha sido objeto de un gran número de investigaciones en todo el mundo debido a su importancia en Salud Pública y al impacto económico que ocasiona.
- 2.- La enfermedad se transmite principalmente por los alimentos, teniendo como vehículo frecuente a los quesos blandos o frescos.
- 3.- Por problemas relacionados con su diagnóstico, notificación y reporte, en México no existen datos epidemiológicos que incriminen a éstos y otros alimentos como transmisores de la listeriosis, sin embargo, estudios realizados sobre la frecuencia y dinámica del patógeno en quesos frescos de amplio consumo popular reportan tasas de aislamiento que sobrepasan significativamente a las encontradas en otros países y consignan la capacidad del patógeno para desarrollar en ellos aún en una buena refrigeración.
- 4.- Investigaciones llevadas a cabo con el propósito de implementar medidas que conduzcan a reducir y, en su caso, a eliminar a *Listeria monocytogenes* de los alimentos, sin que represente un riesgo a la salud del consumidor y comprometan la calidad nutricional del alimento, han mostrado que el empleo de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas es prometedor y su estudio se ha intensificado.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el empleo de una cepa bacteriana láctica bacteriocinogénica en el control de *Listeria monocytogenes* durante la elaboración y almacenamiento de quesos frescos inoculados artificialmente.

ESPECÍFICOS

- 1.- Aislar bacterias lácticas a partir de productos lácteos y determinar su capacidad antagónica contra una cepa de *Listeria monocytogenes* recuperada de queso fresco.
- 2.- Determinar la capacidad bacteriocinogénica de las cepas antagónicas a la cepa de *Listeria monocytogenes*.
- 3.- Caracterizar la(s) bacteriocina(s) de la(s) cepa(s) bacteriocinogénica(s).
- 4.- Determinar "in situ" la capacidad de una cepa láctica bacteriocinogénica para inhibir el desarrollo de cepas de *L. monocytogenes* durante la elaboración y almacenamiento de quesos frescos inoculados artificialmente.

HIPÓTESIS

El empleo de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas aisladas de productos lácteos contribuye al control de *Listeria monocytogenes* que ingresa a estos productos durante su elaboración.

II.- METODOLOGÍA

1. - AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Se recolectaron 34 muestras de quesos frescos: ranchero, panela, adobera y requesón, procedentes de expendios ubicados en la zona metropolitana de Guadalajara (México) y de fábricas que los elaboran en la región.

El aislamiento de las bacterias ácido lácticas a partir de las muestras citadas, se realizó mediante la técnica de inoculación por extensión en superficie (Swanson *et al.*, 1992) en el medio de Actidiona-Polimixina-Nitrito (APN) (Davidson y Cronin, 1973) e incubación a 30°C durante 48-72 h (figura 2).

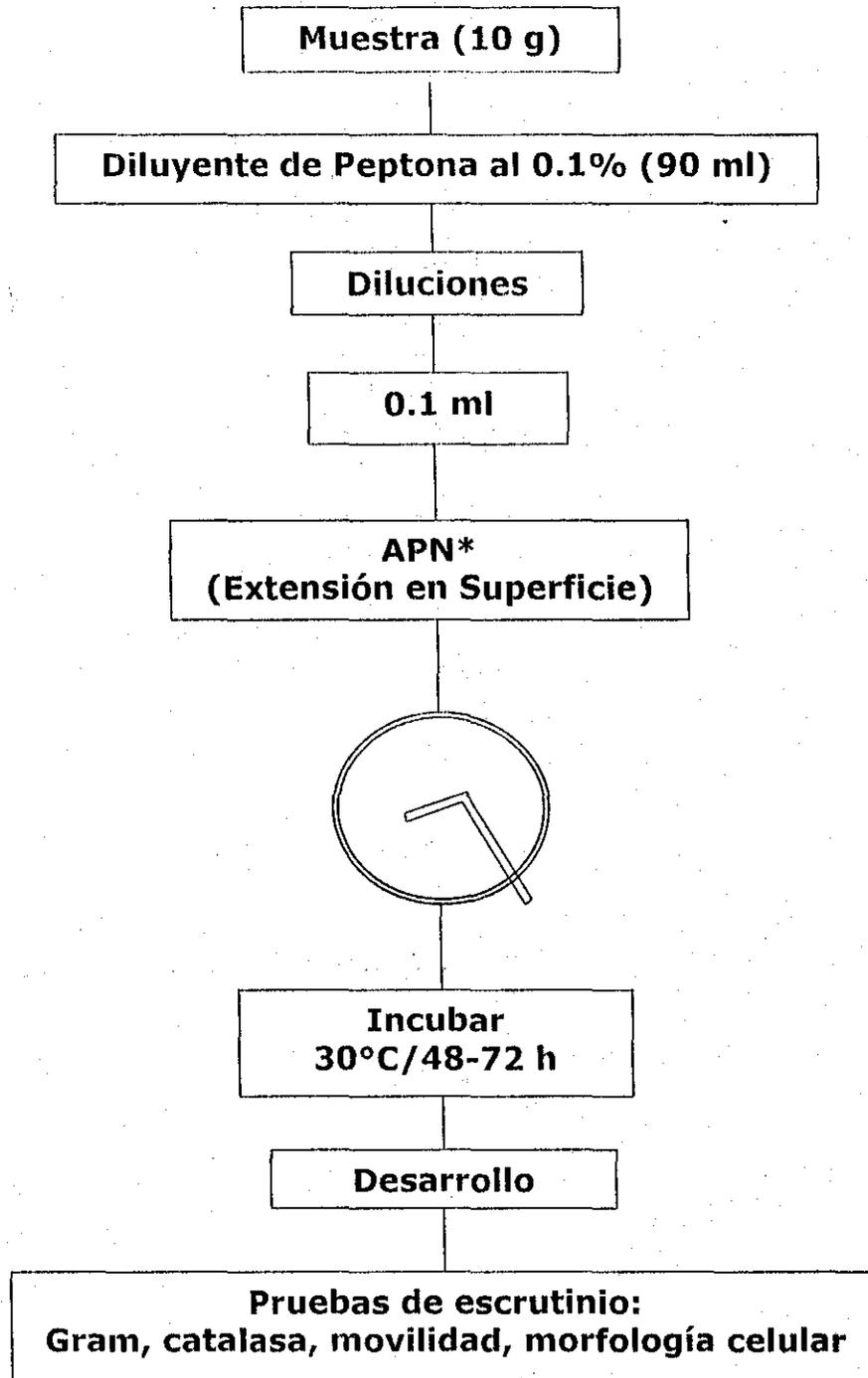
Se tomaron entre 10 y 15 colonias por muestra y se sometieron a pruebas de escrutinio: gram, catalasa, movilidad y morfología celular.

2.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE LOS LÁCTICOS AISLADOS

Diez colonias de lácticos por muestra fueron probadas para determinar su capacidad antagónica contra la cepa 1633 de *Listeria monocytogenes* (cepa indicadora) aislada de un queso fresco regional. El ensayo fue hecho siguiendo el procedimiento de inoculación por picadura propuesto por Gagliano y Hinsdill (1970), y empleando la base del medio de agar APN sin tween 80, ajustado a pH de 6.5 y con una concentración de glucosa de 0.2% y de agar de 0.75% (ABAPNmb).

El medio ABAPNmb (14 ml) fue licuado, conservado a 46°C en baño María e inoculado con $\approx 1 \times 10^5$ ufc/ml de un cultivo de la cepa indicadora en caldo base APN, sin tween 80, ajustado a pH 6.5 y con una concentración de glucosa de 0.2% (CBAPNm). Se homogeneizó la suspensión, se vertió sobre una placa de petri estéril y se dejó solidificar con la tapa entreabierta por 15 min. La placa fue luego sembrada por picadura con cada uno de los cultivos de 24 h desarrollados en la base del medio APN de las bacterias lácticas a probar e incubada a 30°C por 18-24 h.

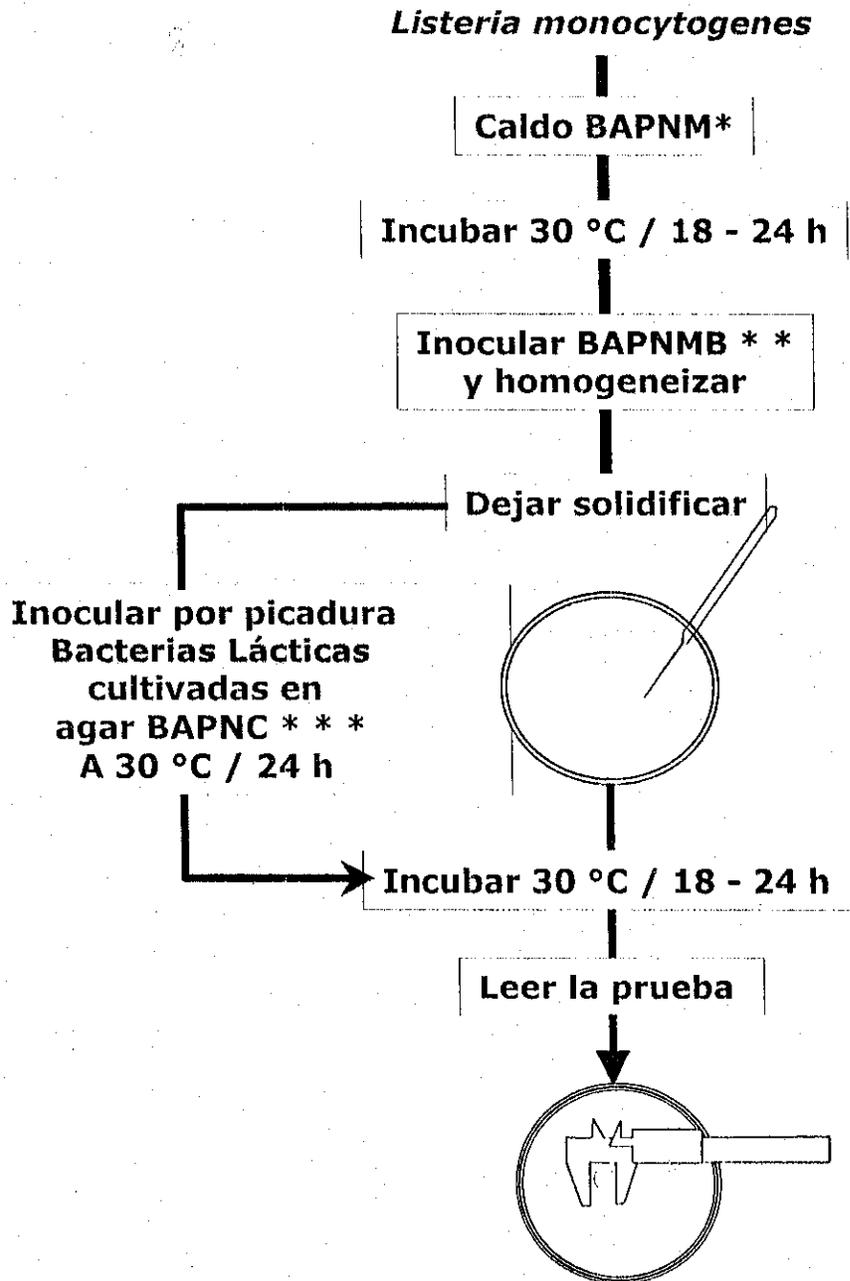
La presencia de halos de inhibición mayores de 1 mm, alrededor de las picaduras, fue considerada como prueba positiva (figura 3).



*APN: Medio de Actidiona-Polimixina-Nitrito

Figura 2. Aislamiento de bacterias ácido lácticas

TÉCNICA DE INOCULACIÓN POR PICADURA



* Caldo Base Actidiona-Polimixina-Nitrito modificado

** Agar Base Actidiona-Polimixina-Nitrito modificado blando

*** Agar Base Actidiona-Polimixina-Nitrito modificado para conservación de cepas

Figura 3. Determinación de la actividad antagónica de las cepas de bacterias ácido lácticas a *L. monocytogenes*

3.- DETERMINACIÓN DE LA BACTERIOCINOGENICIDAD DE LOS LÁCTICOS ANTAGÓNICOS

Para la detección de cepas bacteriocinogénicas se utilizó los principios de la técnica de la gota sobre la superficie (spot-on-lawn) inicialmente propuesta por Gratia (1946). Las cepas de lácticos que antagonizaron a la cepa indicadora se cultivaron en CBAPNm. Los cultivos de 24 h se centrifugaron a 12 000 rpm durante 20 min y los sobrenadantes se ajustaron a pH de 6.5 con una sol. de NaOH 1M; se esterilizaron por filtración (poro de 0.45 micras; millipore, USA) y se trataron con una solución de catalasa (Sigma Chemical, C-100) con 500 U/ml del sobrenadante por 30 minutos a 25°C (figura 4).

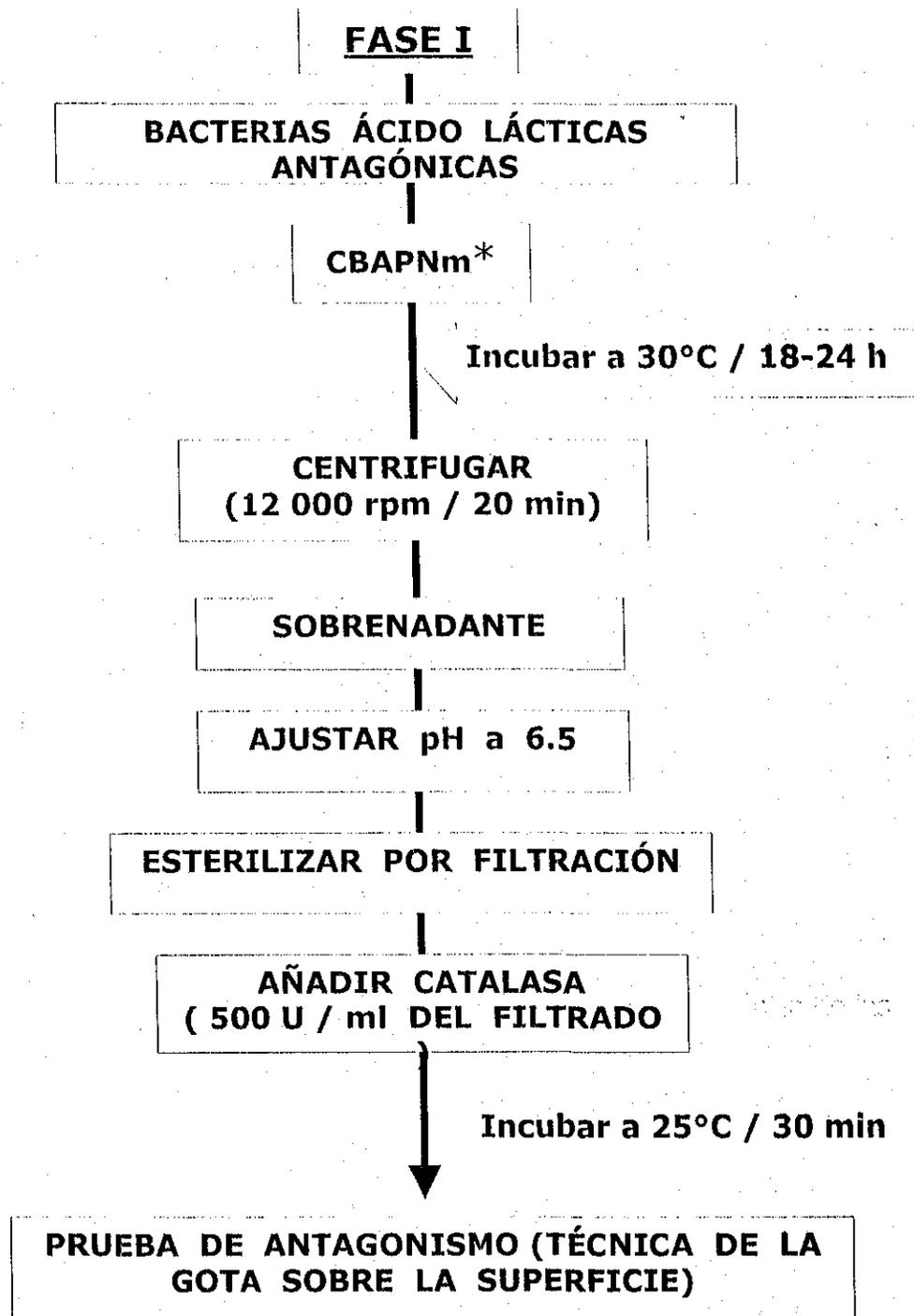
Se tomaron 5 microlitros del sobrenadante tratado y se colocaron sobre el medio de ABAPNm inoculado previamente con $\approx 1 \times 10^5$ cel/ml de un cultivo de 24 h en CABPNm de la cepa indicadora.

Una vez absorbido el inóculo, se incubaron las placas a 30°C por 18-24h. Transcurrido el tiempo de incubación se buscó la presencia de halos de inhibición en las áreas de inoculación de las cepas de lácticos probados (figura 5).

Susceptibilidad a enzimas proteolíticas

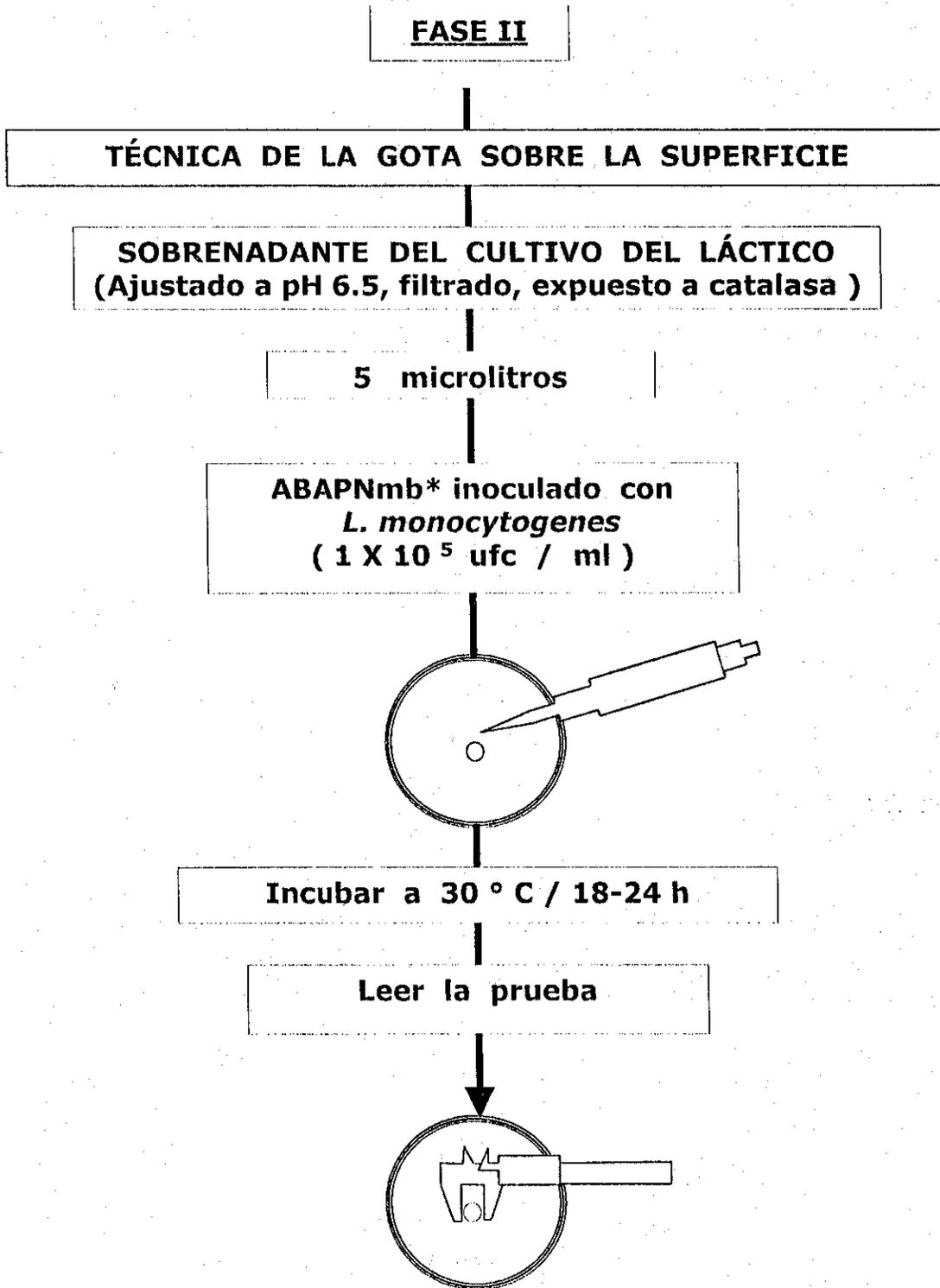
El cultivo que inhibió el desarrollo de *Listeria monocytogenes* fue cultivado, tratado y probado nuevamente siguiendo el procedimiento indicado anteriormente con la única diferencia que el cultivo del láctico, en su última etapa del tratamiento, fue expuesto por 1 h a 37°C a las enzimas: pepsina (mucosa de estómago de porcino; Sigma Chemical, P-7000), tripsina (páncreas de cerdo; United States Biochem Corp.), alfa quimiotripsina (páncreas de bovino, tipo II; Sigma Chemical, C-4129) y proteinasa K (fúngica; Gibco, BRL, 25530-015) en forma individual y a una concentración final de 0.1 mg/ml del sobrenadante.

Sobrenadante que no fue expuesto a las enzimas proteolíticas se incluyó como control (figura 6). El cultivo del láctico tratado con las enzimas proteolíticas, que no inhibió a la cepa indicadora, fue identificado como bacteriocinogénico, siempre y cuando su control lo hubiera hecho.



*=Caldo base de APN modificado
(glucosa al 0.2%, sin tween 80, pH 6.5)

Figura 4. Detección de actividad bacteriocinogénica de las bacterias ácido lácticas antagonistas



* Agar base APN modificado blando (glucosa al 0.2%, sin tween 80, pH 6.5 y agar al 0.75%)

Figura 5. Detección de la actividad bacteriocinogénica de las bacterias ácido lácticas antagónicas

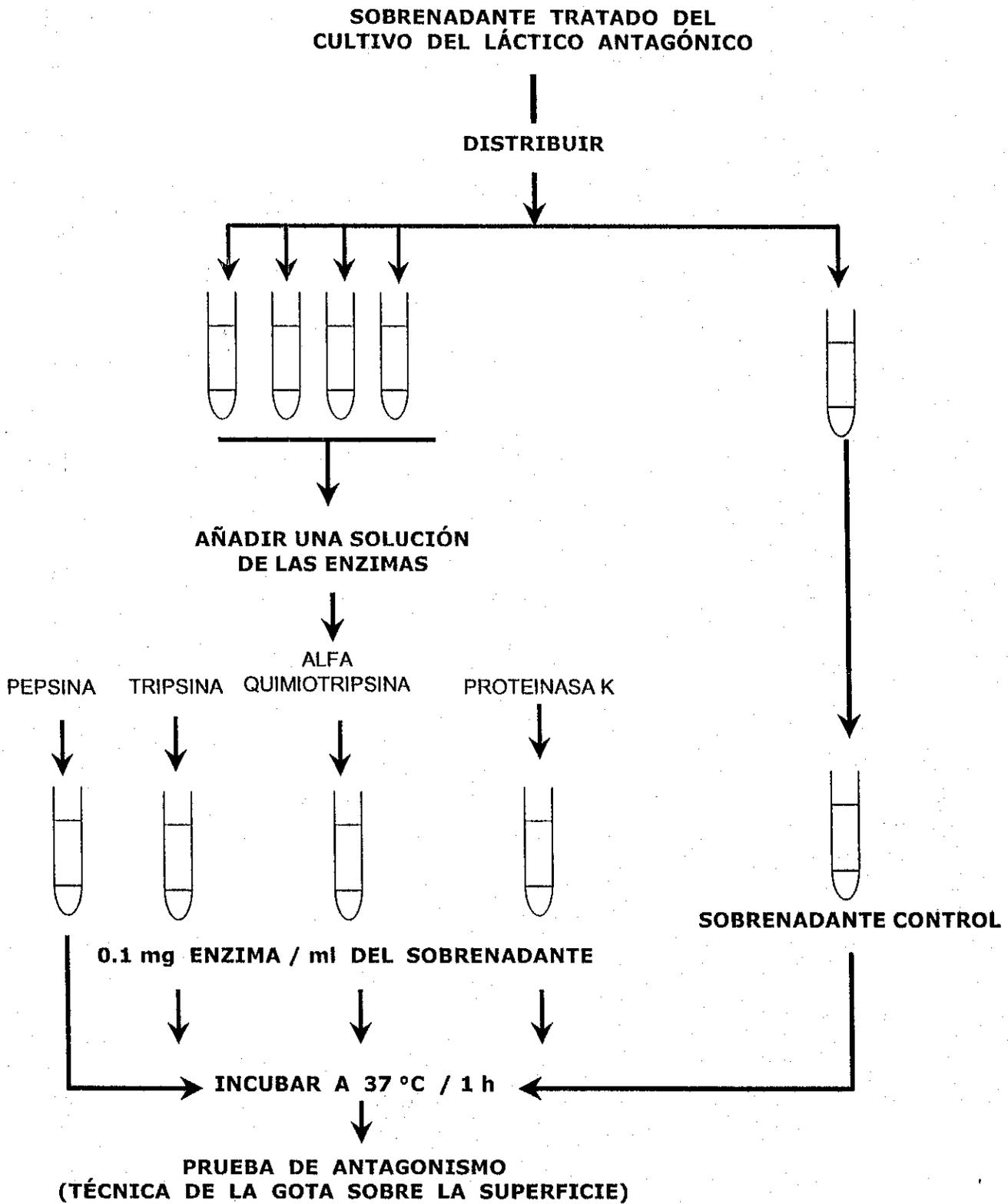


Figura 6. Susceptibilidad del agente inhibidor a enzimas proteolíticas

La bacteria láctica bacteriocinogénica fue luego identificada por medio del sistema API 50 CHL (API system, Montalieu, France).

4.- CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIOCINA

Efecto de la temperatura sobre la actividad de la bacteriocina

Sobrenadantes tratados (pH 6.5, estériles y expuestos a catalasa) del cultivo bacteriocinogénico fueron calentados a 80, 90 y 96°C en baño María durante 15, 30 y 60 min para cada temperatura. Una vez llevados a temperatura ambiente, los sobrenadantes tratados térmicamente fueron probados para determinar su actividad antimicrobiana contra la cepa indicadora mediante el método de la gota sobre la superficie (Gratia, 1946) (figura 7).

Efecto del pH sobre la actividad de la bacteriocina

Dos series de sobrenadantes centrifugados del cultivo bacteriocinogénico fueron ajustados a pH 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 y 7.5 con una solución de HCl 1N o NaOH 1M, esterilizados por filtración e inoculados con la bacteria indicadora cultivada en CBAPNm a 30°/18-24 h para obtener una concentración final de $\approx 1 \times 10^7$ células por mililitro de los sobrenadantes. A una de las series les fue agregada, además, una solución de alfa quimiotripsina (0.1 mg/ml) para inactivar la bacteriocina. Las suspensiones fueron incubadas a 37°C por 2 h. Se realizaron recuentos a cada suspensión de ambas series por la técnica de vaciado en placa (Swanson *et al.*, 1992) empleando el agar soya tripticasa extracto de levadura (ASTEL), al que se le adicionó una solución de alfa quimiotripsina para dar una concentración en el medio de 0.1 mg/ml e incubando a 30°C durante 18-24 h (figura 8). El procedimiento seguido en esta determinación, con algunas variantes, fue el diseñado por Ennahar *et al.* (1998a, 1998b). Se realizó un análisis estadístico empleando un modelo de regresión múltiple con los logaritmos de los sobrevivientes como variable respuesta y el pH y la presencia o ausencia de la bacteriocina como variables predictoras (Zar, 1999).

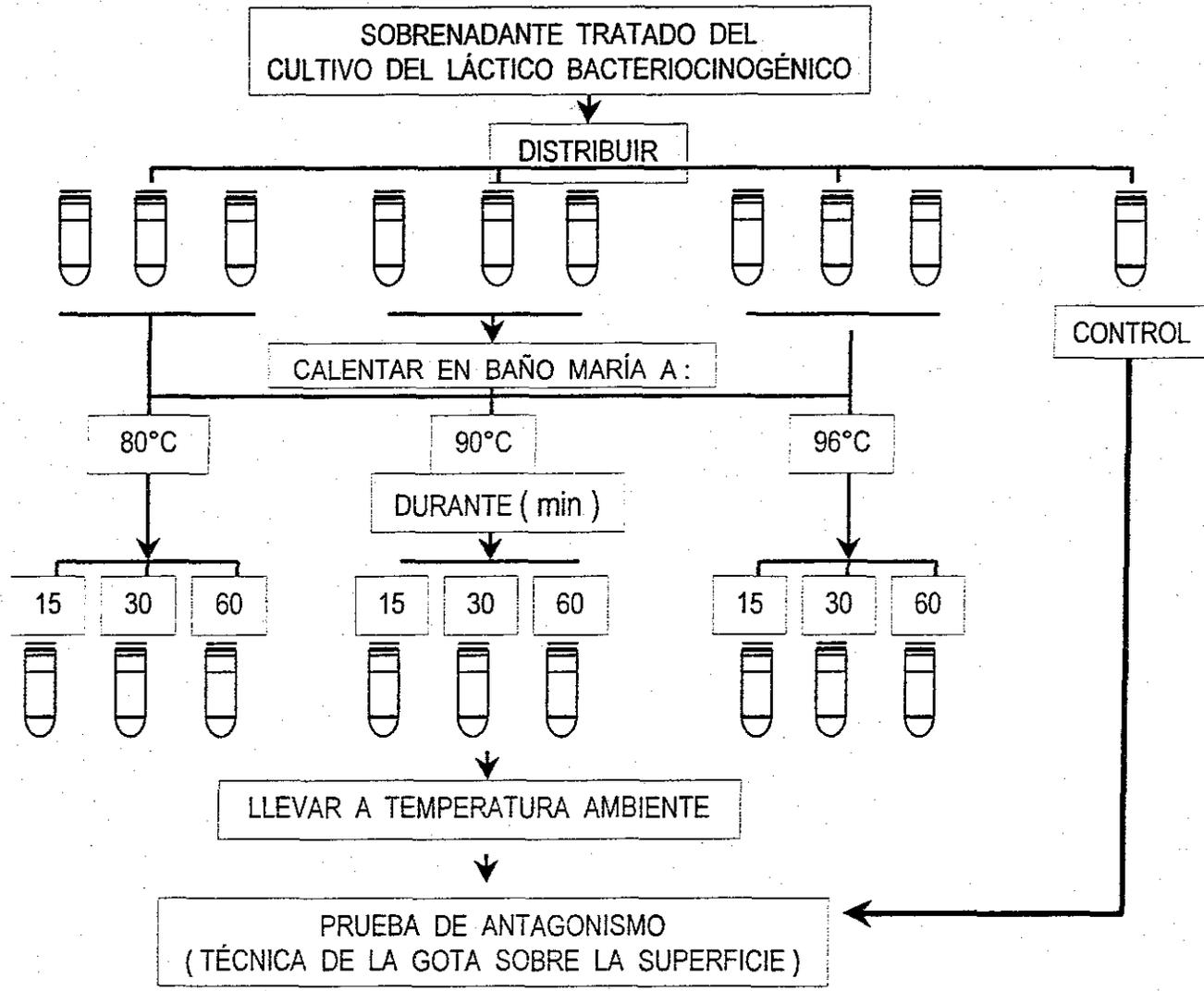


Figura 7. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la bacteriocina

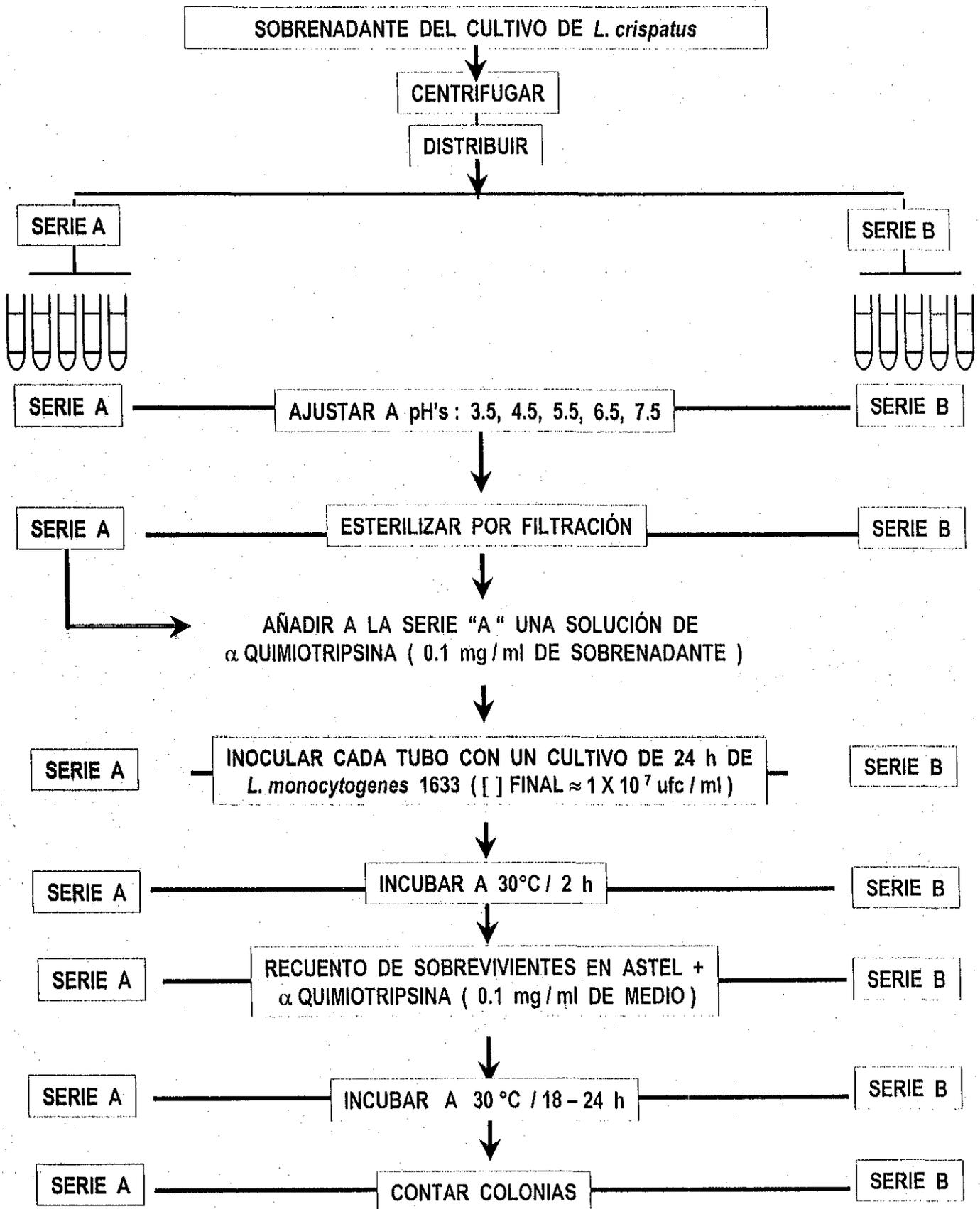


Figura 8. Efecto del pH sobre la actividad de la bacteriocina

Espectro de acción de la bacteriocina sobre cepas de L. monocytogenes

Se determinó, mediante la técnica de la gota sobre la superficie (Gratia, 1946), la actividad del sobrenadante bacteriocinogénico sobre 27 cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de quesos frescos y sobre 3 aislamientos asociados con brotes de listeriosis (Cuadro 1).

5. DETERMINACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE CEPAS DE *Listeria monocytogenes* DURANTE LA ELABORACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE QUESOS FRESCOS INOCULADO CON Y SIN UNA BACTERIA LÁCTICA BACTERIOCINOGÉNICA.

Se elaboraron quesos frescos empleando leche pasteurizada comercial negativa a la presencia de inhibidores según el método de ensayo en disco con *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (Maturin, 1995), y al cultivo de *Listeria* realizado por la técnica propuesta por la FDA (Hitchins, 1995).

Se realizaron 3 ensayos y cada uno incluyó: a) la elaboración de 2 quesos frescos, uno fabricado con leche inoculada solamente con el patógeno y otro inoculado con el patógeno y con la bacteria láctica bacteriocinogénica; b) toma de muestras por duplicado en las distintas etapas señaladas en la figura 9; c) el recuento de *Listeria monocytogenes*, bacterias ácido lácticas y la medición de pH y d) aplicación de la prueba t de Student a los resultados del comportamiento de las 3 cepas de *L. monocytogenes* en los quesos (Zar, 1999).

Los ensayos 1 y 2 se realizaron inoculando cepas de *Listeria monocytogenes* distintas, sensibles a la bacteriocina producida por el láctico bacteriocinogénico aislado e identificado (*Lactobacillus crispatus*) y en una relación aproximada de 1:10 con respecto al láctico.

En el ensayo 3 se utilizó una cepa de *Listeria monocytogenes* que mostró en su población células resistentes a la bacteriocina del láctico empleado, inoculándola en una relación aproximada de 1:1 con respecto al láctico.

Cuadro 1.- Cepas de *Listeria monocytogenes* empleadas en la determinación del espectro de acción del sobrenadante bacteriocinogénico

CEPA	ORIGEN
<i>L. monocytogenes</i> 104234	QUESO ADOBERA
<i>L. monocytogenes</i> 93232	QUESO ADOBERA
<i>L. monocytogenes</i> 42116	QUESO ADOBERA
<i>L. monocytogenes</i> 1633	QUESO ADOBERA
<i>L. monocytogenes</i> 2056	QUESO ADOBERA
<i>L. monocytogenes</i> 3690	QUESO ADOBERA
<i>L. monocytogenes</i> 3458	QUESO ADOBERA
<i>L. monocytogenes</i> 70266	QUESO PANELA
<i>L. monocytogenes</i> 53194	QUESO PANELA
<i>L. monocytogenes</i> 10	QUESO PANELA
<i>L. monocytogenes</i> 80319	QUESO PANELA
<i>L. monocytogenes</i> 6497	QUESO PANELA
<i>L. monocytogenes</i> 9	QUESO PANELA
<i>L. monocytogenes</i> 40144	QUESO PANELA
<i>L. monocytogenes</i> 4969	QUESO RANCHERO
<i>L. monocytogenes</i> 87130	QUESO RANCHERO
<i>L. monocytogenes</i> 50212	QUESO RANCHERO
<i>L. monocytogenes</i> 82325	QUESO RANCHERO
<i>L. monocytogenes</i> 83122	QUESO RANCHERO
<i>L. monocytogenes</i> 3458	QUESO RANCHERO
<i>L. monocytogenes</i> 735	QUESO RANCHERO
<i>L. monocytogenes</i> 725	QUESO RANCHERO
<i>L. monocytogenes</i> 3250	QUESO RANCHERO
<i>L. monocytogenes</i> 5185	QUESO RANCHERO
<i>L. monocytogenes</i> 72117	QUESO RANCHERO
<i>L. monocytogenes</i> 75109	QUESO RANCHERO
<i>L. monocytogenes</i> R01	QUESO RANCHERO
<i>L. monocytogenes</i> CA	Brote de listeriosis por queso
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	Brote de listeriosis por leche pasteurizada
<i>L. monocytogenes</i> V7	Leche cruda procedente de granja involucrada en brote de listeriosis

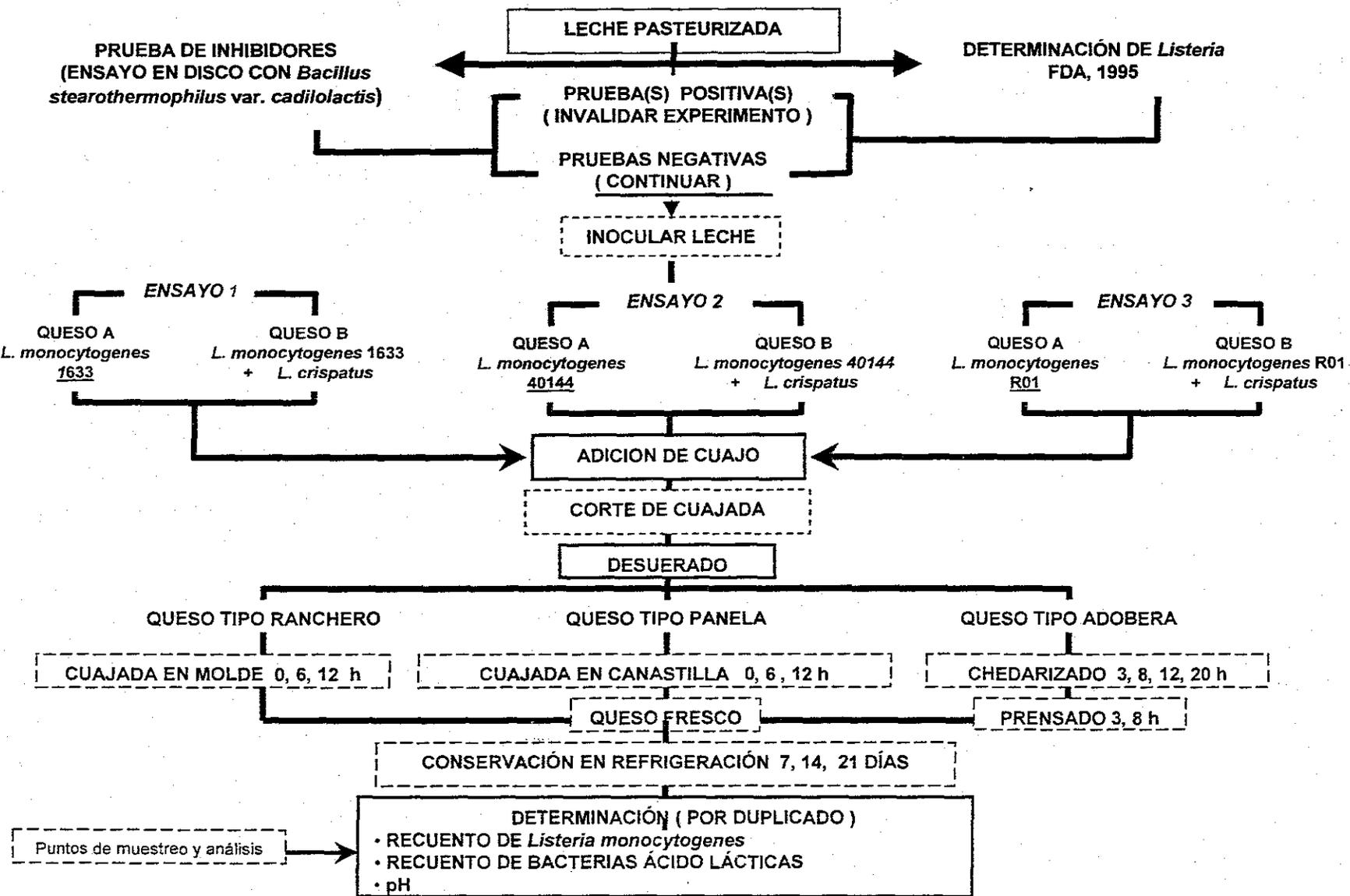


Figura 9. Destino de cepas de *Listeria monocytogenes* durante la elaboración y almacenamiento de quesos frescos inoculados artificialmente y adicionado o no de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico

Los cultivos de *Listeria monocytogenes* y de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico empleados en la inoculación de la leche para los 3 ensayos, fueron obtenidos por el procedimiento esquematizado en la figura 10.

El recuento de *Listeria monocytogenes* se realizó inoculando 0.1 ml de cada dilución de la muestra en el medio de agar Vogel Johnson Modificado (AVJM) (Buchanan *et al.*, 1987) sembrado por extensión en superficie (Swanson *et al.*, 1992). El AVJM se formuló siguiendo las recomendaciones de Smith y Buchanan (1990), quienes reducen en un 50% las concentraciones del moxalactam, ac. nalidixico y bacitracina y añaden el tween 80 al 0.4%.

Las placas se incubaron a 30°C por 48-72 h y se contaron las colonias reductoras de telurito (completamente negras), no fermentadoras de manitol, brillantes, convexas y de 2-4 mm de diámetro. Una colonia con las características antes señaladas (colonias sospechosas), fue tomada por muestra y confirmada por las pruebas: gram, catalasa, movilidad e iluminación de Henry (Hitchins, 1995; Mc Faddin, 1980) (figura 11).

Para el recuento de bacterias lácticas se utilizó la técnica de inoculación por extensión en superficie (Swanson *et al.*, 1992) empleando el medio APN (Davidson y Cronin, 1973) e incubando a 30°C por 48-72h (figura 2). El total de colonias desarrolladas en el medio fueron consideradas lácticas con base a lo señalado por Davison y Cronin (1973).

El pH de las muestras fue determinado potenciométricamente en 10 g de muestra.

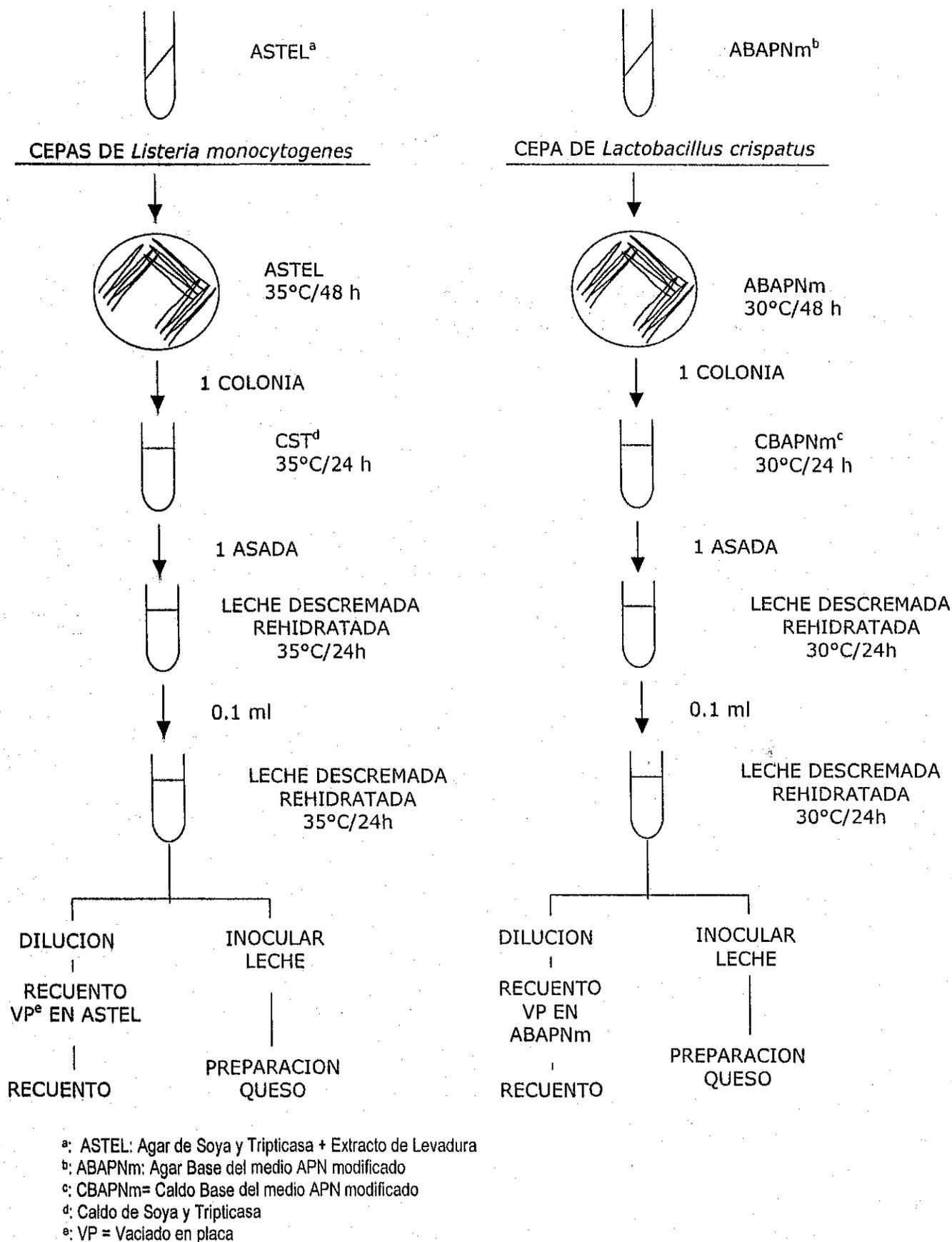


Figura 10. Obtención de cultivos de *L. monocytogenes* y *L. crispatus* empleados para inocular la leche usada para la elaboración de los quesos

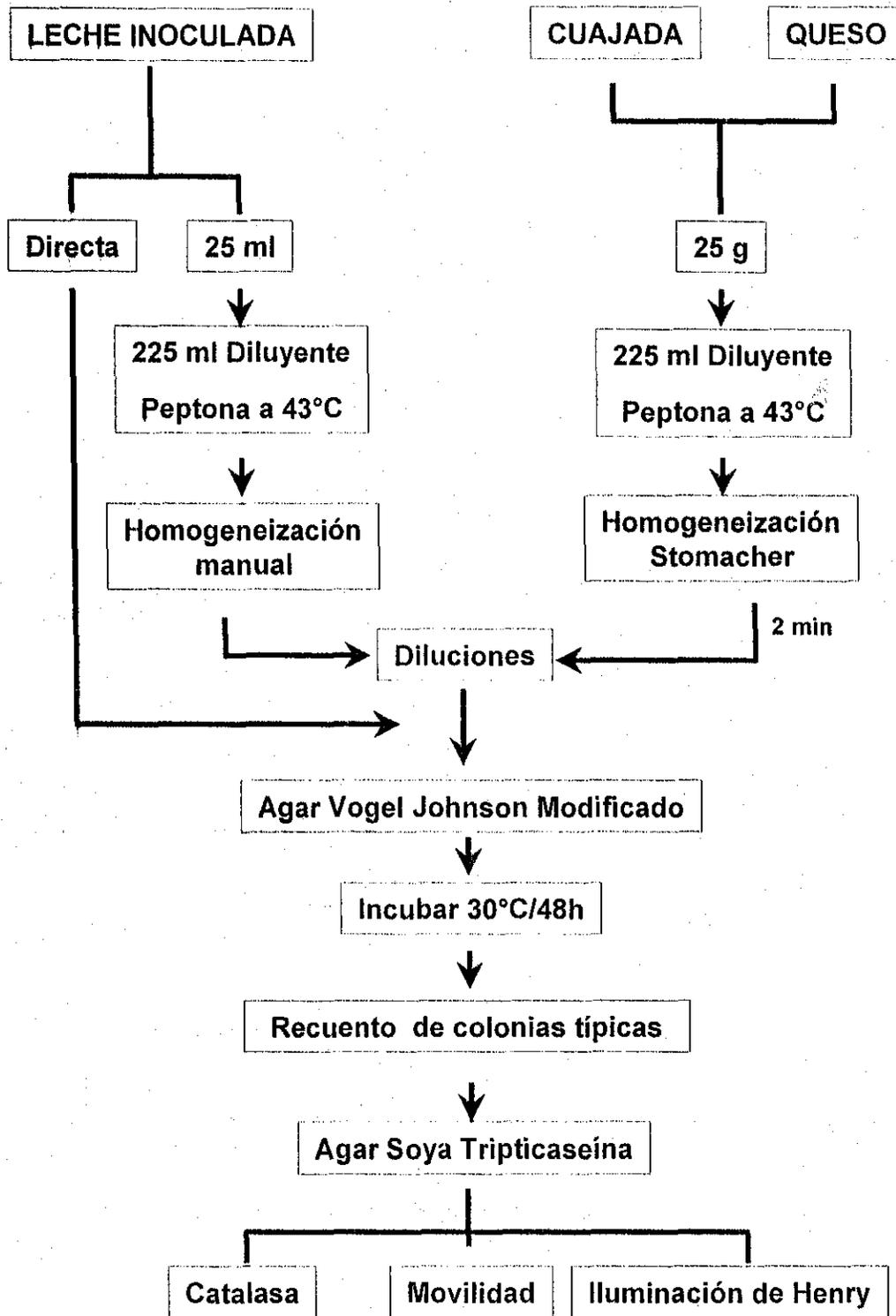


Figura 11. Recuento de *Listeria monocytogenes* por siembra directa en placa

III. RESULTADOS

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE LOS LÁCTICOS AISLADOS

De las 340 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de los quesos frescos, sólo 6 inhibieron el desarrollo de la cepa indicadora cuando se sometieron a la prueba de antagonismo y el diámetro de los halos de inhibición fluctuó entre 2 y 14.5 mm (Figura 12).

DETERMINACIÓN DE LA BACTERIOCINOGENICIDAD DE LOS LÁCTICOS ANTAGÓNICOS

Sólo una cepa de los lácticos que resultaron antagónicos, identificado como *Lactobacillus crispatus*, mantuvo su efecto antimicrobiano después de que el sobrenadante del cultivo fue ajustado a pH 6.5 y la enzima catalasa fue añadida, lo que evidencia que el efecto inhibitor no fue debido a un pH ácido ni a la presencia de peróxido de hidrógeno, sino a una sustancia antimicrobiana distinta excretada en el caldo (Figura 13).

Susceptibilidad a enzimas proteolíticas

Cuando el sobrenadante de *Lactobacillus crispatus* fue tratado y expuesto a las enzimas tripsina, alfa quimiotripsina y proteinasa K, su acción antimicrobiana fue anulada, confirmando la naturaleza proteica del agente inhibitor y definiéndola como una bacteriocina.

CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIOCINA

Efecto de la temperatura sobre la actividad de la bacteriocina

La actividad antimicrobiana de la bacteriocina no fue afectada después de ser calentado el sobrenadante a 80 y 90 °C, y aunque a 96° el diámetro del halo de inhibición se redujo entre un 45 y 55 %, según el tiempo de exposición, el efecto

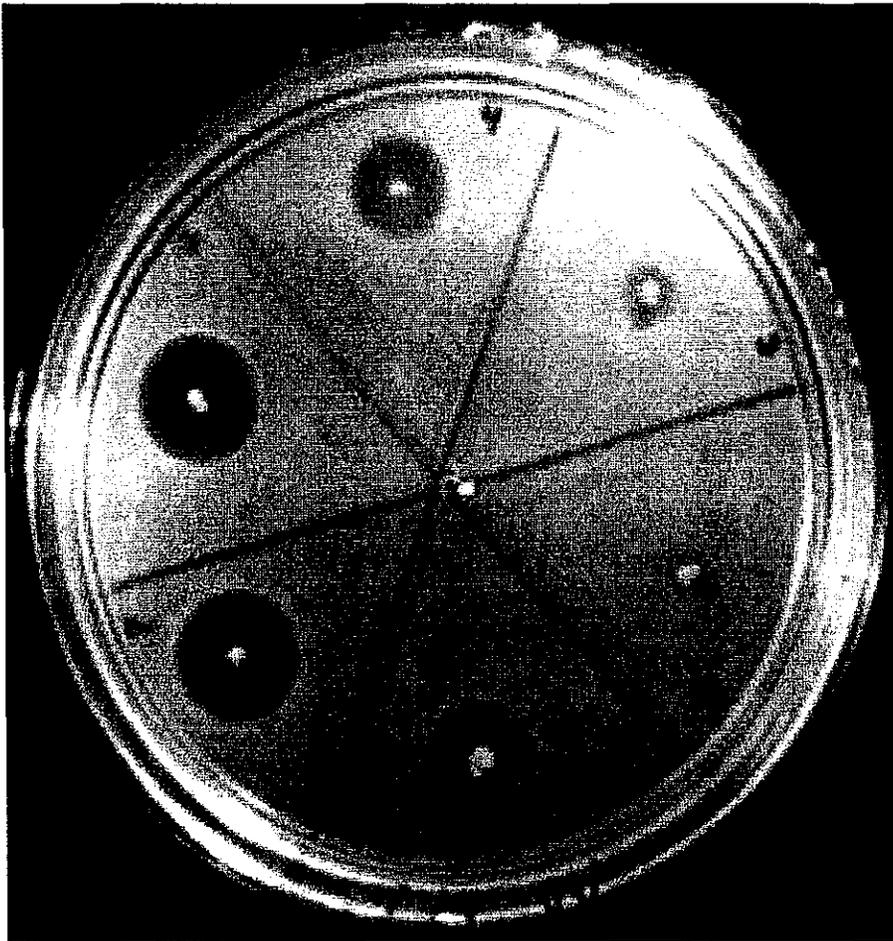


Figura 12. Antagonismo mostrado por 6 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de quesos frescos contra *L. monocytogenes* 1633 retados por la técnica de picadura.

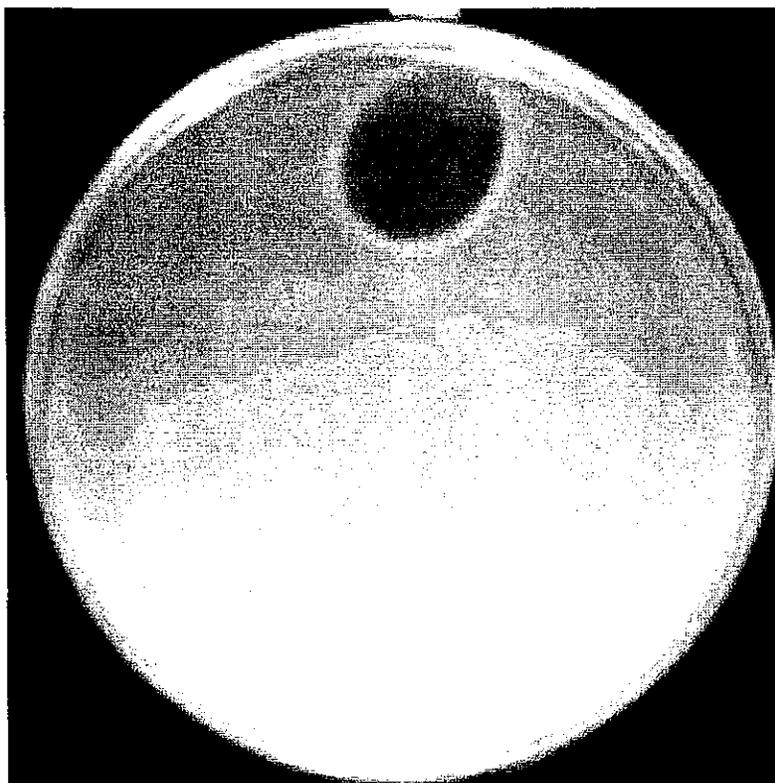


Figura 13. Inhibición de *Listeria monocytogenes* 1633 por el sobrenadante tratado (ajustado a pH 6.5 y expuesto a catalasa) de *Lactobacillus crispatus* retados por el método de la gota sobre la superficie

inhibidor siguió siendo evidente (Cuadro 2), calificándola como una bacteriocina termoestable.

Efecto del pH sobre la actividad de la bacteriocina

La figura 14 muestra que la actividad antimicrobiana de la bacteriocina de *Lactobacillus crispatus* no fue afectada a los pH's a los que fue ajustado el sobrenadante ($p < 0.01$), reduciendo de 4-5 log el desarrollo de la cepa de *Listeria monocytogenes* 1633 utilizada como microorganismo indicador.

Espectro de acción de la bacteriocina sobre cepas de *L. monocytogenes*

La bacteriocina resultó inhibitoria a 25 de las 30 cepas de *Listeria monocytogenes* estudiadas. Las 3 cepas del patógeno relacionadas con brotes de listeriosis vehiculizadas por alimentos y 22 de las 27 cepas aisladas de quesos frescos de la región, fueron inhibidas por la bacteriocina. Solo una cepa del patógeno resultó resistente a la bacteriocina y 4 fueron parcialmente resistentes (Cuadro 3).

COMPORTAMIENTO DE *Listeria monocytogenes* DURANTE LA ELABORACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE QUESOS FRESCOS INOCULADOS CON Y SIN *Lactobacillus crispatus* BACTERIOCINOGENICO

ENSAYO 1

Cuando el queso fue preparado con leche inoculada exclusivamente con *Listeria monocytogenes* 1633, el patógeno mostró un incremento en su número de 3 logaritmos al concluir la elaboración del queso y aumentó casi un logaritmo después de 7 días de conservación del producto para luego reducir ligeramente su número al concluir el ensayo. No ocurrió así en el queso fabricado con leche inoculada además con *Lactobacillus crispatus*. *Listeria monocytogenes* inició con una tendencia a la baja, alcanzando una reducción de 2.6 log en la cuajada conservada por 12 h en

Cuadro 2. Efecto de la temperatura y tiempo de exposición sobre la actividad de la bacteriocina

Control (sin tratar)		Tiempo de exposición (min)	Temperatura °C					
			80		90		96	
Actividad antimicrobiana	Diámetro halo de inhibición (mm)		Actividad antimicrobiana	Diámetro halo de inhibición (mm)	Actividad antimicrobiana	Diámetro halo de inhibición (mm)	Actividad antimicrobiana	Diámetro halo de inhibición (mm)
+	22	15	+	22	+	19	+	12
		30	+	20	+	18	+	11
		60	+	20	+	19	+	10

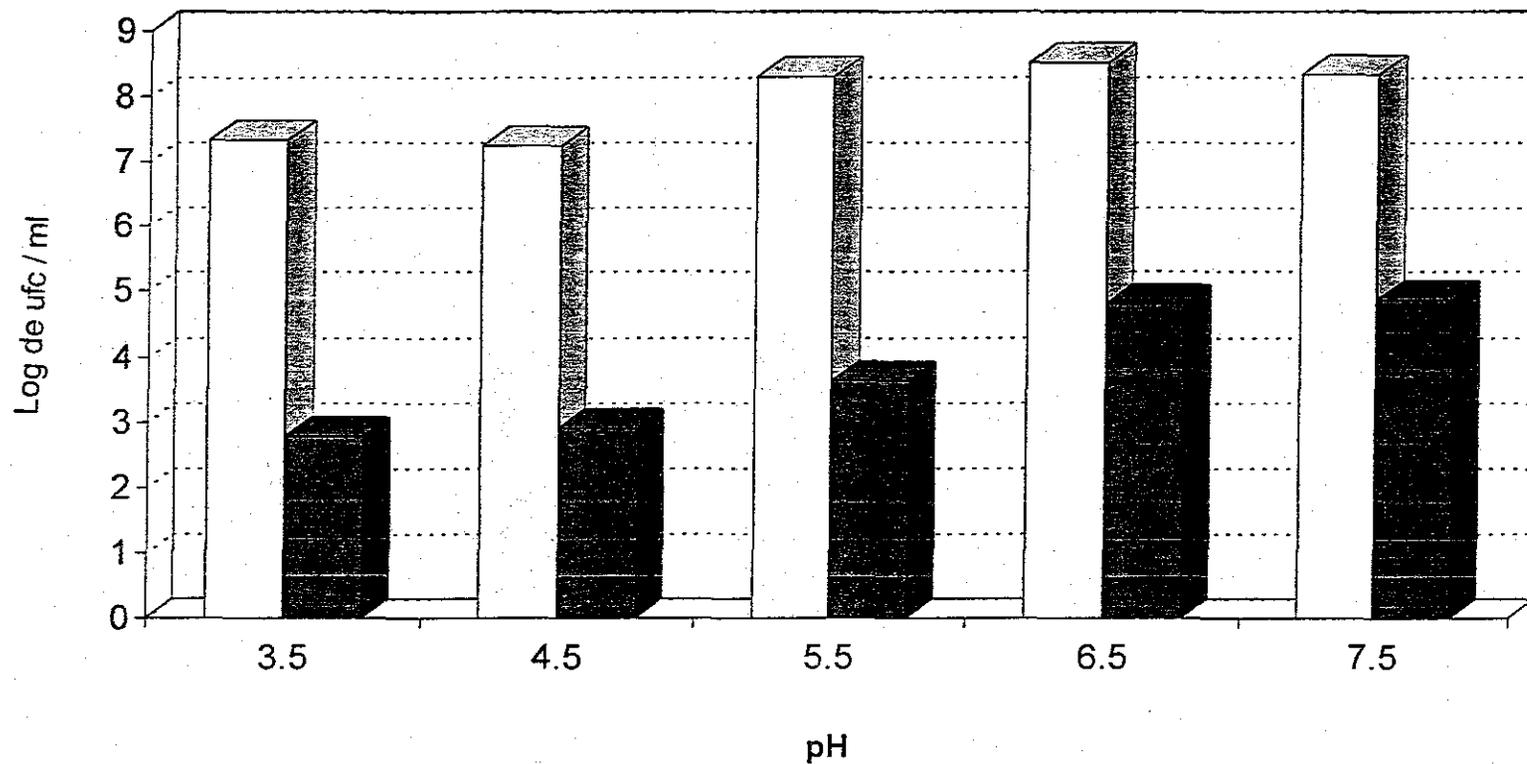


Figura 14. Supervivencia de *L. monocytogenes* 1633 inoculada en : □ sobrenadante de *Lactobacillus crispatus* adicionado de alfa quimiotripsina (0.1 mg/ml); ■ , sobrenadante de *Lactobacillus crispatus* sin alfa quimiotripsina , según pH del sobrenadante e incubado a 37 °C por 2 horas.

Cuadro 3. Espectro de acción antimicrobiana del sobrenadante de *Lactobacillus crispatus* sobre cepas de *Listeria monocytogenes*

ORIGEN DE LA CEPA	No. DE CEPAS ESTUDIADAS	SUSCEPTIBILIDAD A LA BACTERIOCINA	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN LÍMITES: MÍNIMO-MÁXIMO
Queso adobera	7	+	13.2-19.0
Queso panela	7	+	12.0-16.5
Queso rancho	8	+	14.0-20.0
Brotos de <i>Listeriosis</i>	3	+	12.0-14.0
Queso rancho	4	±*	
Queso rancho	1	-	

* Parcialmente resistentes

molde y continuó con un incremento que logró rebasar, al concluir el almacenamiento del queso, solo ligeramente el número de listerias inoculadas en la leche (Figura 15). La reducción en los niveles de *L. monocytogenes* encontrados durante la elaboración y almacenamientos del queso co-inoculado con *L. crispatus*, resultó ser estadísticamente diferente ($p < 0.01$) a los encontrados en el queso inoculado exclusivamente con el patógeno.

Por su parte, las bacterias lácticas mostraron en general un incremento sostenido durante el proceso de fabricación y almacenamiento de los 2 quesos. Notorio fue el incremento observado en el queso elaborado con leche que no fue inoculada con *Lactobacillus crispatus*, ya que aumentó en más de 7 log del inicio del experimento a su conclusión, a diferencia del inoculado con el láctico que sólo aumentó en aproximadamente 2 log (Figura 16).

El pH detectado en los dos quesos, y en sus dos etapas, fue similar con una tendencia a la baja para finalizar con un valor aproximado de 5.3 para el queso inoculado exclusivamente con el patógeno y de 5.16 para el queso inoculado con ambas bacterias (Figura 17).

ENSAYO 2

Cuando se inoculó la cepa 40144 de *Listeria monocytogenes* en la leche empleada en la preparación del queso fresco, se encontró que la bacteria, en ausencia del láctico bacteriocinogénico, desarrolló e incrementó su número en poco más de 2 logaritmos al finalizar la etapa de fabricación del queso. Al término de la conservación del producto (21 días a 4°C), el patógeno alcanzó a rebasar 3 logaritmos más al inóculo empleado en la leche.

La presencia de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico inoculado conjuntamente con el patógeno en la preparación del segundo queso, logró reducir, durante la etapa de elaboración del queso, casi un logaritmo el número inicial de *L. monocytogenes* para después permitir su desarrollo y alcanzar en la etapa de conservación del producto 0.71 logaritmos más del inóculo empleado (Figura 18). Esta reducción observada en el patógeno a partir de la cuajada en canastilla de 6 h, fue significativa ($p < 0.05$).

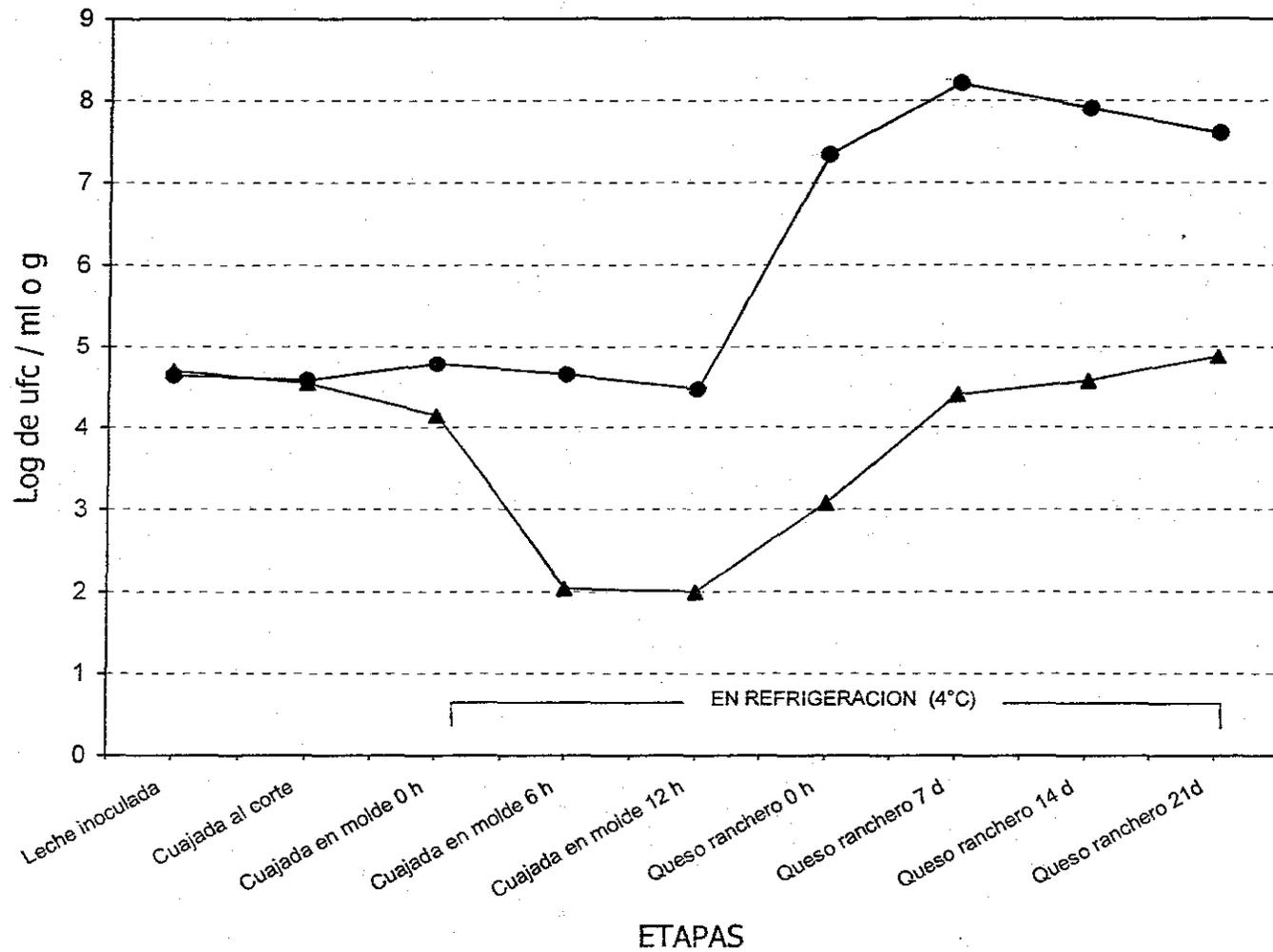


FIGURA 15. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* 1633 durante la fabricación y almacenamiento de queso ranchero inoculado en ausencia (●) o presencia (▲) de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico.

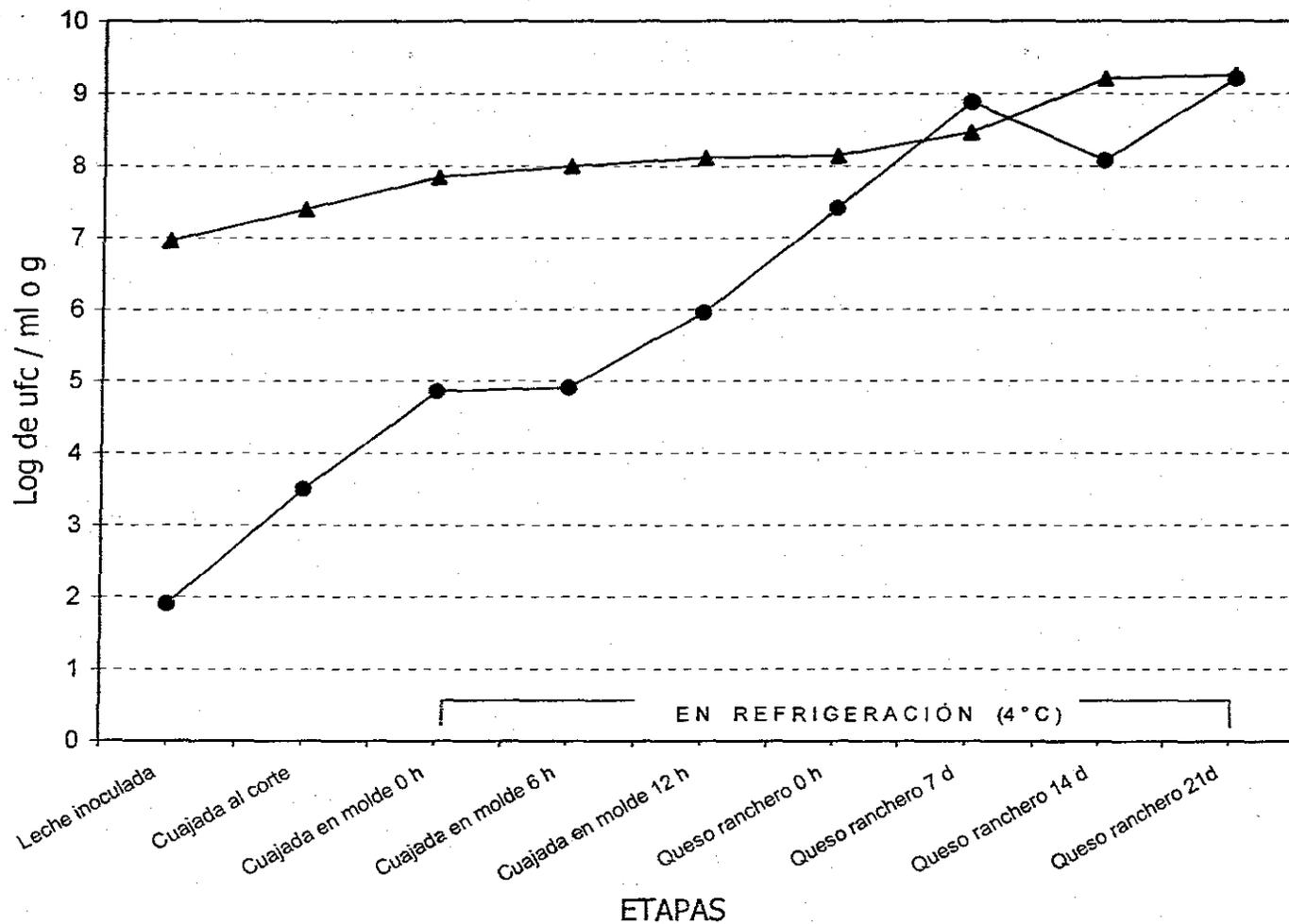


FIGURA 16. Comportamiento de las bacterias ácido lácticas durante la fabricación y almacenamiento de queso ranchero inoculado con *Listeria monocytogenes* 1633 en ausencia (●) o presencia (▲) de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico.

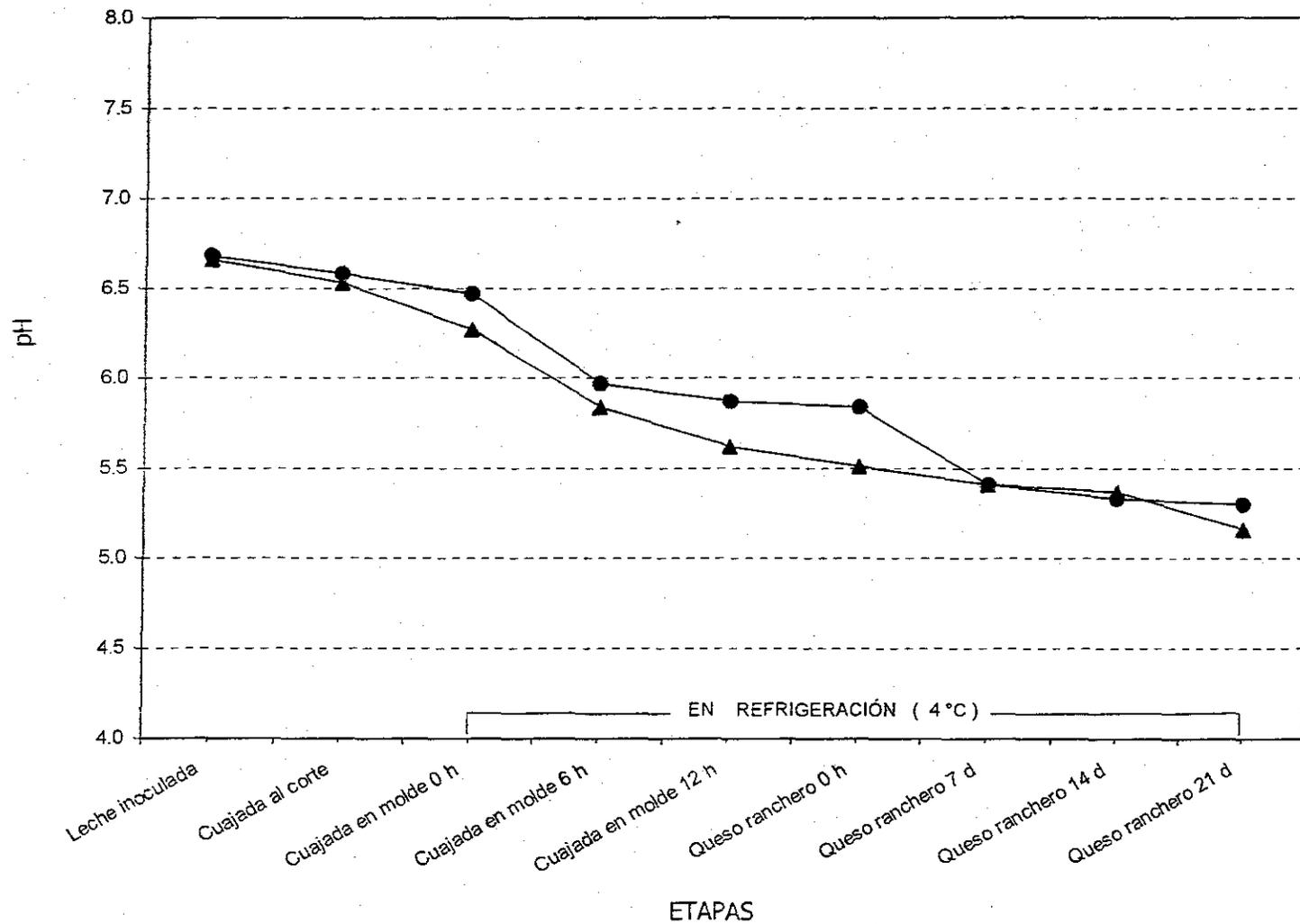


FIGURA 17. Comportamiento del pH durante la fabricación y almacenamiento de queso ranchero inoculado con *Listeria monocytogenes* 1633 en ausencia (●) o presencia (▲) de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico.

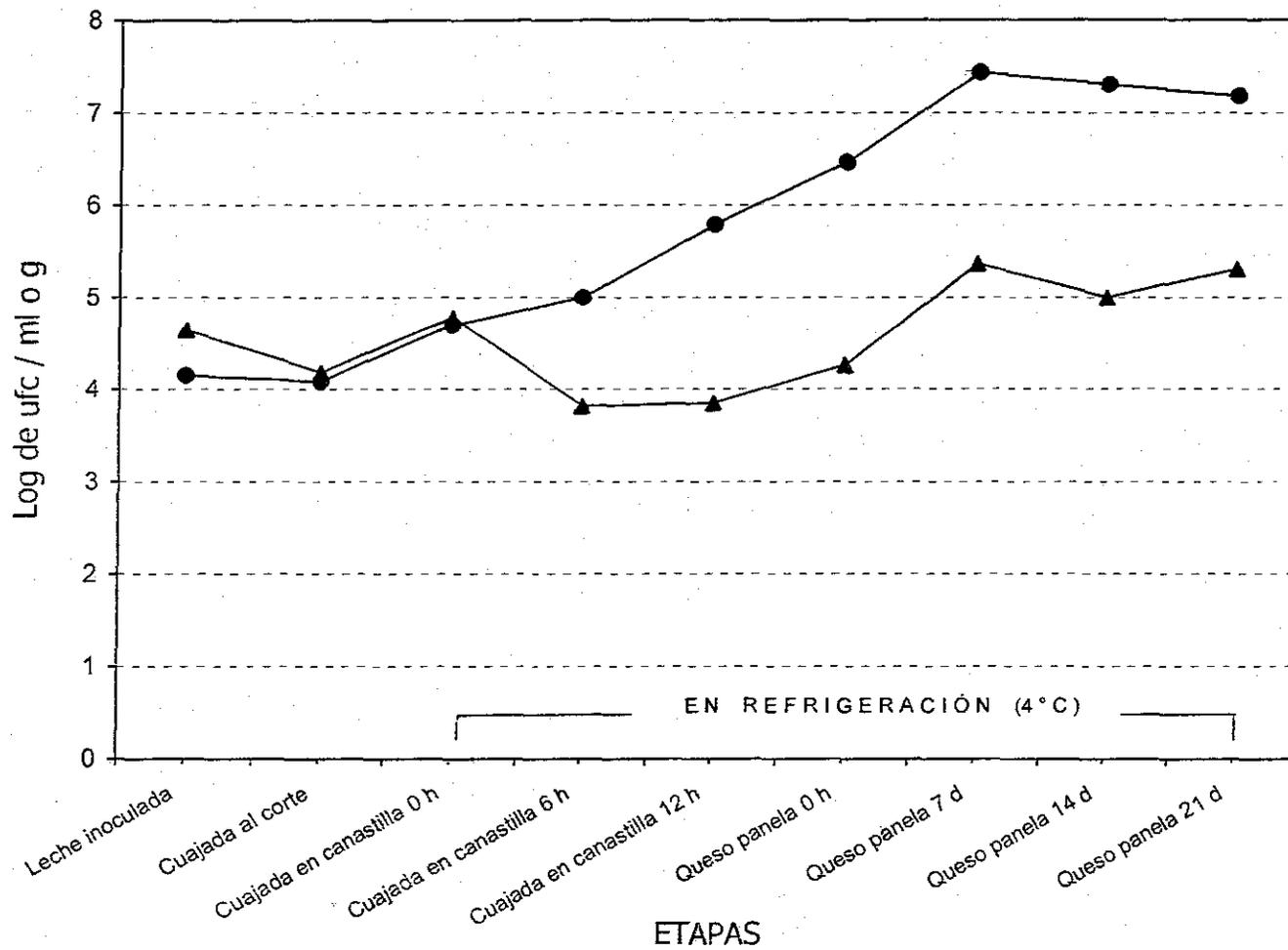


FIGURA 18. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* 40144 durante la fabricación y almacenamiento de queso panela inoculado en ausencia (●) o presencia (▲) de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico.

El comportamiento de las bacterias lácticas durante la elaboración y almacenamiento de ambos quesos fue similar al observado en el ensayo 1, un incremento sostenido hasta rebasar los 9 logaritmos al término del estudio (Figura 19).

Un resultado similar fue detectado también entre ambos ensayos en lo que se refiere al pH, tendencia a la baja hasta alcanzar valores de 5.2 en ambos quesos (Figura 20).

ENSAYO 3

El comportamiento presentado por la cepa R01 de *Listeria monocytogenes* fue similar al mostrado por las otras 2 cepas del patógeno empleadas en los anteriores experimentos, cuando el queso fue elaborado empleando leche pasteurizada inoculada solo con el patógeno y conservándolo en las condiciones ya citadas. Esta cepa, que mostró en su población colonias resistentes al efecto antimicrobiano de la bacteriocina de *Lactobacillus crispatus*, fue capaz de elevar su número un poco más de 3 logaritmos en comparación al inóculo inicial, aún en presencia del láctico bacteriocinogénico (Figura 21). A diferencia de los ensayos anteriores, en éste, no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) en el comportamiento del patógeno en presencia y ausencia del láctico bacteriocinogénico.

La dinámica mostrada por los lácticos en ambos quesos fue igual a la manifestada en los ensayos 1 y 2, incrementos sostenidos hasta igualar su número al final del ensayo, que en este caso, estuvo por arriba de los 8 logaritmos (Figura 22).

Respecto al pH, los quesos llegaron a tener valores por debajo de 5 a los 7 días de conservado el producto, para terminar con valores entre 5.05 y 5.08 (Figura 23).

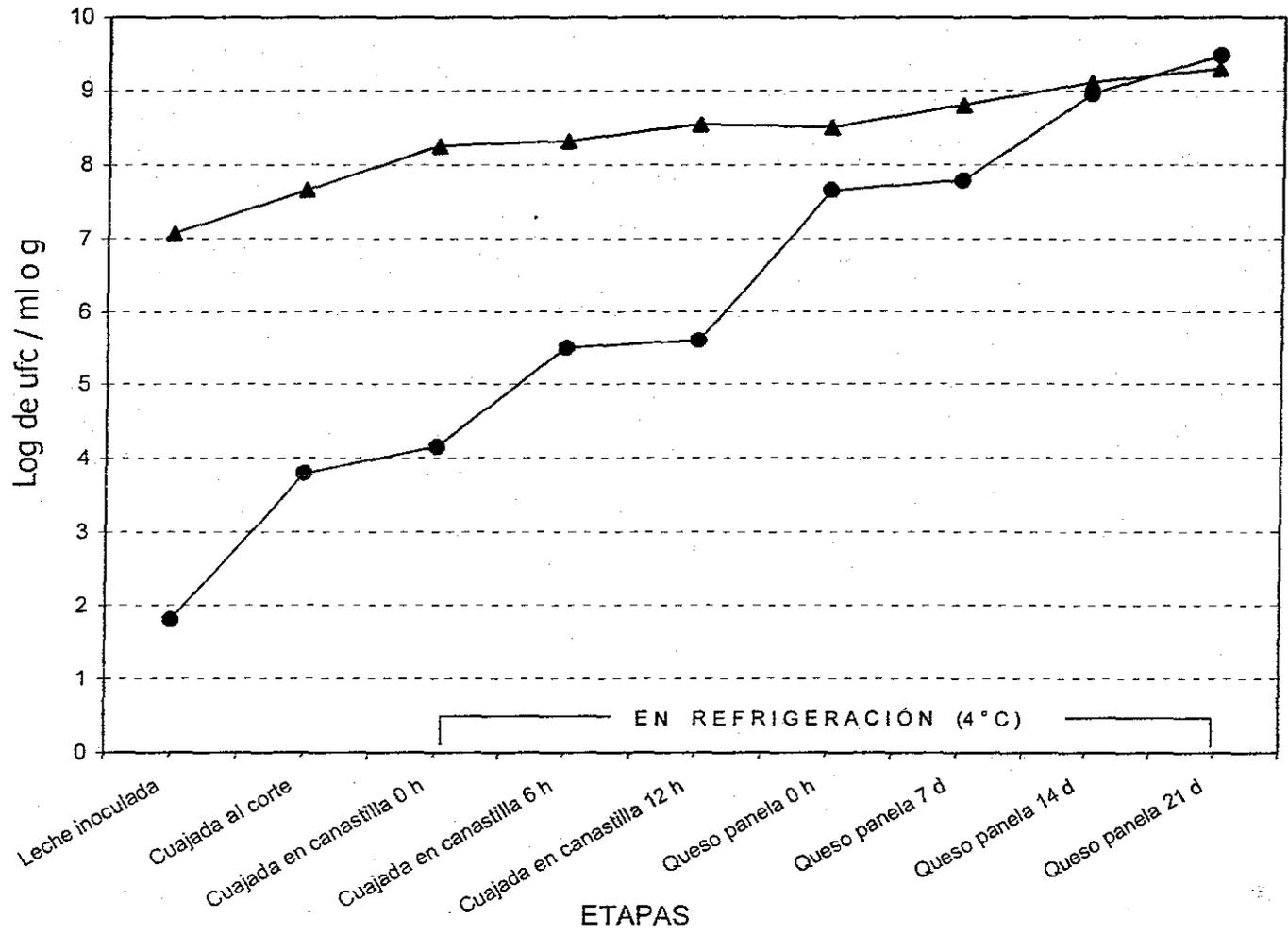


FIGURA 19. Comportamiento de las bacterias ácido lácticas durante la fabricación y almacenamiento de queso panela inoculado con *Listeria monocytogenes* 40144 en ausencia (●) o presencia (▲) de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico.

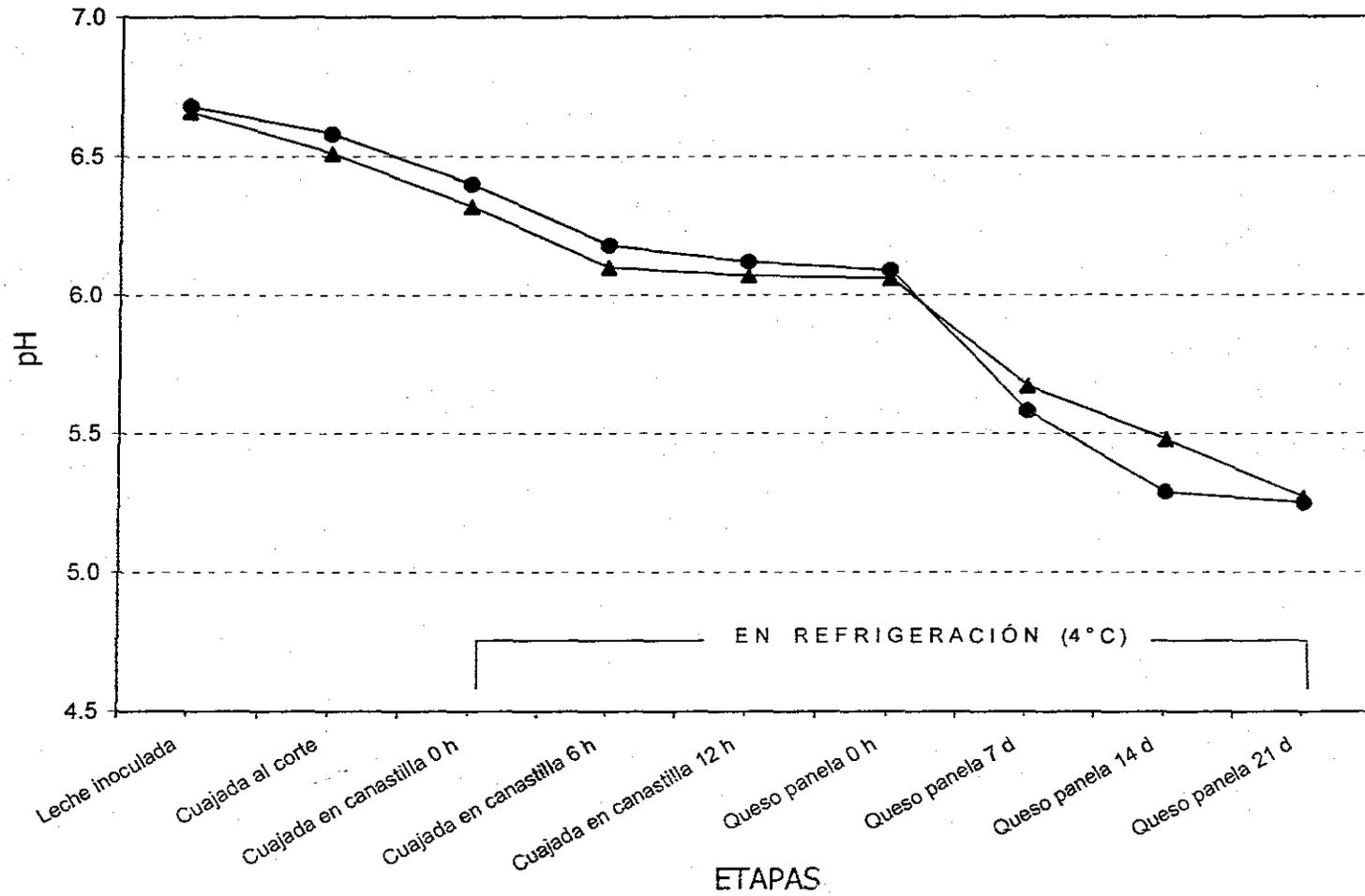


FIGURA 20. Comportamiento del pH durante la fabricación y almacenamiento de queso panela inoculado con *Listeria monocytogenes* 40144 en ausencia (●) o presencia (▲) de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico.

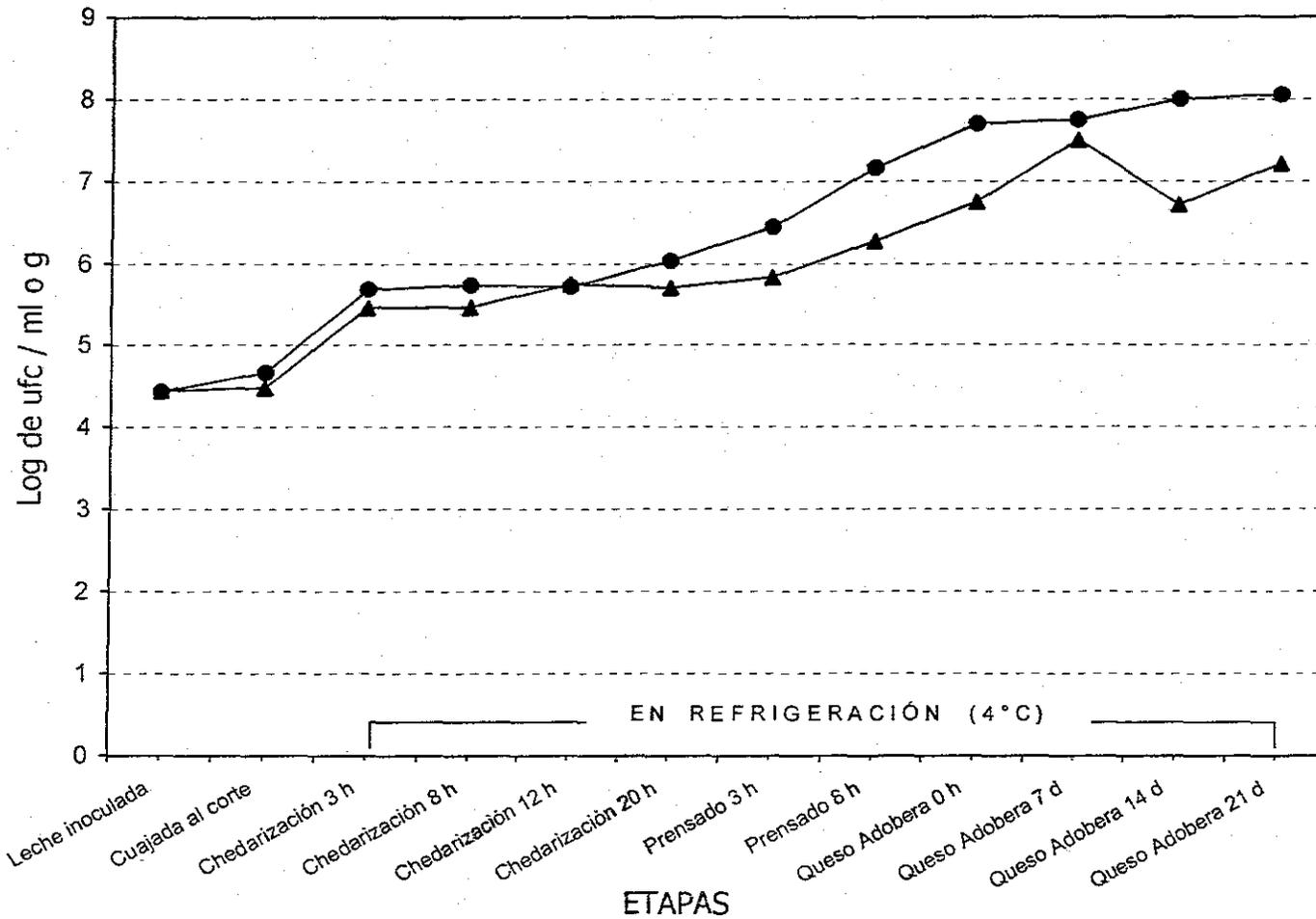


FIGURA 21. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* R01 durante la fabricación y almacenamiento de queso adobera inoculado en ausencia (●) o presencia (▲) de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico

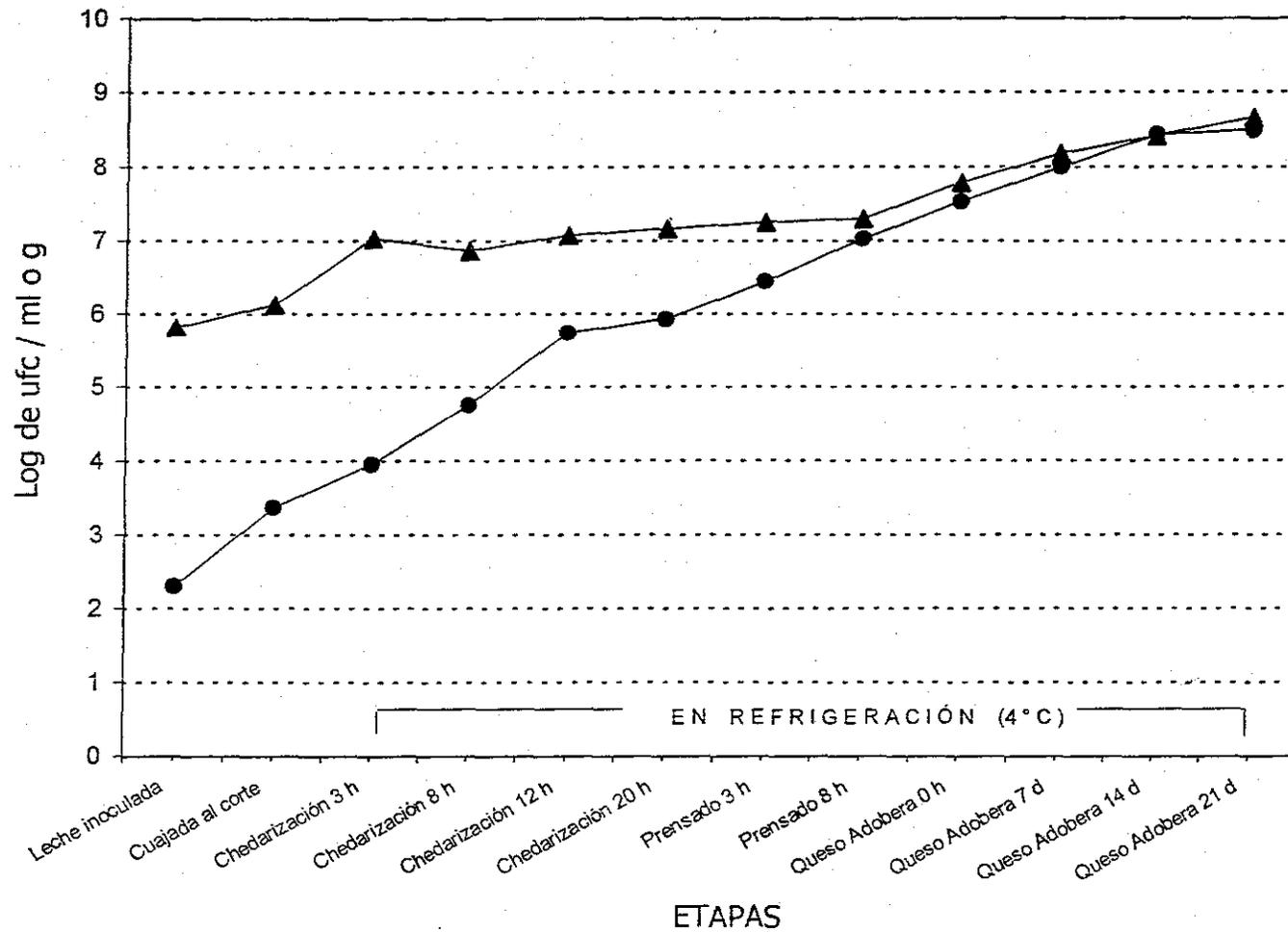


FIGURA 22. Comportamiento de las bacterias ácido lácticas durante la fabricación y almacenamiento de queso adobera inoculado con *Listeria monocytogenes* R01 en ausencia (●) o presencia (▲) de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico

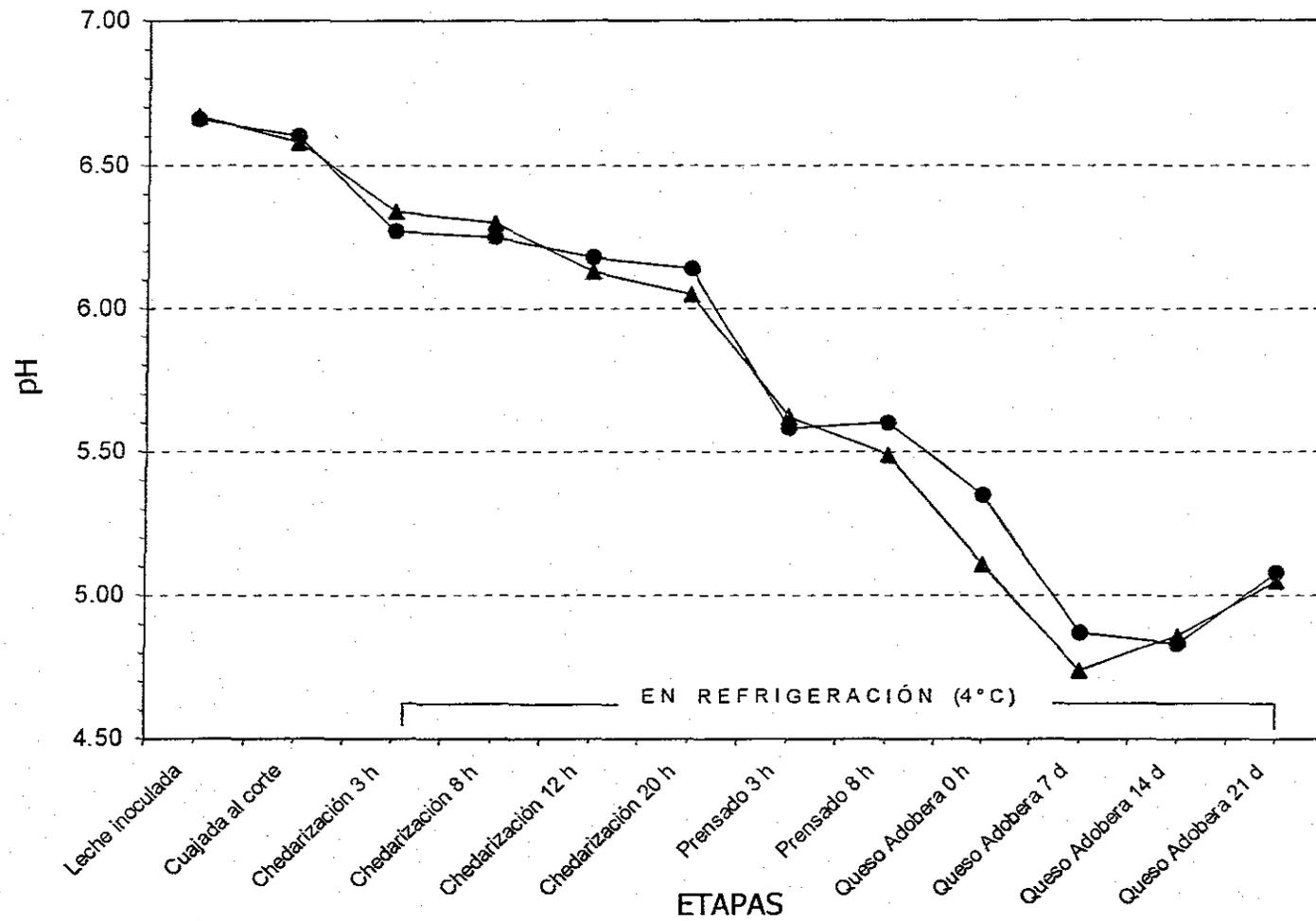


FIGURA 23. Comportamiento del pH durante la fabricación y almacenamiento de queso adobera inoculado con *Listeria monocytogenes* R01 en ausencia (●) o presencia (▲) de *Lactobacillus crispatus* bacteriocinogénico.

IV.- DISCUSIÓN

La tasa de aislamiento de bacterias ácido lácticas bacteriocinogénicas a partir de alimentos es muy variable.

Mc Mullen y Stiles (1996), encontraron que un 30% de las bacterias lácticas aisladas de carne de cerdo empacada bajo atmósferas controladas fueron productoras de bacteriocinas. Garriga *et al.* (1994), reportaron un 22% de lactobacilos bacteriocinogénicos de los aislamientos hechos a partir de salchichas fermentadas. Garver y Muriana (1993) y Vaughan *et al.* (1994), por su parte, señalan que es necesario estudiar un gran número de lácticos aislados de alimentos para encontrar cepas productoras de bacteriocinas detectadas en medios sólidos. Estos autores encuentran tasas tan bajas como el 0.2%, resultado compartido también por Coventry *et al.* (1997) los cuales consignan que de 663,533 colonias de bacterias lácticas aisladas de productos lácteos y cárnicos, sólo un 0.2% fueron bacteriocinogénicas. Ryser *et al.* (1994), en una investigación realizada en queso, encuentran que de 125,000 colonias examinadas, menos del 0.1% fueron productoras de bacteriocinas.

En nuestro estudio observamos que de las 340 cepas de lácticos aislados, sólo 1 de ellas fue bacteriocinogénica, que corresponde a una tasa del 0.29%, y que está acorde con los hallazgos de los últimos autores citados. Sin embargo, se reconoce que estos resultados y los encontrados por otros autores, son grandemente influenciados por el método de detección, los medios de cultivo y los microorganismos empleados como indicadores de la actividad de la bacteriocina (Montville y Kaiser, 1993).

La producción de bacteriocinas es un fenómeno comúnmente observado entre especies de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Carnobacterium* (Zhu *et al.*, 2000), aunque las cepas bacteriocinogénicas de *Lactobacillus* poseen ciertas ventajas sobre las otras bacterias lácticas cuando se piensa emplearlas como cultivos vivos en la producción de alimentos. Los lactobacilos y lactococos, en principio, están considerados como microorganismos GRAS debido a que su consumo a través de muchos años no ha producido daño alguno a la salud humana (Svensson, 1999; Yuan-Kun *et al.*, 1999). Por otra parte, los lactobacilos al igual que las bifidobacterias, son miembros importantes de la microflora intestinal de humanos y animales, y frecuentemente son empleados

comercialmente como probióticos (Kullen y Klaenhammer,1999;Yuan-Kun *et al.*,1999). Los probióticos son comúnmente definidos como microorganismos viables (bacterias y levaduras) que producen un efecto benéfico sobre la salud del huésped que los ingiere (Salminen *et al.*,1998).

En nuestro estudio encontramos que el láctico que resultó bacteriocinogénico, e inhibió a *L. monocytogenes*, fue *Lactobacillus crispatus*. Esta especie de *Lactobacillus* no es comúnmente citada entre los lácticos productores de bacteriocinas (Tahara y Kanatani,1997), no obstante, posee ciertas características de gran importancia.

Lactobacillus crispatus forma parte del grupo denominado "*Lactobacillus acidophilus*" (Du Plessis *et al.*,1996;Tahara y Kanatani,1997), se aísla regularmente del intestino y vagina humanos (Fujisawa *et al.*,1996;Antonio *et al.*,1999;Song *et al.*,1999) y de productos lácteos como el yogurt (Schillinger,1999). Es una de las 18 especies de *Lactobacillus* que actualmente están siendo investigadas con mucho interés para ser empleadas como probióticos (Tannock, 1999). Se está considerando, por ejemplo, su uso para el control de la microflora de la vagina humana (Ocana *et al.*,1999) y para la obtención de productos cárnicos fermentados seguros (Arihara *et al.*,1998).

La bacteriocina de *L. crispatus* que estudiamos resultó ser termoestable, lo que sugiere que posee un peso molecular bajo (Zhu *et al.*,2000) y que pertenece a la clase II según la clasificación de las bacteriocinas hecha por Klaenhammer *et al.* en 1993 . Esta peculiaridad permite que sea posible emplearla en alimentos tratados a temperaturas que no sobrepasen los 100°C.

El efecto del pH sobre la actividad de la bacteriocina es particular a la molécula en cuestión (Liu y Hansen,1990), y por lo tanto, es necesario realizar estudios individuales. La bacteriocina que encontramos mostró ser activa a los pH's estudiados (3.5-7.5), lo que sugiere que la bacteriocina pudiera ser utilizada en productos sometidos a fermentación, como los quesos, los cuales están sujetos a variaciones en el pH durante su elaboración, maduración y almacenamiento.

El hecho de que la bacteriocina produjera una mayor inhibición a los pH's más bajos (3.5-5.5), se explica por los efectos dañinos de éstos sobre las células blanco y por el incremento en la carga neta positiva de la bacteriocina que favorece su

interacción con los polímeros aniónicos localizados en la pared celular de las bacterias gram positivas (Jack *et al.*, 1995), como *Listeria monocytogenes*. Este efecto ha sido observado también con otras bacteriocinas (Parente *et al.*, 1998 ; Bouttefroy *et al.*, 2000).

El no haber observado en los 3 ensayos realizados una diferencia significativa en el pH entre los quesos inoculados, o no, con *L. crispatus*, y a través de toda su etapa de elaboración y conservación, nos sugiere que esta cepa posee, además, una característica favorable para ser usada en la fabricación de estos productos, que no afecta un parámetro usado para determinar su calidad, su pH. Este mismo efecto fue observado por Ennahar *et al.* (1998) en quesos blandos inoculados con *L. plantarum* WHE92.

El desarrollo mostrado por *L. monocytogenes* en los quesos inoculados solo con el patógeno, confirma lo consignado por otros autores respecto a que estos productos son un buen sustrato para su desarrollo (Luis Juan *et al.*, 1994) y que éste no es evitado por la conservación del alimento a temperaturas de refrigeración (Luis Juan *et al.*, 1994; Pucci *et al.*, 1988).

De igual manera, *L. crispatus* pudo desarrollar y mostrar actividad antilistérica a temperatura de refrigeración, una habilidad también deseable en un láctico que se pretenda emplear como bioconservador de alimentos que requieren ser refrigerados y que han sido objeto de estudio en los pasados años (Garver y Muriana, 1993; Vescovo *et al.*, 1996).

El comportamiento mostrado por las cepas 1633 y 40144 de *L. monocytogenes* en los quesos inoculados, conjuntamente con *L. crispatus*, indica que en las primeras horas de preparación de los quesos la bacteriocina producida logró reducir en 2.3 log el número de *L. monocytogenes* 1633 y 0.83 log el número de listerias de la cepa 40144 para luego permitirles desarrollar en forma pausada y a través del resto del experimento hasta alcanzar a rebasar ligeramente el inóculo inicial.

Se sabe que la capacidad de una bacteriocina para detener eficazmente el desarrollo de *L. monocytogenes*, o destruirla en los alimentos, depende de la sensibilidad, el nivel de inóculo del patógeno y de diversos factores fisicoquímicos que participan en ello (Muriana, 1996; Bouttefroy *et al.*, 2000). Una diversidad de respuestas han sido encontradas a nisina (Ferreira y Lund, 1996; Ukuku y

Shelef,1997), bavaricina A (Larsen y Norrung,1993), pediocin PA-1 (Rash y Knochel,1998), sakacina (Schillinger,1994) y curvaticina 13 (Bouttefroy,2000) en función de las cepas indicadoras probadas. Ferreira y Lund (1996) reportan que algunas de las cepas de *L. monocytogenes*, probadas contra nisina, fueron inhibidas a bajas concentraciones (menos de 200 U / ml), mientras que otras requirieron altas cantidades de la bacteriocina para lograr el mismo resultado.

En los ensayos que realizamos donde empleamos las cepas 1633 y 40144, dos cepas de *L. monocytogenes* sensibles a la bacteriocina, utilizamos un poco más de 1×10^4 ufc/ml de leche, un nivel de contaminación poco probable que suceda en condiciones naturales (Bouttefroy,2000), pero que facilita el seguimiento del patógeno en los ensayos.

Ennahar *et al.* (1998a), en un experimento realizado en caldo MRS inoculado con *L. monocytogenes* (1×10^4 ufc/ml) y *L. plantarum* WHE 92 productor de bacteriocina a la misma concentración que el patógeno, encuentran que la bacteriocina producida solo fue capaz de reducir en 2 log el número de listerias y que la actividad antilisteria residual fue insuficiente para evitar el desarrollo de las células del patógeno restantes. Los autores empleando esta información diseñaron un estudio en queso Muenster, el cual inocularon con las bacterias antes señaladas, pero usando inóculos de 1×10^5 ufc/ml del láctico contra 1×10^2 ufc/ml del patógeno y encontraron que la cantidad de bacteriocina producida en el queso fue suficiente para eliminar a *L. monocytogenes*.

Wan *et al.* (1997) señalan que el efecto inhibitor de piscicolina 126 contra *L. monocytogenes* en leche sin descremar, dependió del inóculo del patógeno. Cuando emplearon 1×10^2 ufc/ml de leche de *L. monocytogenes* y 512 UA (Unidades Arbitrarias) de bacteriocina/ml de leche, el desarrollo fue completamente inhibido. Utilizando inóculos de 10^4 - 10^6 ufc/ml, la bacteriocina sólo redujo de 4-5 log el número de listerias y las sobrevivientes desarrollaron dentro de 24 h. Cuando se preparó queso camembert inoculado *L. monocytogenes* con 10^2 ufc/ml de leche y se retó con 2048 UA/ml de la bacteriocina (piscicolina 126), se redujo de 3-4 log la cuenta del patógeno, sin embargo, listerias sobrevivientes lograron alcanzar niveles de 10^4 ufc / g de queso al finalizar su maduración.

Este fenómeno de efecto inhibitor dependiente del nivel de contaminación empleado, combinado con el desarrollo de las células sobrevivientes, ha sido reportado también para pediocina PO2 (Liao *et al.*, 1993), pediocina 5 (Huang *et al.*, 1994) y carnocina CPS (Mathieu *et al.*, 1994).

Muriana (1996) señala que la cantidad de bacteriocina necesaria para destruir una célula microbiana depende del microorganismo blanco y del mecanismo de acción de la propia bacteriocina. La eficacia de las bacteriocinas, añade, tiene relación también con la cantidad de bacteriocina inactivada por interacción con los componentes del alimento y de las condiciones encontradas durante la fabricación o procesado del alimento (pH o temperatura).

Wan *et al.* (1997) señalan que el hecho de haber encontrado células de *L. monocytogenes* durante la fabricación del queso camembert inoculado con niveles del patógeno de 1×10^2 cel/ml de leche y retado con la bacteriocina, pudo deberse en parte a la actividad proteolítica presente en el queso.

Otro factor que puede limitar la efectividad de una bacteriocina aplicada en un alimento es la resistencia espontánea, innata o inherente que pueda presentar o poseer el microorganismo blanco (Muriana, 1996).

En nuestro trabajo encontramos que cuando inoculamos la cepa de *Listeria monocytogenes* 01 (parcialmente resistente a la bacteriocina), en la leche usada para la elaboración de los quesos, el desarrollo del patógeno no se vio obstaculizado significativamente en presencia del láctico bacteriocinogénico (Figura 21).

Existen reportes sobre la ocurrencia de cepas de *L. monocytogenes* resistentes a bacteriocinas.

Rasch y Knochel (1998) en un estudio realizado en 381 cepas de *Listeria monocytogenes*, encuentra que 20 de ellas resultaron resistentes a pediocina. Wan *et al.* (1997) reportan que la recuperación de *L. monocytogenes* durante la maduración de un queso camembert fue debido en parte al surgimiento de listerias resistentes a la piscicolina 126 con la que fue retado el patógeno.

Rekhif *et al.* (1994) obtuvieron mutantes de *L. monocytogenes* ATCC 15313 resistentes a mesenterocina 52, curvaticina 13 y plantaricina C19. Las 3 mutantes presentaron resistencia cruzada a las 3 bacteriocinas, pero no a nisina. Los autores sugieren que las 3 bacteriocinas comparten un mecanismo antimicrobiano común, el

cual fue alterado por un proceso mutagénico produciendo resistencia cruzada y que este mecanismo de acción puede ser diferente al de la nisina.

Harris *et al.* (1991) observaron que variantes resistentes a nisina de *L. monocytogenes* aparecen con una frecuencia de 10^6 a 10^8 , y que tal resistencia espontánea puede generarse por alteración o mutación de los constituyentes moleculares superficiales de la membrana celular con los cuales interactúa la bacteriocina.

Ming y Daeschel (1993), examinando un aislamiento de *L. monocytogenes* resistente a nisina, encontraron cambios en la composición de la membrana (ácidos grasos) en comparación con las cepas sensibles y correlacionan este hallazgo con la resistencia de la cepa.

Muriana (1996) señala que las alteraciones que pueden sufrir los componentes superficiales de la membrana de una célula sensible a la bacteriocina, pueden afectar también la atracción electrostática entre la bacteriocina y la célula, haciéndola resistente.

Schillinger *et al.* (1998), por su parte, mencionan que aún en una población de células sensibles a nisina, algunas de ellas pueden mostrar elevada resistencia a la bacteriocina y que una sola exposición a la nisina puede resultar en el surgimiento de subpoblaciones resistentes a la misma. Los autores con base a los resultados obtenidos en su estudio concluyen que el uso de nisina en combinación con un cultivo láctico iniciador productor de una bacteriocina anti-*Listeria* distinta a la nisina, puede prevenir el surgimiento de mutantes de *Listeria* resistentes a la nisina.

V. CONCLUSIONES

- 1.- Existen cepas de bacterias ácido lácticas en los quesos consumidos en nuestra región que exhiben potencial antagónico contra *L. monocytogenes*.
- 2.- Es posible aislar, aunque a tasas bajas, cepas de bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas activas contra *L. monocytogenes* en quesos frescos producidos en nuestra región.
- 3.- Existen cepas de *L. monocytogenes* que son resistentes a la bacteriocina de *L. crispatus* y cepas con poblaciones donde se pueden encontrar células resistentes a la misma.
- 4.- El resurgimiento y desarrollo de las cepas 1633 y 40144 en la etapa final de elaboración de los quesos inoculados conjuntamente con *L. crispatus* bacteriocinogénico puede deberse a factores relacionados con:
 - a.- La sensibilidad de la cepa de *L. monocytogenes* probada.
 - b.- El nivel del inóculo empleado del patógeno.
 - c.- La facultad de *L. crispatus* para producir suficiente bacteriocina en el producto.
 - d.- La interacción de la bacteriocina con compuestos presentes en el queso.
 - e.- La actividad proteolítica originada de otros microorganismos presentes en el producto.
- 5.- La ineficacia de la bacteriocina de *L. crispatus* para impedir el desarrollo de la cepa de *L. monocytogenes* 01 (parcialmente resistente a la bacteriocina) durante las etapas de elaboración y almacenamiento del queso indica que no se puede excluir que variantes resistentes a la bacteriocina de *L. crispatus* y a otras bacteriocinas, estén presentes en el mismo tipo de alimentos de donde se aíslan, limitando su empleo cuando se introducen como único recurso de conservación de ellos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Alaniz de la O, R., A. Luis Juan Morales. 1998. *Listeria*. En Bacteriología Médica (G. Lugo de la Fuente, Ed.). Ediciones Cuellar, Méx. pp. 527-538.

Andres, C. 1979. Starter culture reduces residual nitrite in bacon. *Food Processing*. 40: 56-58.

Antonio May A.D., S.E. Hawes and S.L. Hillier. 1999. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J. Infect. Dis.* 180 :1950-1956

Arihara, K., H. Ota, Y. Kondo, T. Sameshima, H. Yamanaka and M. Akimoto. 1998. *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. *J. Food Sc.* 63:544-547.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In : Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects (S. Salminen, Ed.) Marcel Dekker, Inc. N.Y., pp. 1-72

Aymerich, T., M. Garriga, J. Ylla, J. Vallier, J.M. Monfort and M. Hugas. 2000. Application of Enteriocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *J. Food. Prot.* 63: 721-726.

Baird-Parker, T.C. 2000. The production of microbiologically safe and stable foods. In: The microbiological safety and quality of food. Vol. I (B.M. Lund, T.C. Baird-Parker and G.W. Gould, Eds.) Aspen Publisher, Inc., G. Maryland, USA. pp. 3-18.

Barriga, A.G., E. Romo R., M. Ramírez R., E. Carreón V y M.A. Peredo L.V. 1981. Meningoencefalitis por *Listeria monocytogenes* (informe de 5 casos). *Rev. Med. IMSS (Mex)* 19: 519-525.

Batish, V.K., L. Ram and S. Grover. 1991. Interaction of *S. lactis* subsp. diacetylactis DRC-1 with *Aspergillus parasiticus* and *A. fumigatus* in milk. *Cult Dairy Prod. J.* 26: 13-14

Berry, E.D., M.B. Liewen, R.W. Mandingo and R.W. Hutkins. 1990. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semi-dry sausage. *J. Food Prot.* 53: 194-197.

Bouttefroy, A., M. Linder and J.B. Milliere. 2000. Predictive models of the combined effects of curvaticin 13, NaCl and pH on the behavior of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in broth. *J. Appl. Microbiol.* 88: 919-929.

Brötz, H., M. Josten, I. Wiedemann, U. Schneider, F. Götz, G. Bierbaum and H.G. Sahl. 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol. Microbiol.* 30: 317-327.

- Buchanan, R.L., H.G. Sthal and D.L. Archer. 1987. Improved plating media for simplified, qualitative detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Microbiology*. 4: 269-275.
- Bula, C.J., J. Bille and M.P. Glauser. 1994. An epidemic of Food-borne listeriosis in Western Switzerland: description of 57 cases involving adults. *Clin. Infect. Dis.* 20: 66-72.
- Canfield, M. A., J.N. Walterspiel, M.S. Edwards, C.J. Baker, R.B. Wait and J.N. Urteaga. 1984. An epidemic of perinatal listeriosis serotype 1b in hispanics in a Houston hospital. *Pediatr. Infect. Dis.* 4:106.
- Conventry, M.J., J.B. Gordon, A. Wilcock, K. Harmark, B.E. Davidson, M.W. Hickey, A.J. Hillier and J.Wan. 1997. Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. *J. Appl. Microbiol.* 83: 248-258.
- Covarrubias Godínez, L.E., A. Luis Juan Morales, R. Alaniz de la O y E. Martínez Bravo. 1999. Frecuencia y Cuantificación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos. XVI Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos y Primer Congreso Internacional en Seguridad de Alimentos. Guadalajara, Jal., Méx. Pág.49.
- Cutter, C.N. and G.R. Siragusa. 1995. Population reductions of gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. *J. Food Prot.* 58: 977-983.
- Cutter, C.N. and G.R. Siragusa. 1998. Incorporation of nisin into a meat binding system to inhibit bacteria on beef surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 19-23.
- Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* Jan: 164-167.
- Daeschel, M.A., D.S. Jung and B.T. Watson. 1991. Controlling wine malolactic fermentation with nisin and nisin-resistant strains of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol* 27: 601-603.
- Daly, C., W.E. Sandine and P.R. Elliker. 1972. Interactions of food starter cultures and food - borne pathogens: *Streptococcus diacetilactis* versus food-borne pathogens. *J. Milk Food Technol.* 35: 349-357.
- Davidson, Ch.M. and F. Cronin. 1973. Medium for the selective enumeration of lactic acid bacteria from foods. *Appl. Microbiol.* 26: 439-440.
- Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 44: 100.
- Dooley, J.S.G. and T.A. Roberts. 2000. Control of vegetative microorganisms in foods. *Br. Med Bull.* 56: 142-157.

- Du Plessis, E. M., M. T. Dicks, M. Vescovo, S. Torriani and F. Dellaglio. 1996. *Lactobacillus acidophilus* and related species : A review. *Annali di Microbiologia Ed. Enzimologia*. 46 :319-340.
- Ennahar, S., O. Assobhei and C. Hasselmann. 1998a. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear – surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. *J. Food Prot.* 61: 186-191.
- Ennahar, S., D. Aoude – Werner, O. Assobhei and C. Hasselmann. 1998b. Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. *J. Appl. Microbiol.* 85: 521-526.
- Farber, J. M. and P.I. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes* a foodborne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55: 476-551.
- Federal Register. 1988. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredients. *Fed. Regist.* 54: 11247-11251.
- Ferreira, M. A. S. S. and B.M. Lund. 1996. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 22:433-438.
- Fetlisinski, A. and L. Stepaniak. Sensitivity of probiotics *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* to bile salt. Disponible en: <http://www.ias.unu.edu/vfellow/fooc/ecotec/ecotech94/paper-09.htm>. Acceso el 20/10/00.
- Fleming, D.W., S.L. Cochi, K.L. MacDonald, J. Brondum, P.S.Hayes, B.D. Plikaytis, M.B. Homes, A. Audurier, C.V. Bromme and A.L. Reingold. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N. Engl. J. Med.* 312.404-407.
- Foegeding, P.M., A.B. Thomas, D.H. Pilkington and T.R. Klaenhammer. 1992. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during fermented sausage production. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 884-890.
- Friedman, Y. Lactic acid bacteria as food preservatives. Disponible en: <http://dna2z.com/projects/lacid.htm>. Acceso el 20/10/00.
- Fujisawa, T., T. Yaeshima and T. Mitsuoka. 1996. Lactobacilli un human feces. *Bioscience & Microflora.* 15:69-75.
- Gagliano, V.J. and R.D. Hinsdill. 1970. Characterization of a *Staphylococcus aureus* bacteriocin. *J. Bacteriol.* 104: 117-125.
- Garriga, M., M. Hugas, T. Aymerich and J.M. Monfort. 1994. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol* 75: 142-148.

- Garver, K. I. and P. M. Muriana. 1993. Detection, identification and characterization of bacteriocin -producing lactic acid bacteria from retail food products. *Int. J. Food Microbiol.* 19:241-258.
- Goff, J. H., A. K. Bhunia and M.G. Johnson. 1996. Complete inhibition of low levels of *Listeria monocytogenes* on refrigerated chicken meat with Pediocin AcH bound to heat-killed *Pediococcus acidilactici* cells. *J. Food Prot* 59: 1187-1192.
- Goodfellow, S.J. 1979. Acidulants. Proceedings of the Meat Industry Research Conference. March 29-30.1979. Am. Meat Institute Found., Arlington, V.A. pp. 87-89.
- Grahame, G. 2000. Preservation: past, present and future. *Br. Med. Bull.* 56: 84-96.
- Gratia, A. 1946. Techniques pour la recherche systemitique des germes antibiotiques. *C.R. Seances Soc. Biol. Paris.* 140: 1053-1055.
- Harris, L. J., H. P. Fleming and T.R. Klaenhammer. 1991. Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A and VAL 500 to nisin. *J. Food Prot.* 54:836-840.
- Herrero, M.,B. Mayo, B. González and J. E. Suárez. 1996. Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 565-570.
- Hitchins, A.D. 1995. *Listeria monocytogenes*. In: Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD. pp. 10.01-10-13.
- Hoover, D.G. 2000. Microorganism and their products in the preservation of foods. In: The microbiological safety and quality of food. Vol. I (B.M. Lund, T.C. Baird-Parker and G.W. Goulds, eds.) Aspen Publishers, Inc. G. Maryland, pp. 251-276.
- Huang, J., C. Lacroix, H.Daba and R.E. Simard. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* in milk and its control by pediocins produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. *Int. Dairy J.* 4:429-443.
- Jack, R.W., J.R. Tagg and B. Ray. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59:171-200.
- Jay, J.M. 1992. Historia de los microorganismos en los alimentos. En : Microbiología moderna de los alimentos. Acribia. pp. 3-11
- Jenson, I., L. Baird and J. Delves-Broughton. 1994. The use of nisin as a preservative in crumpets. *J. Food. Prot.* 57: 874-877.
- Juven, B.J. and M.D. Pierson. 1996. Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation. *J. Food Prot.* 59: 1233-1241

- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39-86.
- Kullen, M.J. and T.R. Klaenhammer. 1999. In: *Probiotics: a critical review* (G.W. Tannok, ed.). Horizon Scientific Press. England. pp. 65-83
- Larsen, A. G. and B. Norrung. 1993. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bavaricine A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* M1401. *Lett. Appl. Microbiol.* 17:132-134
- Lauková, A. and S. Czikková. 1999. The use of enteriocin CCM4231 in soy milk to control the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 87: 182-186.
- Leistner, L. and L.G.M. Gorris. 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Sci. Technol.* 6:41-46.
- Leroy, F. and L. de Vuyst. 1999. Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:974-981.
- Liao, C.C., A.E. Yousef, E.R. Richter and G.W. Chism. 1993. *Pediococcus acidilactici* PO2 bacteriocin production in whey permeate and inhibition of *Listeria monocytogenes* in food. *J. Food Sci.* 58:430-434.
- Linnan, M.J., L. Mascola, X. D. Lou, V. Goulet, S. May, C. Salminen, D.W. Hird, M.L. Yonkura, P. Hayes, R. Weaver, A. Audurier, B.D. Plikaytis, S.L. Fannin, A. Kleks and C.V. Broome. 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N. Engl. J. Med.* 319 : 823-828.
- Liu, W. and N. Hansen. 1990. Some Chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2551-2558
- Luchansky, J.B., K.A. Glass, K.D. Harsono, A.J. Degnan, N.G. Faith, B. Cauvin, G. Baccus-Taylor, K. Arihara, B. Bater, A.J. Maurer and R.G. Cassens. 1992. Genomic analysis of *Pediococcus* starter cultures used to control *Listeria monocytogenes* in turkey summer sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3053-3059.
- Luis Juan Morales, A., M.E. Vázquez Sandoval y R. Alaniz de la O. 1992a. Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco tipo rancho que se expende en mercados de Guadalajara, Jalisco. IX Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Universidad de Guadalajara, Jal., Méx. Pág.1
- Luis Juan Morales, A., R. Alaniz de la O y B.T. Rosas Barbosa. 1997. Frecuencia y cuantificación de *Listeria* en queso fresco pasteurizado tipo adobera que se expende en tiendas de autoservicio y cremerías de Guadalajara, Jalisco. XIV Reunión

Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Guadalajara, Jal., Méx. Pág. 29.

Luis Juan Morales, A., R. Alaniz de la O y M.E. Vázquez Sandoval. 1992b. Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco tipo panela que se expende en mercados de Guadalajara, Jalisco. XXIII Congreso Nacional de Microbiología. Acapulco, Gro. Méx.

Luis Juan Morales, A., R. Alaniz de la O, M.E. Vázquez Sandoval, M.L. Ríos Ibarra y B.T. Rosas Barbosa. 1994. Desarrollo de *Listeria monocytogenes* California en queso panela. XI Reunión Anual de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Guadalajara, Jal., Mex. Pág. 9

Maisnier-Patin, S.N. Deschamps, S.R. Tatini and J. Richard. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in camembert cheese made with a nisin-producing starter. Lait 72: 249-263.

Mathieu, F., M. Michel, A. Lebrihi and G. Lefebvre. 1994. Effect of the bacteriocin carnocin CP5 and of the producing strain *Carnobacterium piscicola* CP5 on the viability of *Listeria monocytogenes* ATTC 15313 in salt solution, broth and skimmed milk, at various incubation temperatures. Int. J. Food Microbiol. 22:155-172.

Maturin, L.J. 1995. Inhibitory substances in milk. In: Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD. pp. 20.01-20-13.

Mc Faddin. J.F. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2nd edition. Williams & Wilkins, Baltimore/London.

Mc Mullen, L.M. and M.E. Stiles. 1996. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. J. Food Prot. Supplement: 64-71.

McAuliffe, O., C.Hill and R.P.Ross. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lacticin 3147 – producing starter culture. J. Appl. Microbiol. 86: 251-256.

Megalla, S.E. and M.A. Mohran. 1984. Fate of aflatoxin B1 in fermented dairy products. Mycopathologia. 88: 27-29

Ming, X. and M.A. Daeschel. 1993. Nisin resistance of food borne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* Scott A. J. Food Prot. 56:944-948

Mishra, C. and J. Lambert. 1996. Production of anti-microbial substances by probiotics. Asia Pacific J. Clin. Nutr. 5: 20-24

Montville, T.J. and A.L. Kaiser. 1993. Antimicrobial proteins: classification, nomenclature, diversity, and relationship to bacteriocins. In: Bacteriocins of lactic acid

bacteria (D.G. Hoover and L.R. Steensen, Eds.). Academic Press, Inc. N.Y., pp. 1-17.

Montville, T.J. and K. Winkowsky. 1997. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In: Food Microbiology: fundamentals and frontiers (M.P. Doyle, L. R. Beuchat and T.J. Montville, Eds). ASM Press, Washington, D.C., pp.

Morgan, S.M., M.Galvin, J. Kelly, R.P.Ross and C.Hill. 1999. Development of a lactacin 3147-enriched whey powder with inhibitory activity against foodborne pathogens. J. Food Prot. 62: 1011-1016.

Muriana, P.M. 1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. J. Food Prot. Supplement: 54-63.

Nicolai-Scholten, M.E., J. Potel, J. Natzschka and St. Pekker. 1985. High incidence of listeriosis in Lower Saxony, 1983. Immun. Infekt. 13: 76-77.

Nilsson, L., L. Gram and H.H. Huss. 1999. Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. J. Food Prot. 62: 336-342

Nuñez, M., J.L. Rodríguez, E. García, P. Gaya and M. Medina. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of manchego cheese. J. Appl. Microbiol. 83: 671-677.

Ocana, V.S., AAPD Holgado and M.E. Nader-Macias. 1999. Selection of vaginal H₂O₂ – generating *Lactobacillus* species for probiotic use. Current Microbiol. 38:279-284

Ogden, K., M.J. Waites and J.R.M. Hammond. 1988. Nisin and brewing. J. Inst. Brew. 94: 233-238.

Ouwehand, A.C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects (S. Salminen and A. Von Wright, Eds.). Marcel Dekker, Inc., N.Y., pp. 139-159.

Parente, E., M.A. Giglio, A. Ricciardi and F. Clementi. 1998. The combined effect of nisin, leucocin F10, pH, NaCl and EDTA on the survival of *Listeria monocytogenes* in broth. Int. J. Food Microbiol. 40:65-75

Park, H.S. and E.H. Marth. 1972. Behavior of *Salmonella typhimurium* in skimmilk during fermentation by lactic acid bacteria. J. Milk Food Technol. 35: 482-488.

Pucci, M.J., E.R. Vedamuthu, B.S. Kunka and D.A. Vandervergh. 1988. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2349-2353.

Raloff, J. Staging germ warfare in foods: science harnesses bacteria to fend off food poisoning and spoilage. Disponible en: http://www.findarticles.com/cf_0/m1200/n6_v153/20324667/p1/article.jhtml. Acceso el 08/11/00

Rash, M. and S. Knochel. 1998. Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A. Lett. Appl. Microbiol. 27: 275-278

Ray, B. 1996. Food biopreservatives of microbial origin. In: Fundamental food microbiology. CRS Press, Boca Ratón, Flo., pp. 181-190.

Rekhif, N., A. Atrih and G. Lefebvre. 1994. Selection and properties of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains. Curr. Microbiol. 28:237-241.

Ruiz-Barba, J.L., D.P. Cathcart, P.J. Warner and R. Jiménez-Díaz. 1994. Use of *Lactobacillus plantarum* LPC010, a bacteriocin producer, as a starter culture in spanish-style green olive fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2059-2064

Ryser, E.T. 1999. Foodborne listeriosis. In: *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. (E.T. Ryser and E.H. Marth eds.), Marcel Dekker, Inc. N.Y. pp 299-358.

Ryser, E.T., S. Maisnier-Patin, J.J. Gratadoux and J.A. Richard. 1994. Isolation and identification of cheese-smear bacteria inhibitory to *Listeria* spp. Int. J. Food Microbiol. 21: 237-246.

Salminen, S., A. von Wright, L. Morelli, P. Marteau, D. Brassart, W. M. de Vos, R. Fonden, M. Saxelin, K. Collins, G. Mongensen, S.E. Birkeland and T. Mattila - Sandholm. 1998. Demonstration of safety of probiotic. A review. Int. J. Food Microbiol. 44: 93-106

Sarre, A. Food preservation. Disponible en: <http://www.science.org.au/nova/030/030box02.htm>. Acceso el 19/10/00.

Schillinger, U. 1994. Sakacine A produced by *Lactobacillus sake* Lb706. In: Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology, Genetics and Applications (De Vuyst, L. and E. J. Vandame, eds.) Blackie Academic and Professional, Glasgow. pp:419-434.

Schillinger, U. 1999. Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage. Int. J. Food Microbiol. 47: 79-87.

Schillinger, U., H-S. Chung, K. Keppler and W.H. Holzapfel. 1998. Use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria to inhibit spontaneous nisin - resistant mutants of *Listeria monocytogenes*. Scott A. J. Appl. Microbiol. 85: 657-663.

Schillinger, U., M. Kaya and F.K. Lucke. 1991. Behavior of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. J. Appl. Bacteriol. 70: 473-478.

Schillinger, U., R. Geisen and W.H. Holzapfel. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. Trends Food Sci. Technol. 7: 158-164.

Schlech, W.F., P.M. Lavaigne, R.A. Bortolussi, A.C. Allen, E.V. Haldane, A.J. Wort, A.W. Hightower, S.E. Johnson, S.H. King, E.S. Nicholls and C.V. Broome. 1983. Epidemic listeriosis: Evidence for transmission by food. N. Engl. J. Med. 308: 203-206.

Smith, J.L. and R.L. Buchanan. 1990. Identification of supplements that enhance the recovery of *Listeria monocytogenes* on modified Vogel Johnson agar. J. Food Safety. 10: 155-163.

Smith, J.L. and S.A. Palumbo. 1981. Microorganism as food additives. J. Food Prot. 44: 936-955.

Sofos J.N. 1993. Current microbiological considerations in food preservation. Int. J. Food Microbiol. 19: 87-108.

Sofos, J.N. Naturally occurring antimicrobials in food. Disponible en: http://www.cast-science.org/anti_sum.htm Acceso el 19/10/00.

Song Yu-li, N. Kato, Y. Matsumiya, C. Liu, H. Kato and K. Watanabe. 1999. Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. J. Clin. Microbiol. . 37 :3062-3064.

Stevens, K. A., B. W. Sheldon, N. A. Klapes and T. R. Klaenhammer. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3613-3615.

Subcommittee on microbiological criteria for foods and food ingredients. 1985. Introduction. In: An evaluation of the role of microbiological criteria for foods and food ingredients. National Academic Press, Washington, D.C., pp. 41-54.

Svensson, U. 1999. Industrial perspectives. In: Probiotics: a critical review (G.W. Tannok, ed.). Horizon Scientific Press. England. pp. 57-64

Swanson, K.M.J., F.F. Busta, E.H. Peterson and M.G. Johnson. 1992. Colony count methods. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. (C. Vanderzant and D.F. Splittstoesser, Eds.) APHA, Washington, D.C. pp. 75-95.

ahara, T. and K. Kanatani. 1997. Isolation and partial characterization of crispacin A, cell - associated bacteriocin produced by *Lactobacillus crispatus*. FEMS Microbiol. lett. 147:287-290.

anaka, N., E. Traisman, M.H. Lee, R.G. Cassens and E.M. Foster. 1980. Inhibition of botulinum toxin formation in bacon by acid development. J. Food Prot. 43 :450-457.

annock, G.W. 1999. Identification of lactobacilli and bifidobacteria. In: Probiotics: a critical review (G.W. Tannock, ed.). Horizon Scientific Press. England. pp. 45-56

appero, J.W., A Schuchat, K. Deaver, L. Mascola and J.D. Wenger. 1995. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States: effectiveness of prevention efforts? JAMA. 273: 1118-1122.

The National Advisory Committee on Microbiological criteria for Foods. 1991. *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 14: 185-246.

Food, E. 1988. Cost of foodborne listeriosis. Proc. X International Symposium on Listeriosis, Pecs. Hungary, Aug. 22-26, Abstr. P. 41

Ukuku, D.O. and L.A. Shelef. 1997. Sensitivity of six strains of *Listeria monocytogenes* to nisin. J. Food Prot. 60:867-869.

Vaughan, E.E., E. Caplice, R. Looney, N. O'Rourke, H. Conveney, D. Daly and G.F. Fitzgerald. 1994. Isolation from food sources, of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. J. Appl. Bacteriol. 79: 671-676.

Vescovo, M., S. Torriani, C. Orsi, F. Macchiarolo and G. Scolari. 1996. Application of antimicrobial-producing lactic acid bacteria to control pathogens in ready-to-use vegetables. J. Appl. Bacteriol. 81:113-119.

Wan, J., K. Harmark, B.E. Davidson, A.J. Hillier, J.B. Gordon, A. Wilcock, M.W. Hickey and M.J. Coventry. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by psicolin 126 in milk and camembert cheese manufactured with a thermophilic starter. J. Appl. Microbiol. 82: 273-280.

Yuan-Kun, L., K. Nomoto, S. Salminen and S.L. Gorbach. 1999. Handbook of probiotics. J. Wiley & Sons, Inc. pp. 13-17

Zar, J.H. 1999. Biostatistical Analysis. 4ra. Edition. Prentice-Hall, Inc. New Jersey.

Zhu, W.,W. Liu and D. Q. Wu. 2000. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. J. Appl. Microbiol. 88: 877-886.