



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE QUÍMICA

### FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CUANTIFICACIÓN DE BACTERIOCINAS UTILIZANDO A *Micrococcus luteus* COMO MICROORGANISMO INDICADOR

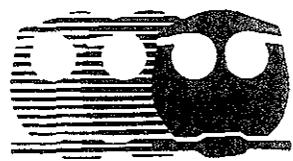
# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

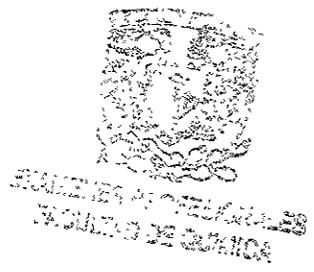
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

ALMA PATRICIA MAQUEDA GÁLVEZ



MÉXICO, D. F



2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## JURADO ASIGNADO

**Presidente:** Profesora Beatriz Luna Millán

**Vocal:** Profesora María de los Angeles Valdivia López

**Secretario:** Profesora Ana Olivia Cañas Urbina

**Primer suplente:** Profesor Hermilo Leal Lara

**Segundo suplente:** Profesora Maricarmen Quirasco Baruch

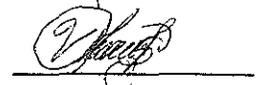
### Sitios donde se desarrolló el tema:

- NORIS S.A. DE C.V.
- Instituto de Fisiología Celular, UNAM

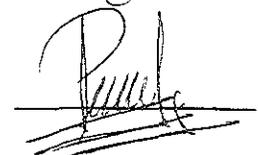
**Asesor del tema:** Dra. Ana Olivia Cañas Urbina



**Supervisor técnico:** Q.A. Verónica Santiago Cruz



**Sustentante:** Alma Patricia Maqueda Gálvez



## AGRADEZCO

- A la Dra. Ana O. Cañas, por su guía, confianza, apoyo y cariño al brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto.
- A la Q. A. Verónica Santiago, por su valiosa ayuda en la asesoría técnica así como por su dedicación y amistad.
- Al Dr. Antonio J. Pérez, por su invaluable apoyo y las facilidades otorgadas para la realización experimental del presente proyecto.
- A La Sra. Ma. Antonieta Rion por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.
- Al Dr. Edgardo Escamilla, a la Dra. Martha Contreras, al Dr. Marcos Flores y a Juan Méndez del Lab. 101- Oriente del Instituto de Fisiología Celular; Así como, al M. en C. Luciano Hernández de la Facultad de Química de la UNAM por el apoyo técnico brindado.
- Al personal de NORIS, S.A. de C.V., por las facilidades otorgadas durante la realización del presente proyecto, en especial a Héctor Morales e Imelda Saucedo.

## GRACIAS

*A Dios por sus bendiciones para conmigo*

*A mis padres, Antonio Maqueda y Celia Gálvez por su amor, apoyo, confianza, comprensión y ejemplo de vida. Los quiero mucho.*

*A mis hermanos, Elizabeth, Cristal y Alan por su cariño y por motivarme a lograr mis objetivos.*

*A mis abuelitos, tíos y primos, por creer siempre en mí.*

*A Abizaid, Alejandra, Andrea, Alicia, Elizabeth, Juan Carlos, Juan Manuel, Iliana, Katia, Magali, Marcos, Maritza, Nelly, Rocío, Vanesa y Olga, por su amistad auténtica y apoyo incondicional.*

*A la Q. F. B. Olga Velázquez, Dra. Sandra N., Rosa, Juan Luis y cada uno los miembros del laboratorio 101 Ote., por su amistad y ayuda en todo momento .*

*A todos aquellos que de una u otra forma participaron en la realización de este trabajo.*

# CONTENIDO

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. ANTECEDENTES	4
2.1 <u>Bacterias Ácido Lácticas</u>	4
2.2 <u>Bacteriocinas</u>	4
2.2.1 Aplicación en la Industria de Alimentos	5
2.2.1.1 <i>Nisina</i>	5
2.2.1.2 <i>Ingredientes que contienen bacteriocinas</i>	6
2.2.2 Proceso para obtener una bacteriocina pura	6
2.3 <u>Cuantificación de bacteriocinas</u>	7
2.3.1 Unidades	7
2.3.1.1 <i>Unidades Internacionales</i>	7
2.3.1.2 <i>Unidades Arbitrarias</i>	8
2.3.2 Métodos de cuantificación	8
2.3.2.1 <i>Métodos de difusión en agar</i>	8
2.3.2.2 <i>Método turbidimétrico</i>	9
2.3.3 Microorganismos Indicadores	10
2.4 <u><i>Micrococcus luteus</i></u>	11
2.5 <u><i>M. luteus</i> como indicador en la cuantificación de la bacteriocina WB1</u>	12
2.5.1 Bacteriocina WB1	12
2.5.2 Método Base S	12
2.5.3 Deficiencias del Método Base S	19
2.6 <u>Factores involucrados en las deficiencias del Método Base S para la cuantificación de la bacteriocina WB1</u>	20
2.6.1 Crecimiento del microorganismo indicador	20
2.6.1.1 <i>Métodos de preservación de cultivos</i>	20
2.6.1.2 <i>Condiciones de cultivo</i>	21
2.6.1.3 <i>Manipulación del inóculo</i>	22
2.6.2 Difusión de la bacteriocina	22
2.6.2.1 <i>Composición de agar en las placas de ensayo</i>	23
2.6.2.2 <i>Concentración de agar en las placas de ensayo</i>	23
2.6.2.2.1 <i>Placa de ensayo con capa de agar</i>	24
2.6.2.2.2 <i>Placa de ensayo en sobrecapa de agar</i>	24

2.7	<u>Factores del método Base S sujetos a optimización.</u>	24
III.	<b>OBJETIVOS</b>	26
3.1	<u>Objetivo General</u>	26
3.2	<u>Objetivos Específicos</u>	26
IV.	<b>MATERIALES Y METODOS</b>	27
4.1	<u>Medios de cultivo y soluciones</u>	27
4.1.1	Medios de cultivo	27
4.1.1.1	<i>Medios de cultivo preparados por ingrediente</i>	27
4.1.1.2	<i>Medios de cultivo comerciales</i>	27
4.1.2	Soluciones	28
4.2	<u>Microorganismo</u>	28
4.2.1	Cultivos de trabajo	28
4.3	<u>Métodos de preservación</u>	29
4.4	<u>Recuperación de <i>M. luteus</i> en medio líquido a partir del medio de preservación</u>	30
4.4.1	Efecto del medio de cultivo	32
4.4.2	Efecto de la agitación de cultivo	32
4.4.3	Efecto del volumen de cultivo de trabajo	33
4.5	<u>Resiembra de medio líquido a medio sólido para la recuperación de <i>M. luteus</i> a partir del cultivo de trabajo</u>	33
4.5.1	Efecto de la concentración del agar	34
4.6	<u>Variabilidad a través del tiempo de <i>M. luteus</i> recuperado en medio sólido</u>	34
4.7	<u>Preparación del inóculo</u>	36
4.8	<u>Estándar de referencia</u>	36
4.8.1	Preparación del estándar de referencia	36
4.8.2	Variabilidad del estándar de referencia	37
4.8.3	Estabilidad del estándar de referencia almacenado a 4°C	38

<b>4.9 <u>Cuantificación de la bacteriocina WB1</u></b>	38
4.9.1 Efecto de la composición y concentración de agar en la cuantificación de la bacteriocina WB1	38

## V. RESULTADOS

<b>5.1 <u>Métodos de preservación para <i>M. luteus</i></u></b>	39
<b>5.2 <u>Recuperación de <i>M. luteus</i> en medio líquido a partir del medio de preservación</u></b>	39
5.2.1 Efecto del medio de cultivo	39
5.2.2 Efecto de la agitación	39
5.2.3 Efecto del volumen de cultivo de trabajo	40
<b>5.3 <u>Resiembra de medio líquido a medio sólido para la recuperación de <i>M. luteus</i> a partir del cultivo de trabajo</u></b>	40
5.3.1 Efecto de la concentración de agar	40
<b>5.4 <u>Viabilidad a través del tiempo de <i>M. luteus</i> recuperado en medio sólido</u></b>	40
<b>5.5 <u>Preparación de inóculo de <i>M. luteus</i> a partir del cultivo recuperado del medio de preservación</u></b>	43
<b>5.6 <u>Estándar de referencia</u></b>	43
5.6.1 Selección del estándar de referencia	43
5.6.2 Variabilidad del estándar de referencia	45
5.6.3 Estabilidad del estándar de referencia almacenado a 4°C	45
<b>5.7 <u>Efecto de la composición y concentración de agar en la cuantificación de la bacteriocina WB1</u></b>	45

## VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

<b>6.1 <u>Comparación de métodos de preservación para <i>M. luteus</i></u></b>	49
<b>6.2 <u>Recuperación de <i>M. luteus</i> en medio líquido a partir del medio de preservación</u></b>	49
<b>6.3 <u>Resiembra de medio líquido a medio sólido para la recuperación de <i>M. luteus</i> a partir del cultivo de trabajo</u></b>	51

6.3.1 Efecto de la concentración de agar	51
6.4 <u>Viabilidad a través del tiempo de <i>M. luteus</i> recuperado en medio sólido</u>	51
6.5 <u>Preparación de inóculo de <i>M. luteus</i> a partir del cultivo recuperado del medio de preservación</u>	52
6.6 <u>Estándar de referencia</u>	53
6.6.1 Selección del estándar de referencia	53
6.6.2 Variabilidad del estándar de referencia	53
6.6.3 Estabilidad del estándar de referencia almacenado a 4°C	54
6.7 <u>Efecto de la composición y concentración de agar en la cuantificación de la Bacteriocina WB1</u>	54
6.8 <u>Aplicación del Método Base S Modificado</u>	55
VII. CONCLUSIONES	56
APÉNDICE 1	57
APÉNDICE 2	64
APÉNDICE 3	65
APÉNDICE 4	66
VIII. BIBLIOGRAFÍA	67

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estándar Británico BS 4020:1974 para cuantificación de nisina	13
Figura 2.	Método Base S para cuantificar a la bacteriocina WB1 (Modificado del Estándar Británico BS 4020:1974 para cuantificación de nisina)	16
Figura 3.	Preparación de cultivos de <i>M. luteus</i> por abundancia	30
Figura 4.	Conservación de <i>M. luteus</i> por secado en discos de agar	30
Figura 5.	Preservación de <i>M. luteus</i> por congelación a $-70^{\circ}\text{C}$ en chaquiras con glicerol	31
Figura 6.	Preservación de <i>M. luteus</i> por congelación a $-70^{\circ}\text{C}$ en medio de cultivo con glicerol	31
Figura 7.	Preparación de la suspensión de <i>M. luteus</i> (inóculo) a partir de un cultivo en medio sólido	35
Figura 8.	Evaluación de calidad del crecimiento de <i>M. luteus</i>	35
Figura 9.	Distribución de fosas o pozos en la caja de Petri	37
Figura 10.	Diámetro de inhibición de nisina en el crecimiento de <i>M. luteus</i> en agar Assay	43
Figura 11.	Método Base S Modificado para cuantificar a la bacteriocina WB1	46

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Condiciones experimentales para el cultivo de <i>M. luteus</i> con agitación	33
<b>Tabla 2.</b>	Pérdida de viabilidad de <i>M. luteus</i> de acuerdo al método de preservación utilizado	39
<b>Tabla 3.</b>	Efecto de la agitación en la recuperación de <i>M. luteus</i> en medio líquido a partir del medio de preservación	40
<b>Tabla 4.</b>	Efecto del volumen de inóculo en la recuperación de <i>M. luteus</i> en medio líquido.	41
<b>Tabla 5.</b>	Características morfológicas de colonias de <i>M. luteus</i> recuperado en agar BHI 1% y 1.5%	41
<b>Tabla 6.</b>	Viabilidad a través del tiempo de <i>M. luteus</i> recuperado en agar BHI 1.5% y almacenado a 4°C	42
<b>Tabla 7.</b>	Cuentas viables y calidad de crecimiento del inóculo de <i>M. luteus</i> preparado a partir de cultivos recuperados en tubos con agar inclinado y cajas de Petri (agar BHI 1.5%) y su viabilidad a través del tiempo de almacenamiento a 4°C.	44
<b>Tabla 8.</b>	Cuantificación de la bacteriocina WB1 en placas de ensayo con capas y placas de ensayo con sobrecapas de agar BHI y de agar Assay.	45

## RESUMEN

La creciente demanda del consumidor por productos naturales ha propiciado una progresiva actividad en la investigación de las bacteriocinas, debido a su aplicación potencial como sustancias conservadoras naturales en la industria de alimentos. Durante la obtención de una bacteriocina se requiere estimar la concentración presente en una muestra dada, de lo que se deriva la necesidad de desarrollar procedimientos eficientes de cuantificación de éstas sustancias. La bacteriocina WB1 es producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y está en proceso de purificación por nuestro grupo de trabajo. Para estimar la concentración de dicha bacteriocina, se utiliza el método de cuantificación denominado Método Base S, que involucra el uso de fosas de agar y el uso de *M. luteus* como microorganismo indicador. El Método Base S ha venido presentando dificultades que implican problemas de crecimiento de *M. luteus* y de difusión de la bacteriocina en el agar. El objetivo del presente trabajo fue estudiar fases específicas del Método Base S para superar las dificultades descritas.

Por ello se compararon 3 métodos de preservación (secado en discos de agar, congelación en chaquiras con glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$ , congelación en medio con glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$ ) para *M. luteus*. Se estudió el efecto que tiene el medio de cultivo, la agitación y el volumen de cultivo de trabajo en la recuperación de *M. luteus* a partir de medio de preservación. Se estableció la estabilidad del cultivo recuperado. Se estudiaron las condiciones de preparación así como la estabilidad del inóculo de *M. luteus* a partir del cultivo recuperado. Además se determinó el uso de un estándar de referencia y se estudió el efecto de la composición y concentración de agar en la cuantificación de la bacteriocina WB1.

Se encontró que preservando a *M. luteus* por los métodos estudiados no hay diferencia en el número de microorganismos iniciales que proporcionará cada cultivo. Para la recuperación de *M. luteus* se sugiere el uso de caldo BHI inoculado con 250  $\mu\text{L}$  de cultivo de trabajo "B" e incubado a 150 rev.  $\text{min}^{-1}$  seguida de una resiembra en agar BHI al 1.5% ya sea en tubo inclinado o en caja de Petri. *M. luteus* recuperado y almacenado a  $4^{\circ}\text{C}$  puede ser usado para preparación del inóculo por 21 días si se recupera en tubo y 14 días si se recupera en caja. Se encontró que no hay diferencia entre preparar al inóculo a partir de *M. luteus* recuperado en tubos o recuperado en cajas, siendo viable de 4 a 9 días. Se implementó el uso de un estándar de referencia (solución de 100 mg de nisaplin/L agua a pH 5). Por último se sugiere eliminar el uso de placas de ensayo con sobrecapas de agar y utilizar placas de ensayo con capas de Agar BHI 0.8% para cuantificar a la bacteriocina WB1.

Con los estudios realizados en el presente trabajo, se obtuvo un método denominado Método Base S Modificado, el cual ha sido utilizado exitosamente por el grupo de trabajo para cuantificar a la bacteriocina WB1.

## I. INTRODUCCIÓN

Los compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias ácido lácticas incluyen ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, reuterina y bacteriocinas. Las bacteriocinas se definen como sustancias de naturaleza proteica, que en su forma activa ejercen un efecto antimicrobiano sobre bacterias relacionadas taxonómicamente con el microorganismo productor.

En el proceso de obtención de una bacteriocina destacan 3 etapas principales en las que se requiere estimar su concentración: la producción del extracto crudo, la caracterización y la purificación.

Hasta el momento no existe un método oficial para cuantificar bacteriocinas, de tal manera que se desarrollan y aplican tantos métodos de cuantificación como bacteriocinas estudiadas. Las técnicas utilizadas para cuantificar bacteriocinas se basan generalmente en la cuantificación de la inhibición de crecimiento de un organismo sensible denominado microorganismo indicador.

En nuestro grupo de trabajo se han realizado estudios de purificación de la bacteriocina WB1, la cual es activa contra *M. luteus*. Para estimar la concentración de la bacteriocina se ha venido utilizando el método de cuantificación de bacteriocinas denominado Método Base S.

El Método Base S es un método de difusión en agar en el que se detectan zonas de inhibición producidas por la bacteriocina WB1 en *M. luteus* inoculado en placas de agar. Este método ha presentado dificultades frecuentes que incluyen la falta de crecimiento o el crecimiento irregular de *M. luteus* así como la difusión de la bacteriocina en el agar. En todos los casos los experimentos tienen que ser repetidos, representando una gran inversión de tiempo y recursos.

En el presente trabajo se realizaron estudios en fases específicas del Método Base S para superar los problemas anteriormente descritos y poder contar con un método de cuantificación eficiente para la bacteriocina WB1.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Bacterias Ácido Lácticas

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) se identifican como Gram (+), no esporuladas y anaerobias facultativas (De Vuyst & Vandamme, 1994). Incluyen los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* (Jay, 1992; Requena, 1995). Las BAL se usan tradicionalmente como cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos y bebidas, contribuyendo principalmente al desarrollo de textura, sabor y aroma. Por otra parte, las BAL actúan inhibiendo el crecimiento de bacteria patógenas y de descomposición, dando lugar a productos estables y relativamente seguros ( Kelly y col., 1996; Franz y col., 1998; Zamfir y col., 1999).

Los compuestos antimicrobianos producidos por las BAL incluyen ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, reuterina y bacteriocinas (Enan y col., 1996; Larsen y col., 1993).

### 2.2 Bacteriocinas

Las bacteriocinas se definen como sustancias de naturaleza proteica, que en su forma activa ejercen un efecto antimicrobiano sobre bacterias relacionadas taxonómicamente con el microorganismo productor (Stiles, 1996; Parente y Ricciardi, 1999).

La función biológica de las bacteriocinas es antimicrobiana, permitiendo a sus productores competir con otras bacterias para sobrevivir (Nes y col., 1996; Toit y col., 2000).

## 2.2.1 Aplicación en la Industria de Alimentos

La creciente demanda del consumidor por productos naturales ha favorecido que las bacteriocinas producidas por BAL reciban atención en la investigación, debido a su aplicación potencial como sustancias conservadoras naturales en la industria de alimentos ( Ten Brink y col., 1994; Martínez y col., 2000 ; Zhu y col., 2000).

El espectro inhibitorio de las bacteriocinas de BAL se restringe a bacterias Gram (+). Varias bacteriocinas son activas sobre microorganismos de descomposición y patógenos incluyendo *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, etc. Numerosas bacteriocinas son termoestables, siendo factible su aplicación en combinación con tratamientos térmicos; parecen tener un modo de acción bactericida e irreversible, son biodegradables, digeribles, seguras para la salud y activas a bajas concentraciones (De Vuyst & Vandamme, 1994). La única bacteriocina que se comercializa es la nisina.

### 2.2.1.1 Nisina

La nisina es un péptido antibacteriano producido por *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, es soluble en medio acuoso y estable a pH ácido. En 1988 la FDA le concedió el estatus GRAS (Generalmente Reconocida como Segura). Actualmente el uso de nisina en alimentos se permite en más de 50 países (Delves – Broughton, 1998). La nisina se comercializa como agente antimicrobiano natural denominado Nisaplin® por Aplin & Barrett Ltd (Inglaterra) , como Chrisin® por Chr. Hansen (Dinamarca) y como Ambicin® por AMBI Inc. (USA) (Parente & Ricciardi, 1999; Wessels y col., 1999).

### 2.2.1.2 Ingredientes que contienen bacteriocinas

Otras bacteriocinas que se comercializan como ingredientes de alimentos son: Microgard® de Wesman Foods, Inc. (USA), ALTA® 2341 y Perlac® de Quest International (Holanda).

Alta 2341 se basa en el producto de fermentación de una BAL, presumiblemente *Pediococcus acidilactici* (Stiles, 1996; Szabo & Cahill, 1998).

Microgard es un producto de leche fermentada por acción de *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* ( De Vuyst & Vandame, 1994; Wessels y col., 1999).

Debido a la poca variedad en el mercado y al alto precio de éstas sustancias antimicrobianas, existen grupos de investigación dedicados a la búsqueda de microorganismos productores de bacteriocinas.

### **2.2.2 Proceso para obtener una bacteriocina pura**

En la literatura se reportan las etapas principales del proceso de obtención de una bacteriocina (Vaughan y col., 1992; Stoffels y col., 1992; Mathiew y col., 1993; Coventry y col., 1997; Yildirim & Jonson, 1998; Zheng & Slavik, 1999; Zhu y col., 2000).

Donde el procedimiento general es el siguiente:

- Escrutinio. Se realiza a partir de alimentos como: carne y productos cárnicos, leche y productos lácteos, vegetales, frutas, bebidas fermentadas y productos del mar. El objetivo es detectar bacterias productoras de bacteriocinas.
- Aislamiento e identificación de la bacteria productora de bacteriocina.
- Producción del extracto crudo de bacteriocina.

- Caracterización de la bacteriocina: sensibilidad a enzimas, estabilidad térmica, efecto de pH, espectro de inhibición.
- Purificación de la bacteriocina
- Secuenciación de la bacteriocina pura para establecer si es una bacteriocina nueva.

De las etapas mencionadas anteriormente, 3 requieren estimar la concentración de bacteriocina presente en una muestra: la producción del extracto crudo, la caracterización y la purificación de una bacteriocina. De aquí la necesidad de desarrollar procedimientos eficientes de cuantificación de bacteriocinas.

## **2.3 Cuantificación de bacteriocinas**

No existe un método oficial para cuantificar bacteriocinas. Existen casi tantos métodos de cuantificación como bacteriocinas. La cantidad de bacteriocinas en una muestra dada se expresa en Unidades Internacionales o en Unidades Arbitrarias.

### **2.3.1 Unidades**

#### **2.3.1.1 Unidades Internacionales**

La primera unidad descrita para expresar la cantidad de nisina, fue la Unidad Reading, posteriormente conocida como Unidad Internacional que se definió como la cantidad de nisina necesaria para inhibir una célula de *Streptococcus agalactiae* en 1 ml de caldo. Se denominó Unidad Reading en reconocimiento al hecho de que gran parte de la investigación en nisina se realizó en el Instituto Nacional de Investigación en Lácteos de Reading, Inglaterra (Rayman & Hurst, 1984; Delves – Broughton, 1998).

Las unidades Internacionales (UI) se usan únicamente para nisina.

### 2.3.1.2 Unidades Arbitrarias

Las bacteriocinas que no son nisina se cuantifican en unidades arbitrarias. Una Unidad Arbitraria (UA) se define como el recíproco de la dilución más alta a la cual una muestra aún exhibe actividad antibacteriana al aplicar el método de difusión en agar (Germond y col., 1997 ).

### **2.3.2 Métodos de cuantificación**

Las técnicas utilizadas para cuantificar bacteriocinas se basan generalmente en la cuantificación de la inhibición de crecimiento de un organismo sensible denominado microorganismo indicador (Caboy col., 1999; Martínez y col., 2000). Entre las técnicas más usadas se encuentran los métodos de difusión en agar (Wolf & Gibbson, 1996; Martínez y col., 2000) y los métodos turbidimétricos.

En los últimos años se han desarrollado también métodos de cuantificación más sensibles y menos laboriosos que los métodos basados en la actividad inhibitoria de una bacteriocina sobre un microorganismo indicador, como los Métodos inmunológicos (Suárez y col., 1996; Martínez y col., 2000) y los basados en Bioluminiscencia (Wahlström & Saris, 1994).

#### 2.3.2.1 Métodos de difusión en agar

Los métodos de difusión en agar tienen como característica común la medida de zonas de inhibición en un microorganismo indicador inoculado en placas de agar. El tamaño del halo de inhibición es el resultado de dos factores: difusión del compuesto antimicrobiano a través del agar y velocidad de crecimiento del organismo indicador (Hoover & Steenson 1993).

Para llevar a cabo los métodos de difusión en agar, se preparan diluciones de la muestra y se depositan en el agar de 3 posibles formas:

- Método de puntos. Se depositan puntos de cada dilución de la muestra sobre la superficie del agar. (Mayr-Harting y col., 1972; Hoover & Steenson, 1993).
- Método de fosas. Se horadan fosas de tamaño uniforme. Se vierte un volumen constante de cada dilución de la muestra en las fosas (BS 2040:1974; Germond y col., 1997).
- Método de discos de papel. Se deposita el disco de papel, previamente humedecido con un volumen fijo de dilución de la muestra, sobre la superficie del agar (Ohmomo y col., 2000; Navarro y col., 2000).

Tanto la difusión de la bacteriocina como la velocidad de crecimiento del organismo indicador dependen de variables como: medio y condiciones de cultivo adecuados para el microorganismo indicador; densidad del inóculo; peso molecular, carga iónica y tiempo de difusión de la bacteriocina; viscosidad y profundidad del agar, así como temperatura y tiempo de incubación de la placa de ensayo. Estos factores deben ser controlados para obtener respuestas reproducibles (Barry, 1976; Davidson & Parish, 1989; Blom y col., 1997; Cabo y col., 1999).

### 2.3.2.2 Método Turbidimétrico

En el método turbidimétrico la inhibición de un microorganismo indicador se estima a través de la medición de densidad óptica del medio de ensayo ( Jiménez-Díaz y col., 1995; Cintas y col., 1997; Blom y col., 1999), dicho método se realiza de la siguiente forma:

- Se preparan diluciones de la muestra y se depositan a volumen constante generalmente en pozos de microplacas .
- Cada pozo se inocula con un volumen constante de cultivo del microorganismo indicador
- Después de un periodo estandarizado de incubación, se cuantifica la inhibición del microorganismo indicador por efecto de la bacteriocina al medir la densidad óptica del cultivo.

### **2.3.3 Microorganismos Indicadores**

Se elige como microorganismo indicador a aquel microorganismo que sea más sensible a la bacteriocina en estudio. (Mota-Meira y col., 2000; Guyonnet y col., 2000).

En el apéndice 1 se muestra un resumen de algunas bacteriocinas estudiadas, así como el método y microorganismo indicador utilizados para su cuantificación.

Hasta el momento el único método estandarizado para la cuantificación de bacteriocinas es el de la nisina. Para cuantificar nisina primeramente Hirsch usó en 1950 a *Streptococcus cremoris* como el microorganismo indicador. Mocquot y Lefebvre en 1956 usaron a *Lactococcus lactis* y *Streptococcus cremoris*. Por su parte Tramer y Fowler en 1964 usaron a *Micrococcus luteus*. (Hoover & Steenson, 1993), a raíz de lo

anterior el Estándar Británico BS 4020:1974 estableció a *M. luteus* como microorganismo indicador para cuantificar nisina. El uso de dicho estándar es útil en la cuantificación de otras bacteriocinas siempre y cuando *M. luteus* sea sensible a ellas.

## 2.4 *Micrococcus luteus*

*Micrococcus luteus* tiene la siguiente clasificación taxonómica:

Reino	Eubacteria
Clase	Firmicutes
Subclase	Actinobacteridae
Orden	Actinomycetales
Suborden	Micrococccineae
Familia	Micrococccaceae
Género	Micrococcus

*Micrococcus luteus* es una de las nueve especies del género *Micrococcus*, presenta forma de coco con un diámetro de 1.0 – 2.0  $\mu\text{m}$ , forma tetradas o racimos irregulares, inmóvil, su reacción a la tinción de Gram es (+). Las colonias son convexas de borde regular y de color amarillo, cuyo pigmento es dihidroxi C<sub>50</sub> carotenoide (Sneath y col., 1986; Votyakova y col., 1994; Atlas, 1995).

La piel humana es considerada como el hábitat principal de la bacteria, sin embargo se ha detectado en las membranas mucosas, incluyendo la cavidad bucal; así como en agua y suelo (Holt y col, 1994; Monodane y col., 1996).

Entre los medios de cultivo para lograr su reproducción se encuentra el caldo nutritivo (Monodane y col., 1996), medio mínimo de lactato (contiene L- lactato) (Votyakova y col., 1994; Mukamolova y col., 1998), caldo PWYE con peptona (Welby y

col., 1996), caldo extracto de levadura 0.5% y 1% de glucosa, agar Assay de Tramer y Fowler (Wolf y Gibbons, 1996) , agar Assay (Estándar Británico BS: 4020, 1974), y agar BHI (Oscáris & Pisabarro, 2000 ).

Las temperaturas mínima, óptima y máxima de crecimiento de *M. luteus* son: 10°C, 30 °C y 45 °C respectivamente (Pelczar y col.,1982; Votyakova y col.,1994; Welby y col., 1996; Wolf & Gibbons, 1996 ). Es un microorganismo estrictamente respiratorio y algunos autores lo reportan cultivado con agitación de 200 rev min<sup>-1</sup> (Votyakova y col., 1994; Welby y col., 1996; Wolf & Gibbons, 1996).

## **2.5 *M. luteus* como indicador en la cuantificación de la bacteriocina WB1**

### **2.5.1 Bacteriocina WB1**

La bacteriocina WB1 es producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y es activa contra *M. luteus*. Dicha bacteriocina está en proceso de purificación por nuestro grupo de trabajo (Santiago, 2000). Para estimar la concentración de la bacteriocina WB1 a lo largo de su purificación se ha venido utilizando el método de cuantificación de bacteriocinas denominado Método Base S.

### **2.5.2 Método Base S**

Este método Base S es un método de difusión en agar, modificado del Estándar Británico BS 4020:1974 por Regalado y col.,(2000), Pereyra y Trejo (1999) y Santiago (2000). Este método especifica el uso de fosas y el uso de *M. luteus* como microorganismo indicador. Tanto el procedimiento descrito por el Estándar Británico BS 4020: 1974, como el Método Base S, se describen en las Figuras 1 y 2 respectivamente.

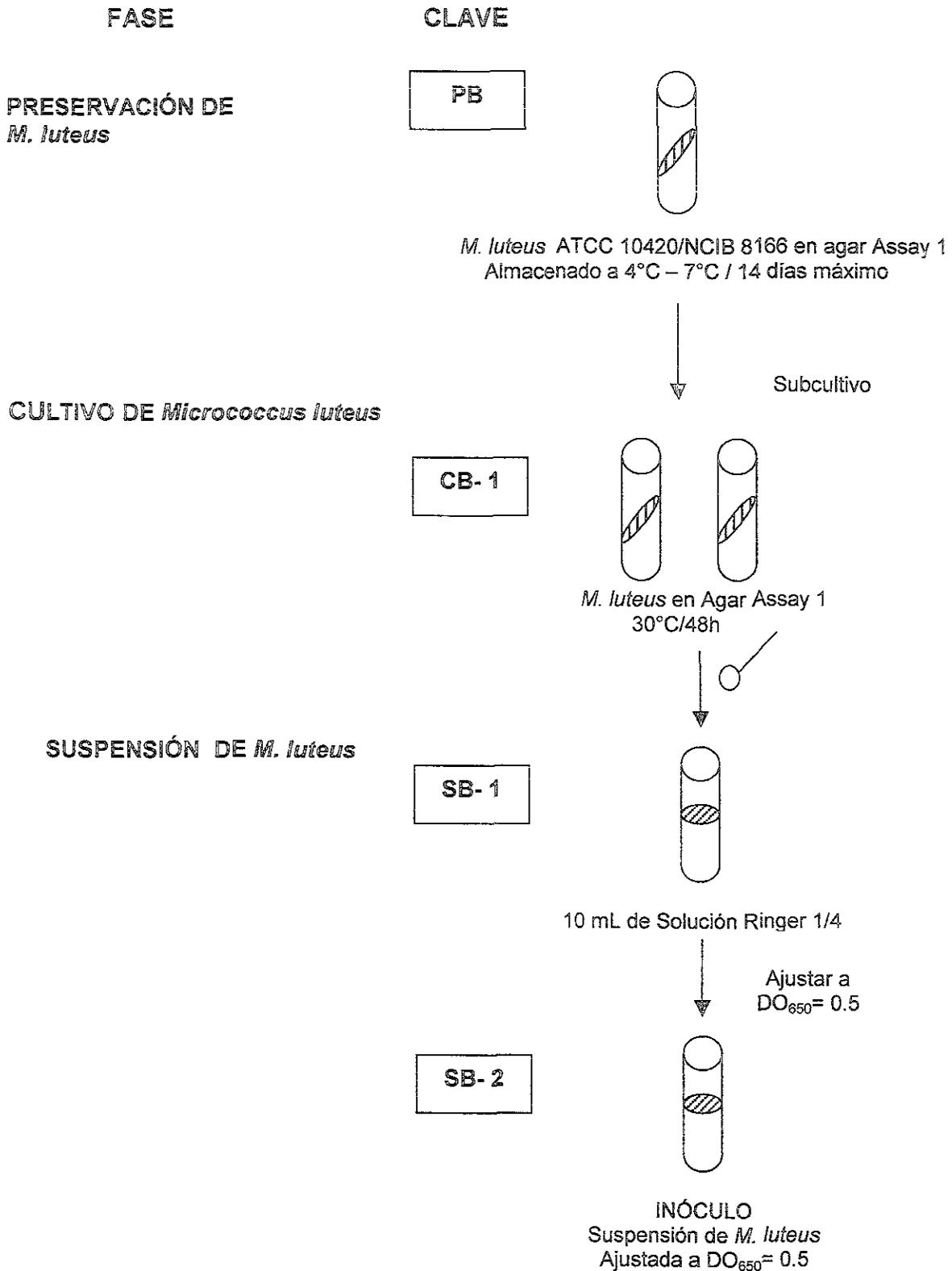
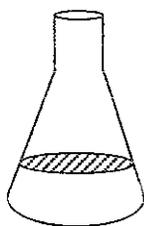


Figura 1. Estándar Británico BS 4020:1974 para cuantificación de nisina

PREPARACIÓN DE  
PLACAS DE ENSAYO

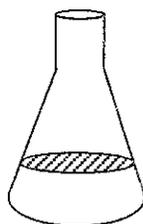
PLB - 1



Tween 80 en agua 1:1  
50°C ± 2°C / 20 – 30 min.

2% V/V

PLB - 3



PLB - 2

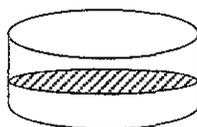


2% V/V

Agar Assay 1 a 50°C ± 2°C

INÓCULO  
*M. luteus* en suspensión

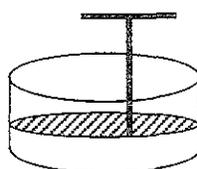
PLB - 4



3mm – 4 mm de  
profundidad

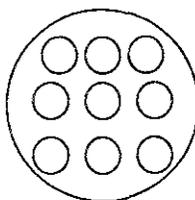
Solidificar y almacenar a 4°C – 7 °C / 1h

PLB - 5



Hacer pozos con horador  
7 mm a 9 mm de diámetro

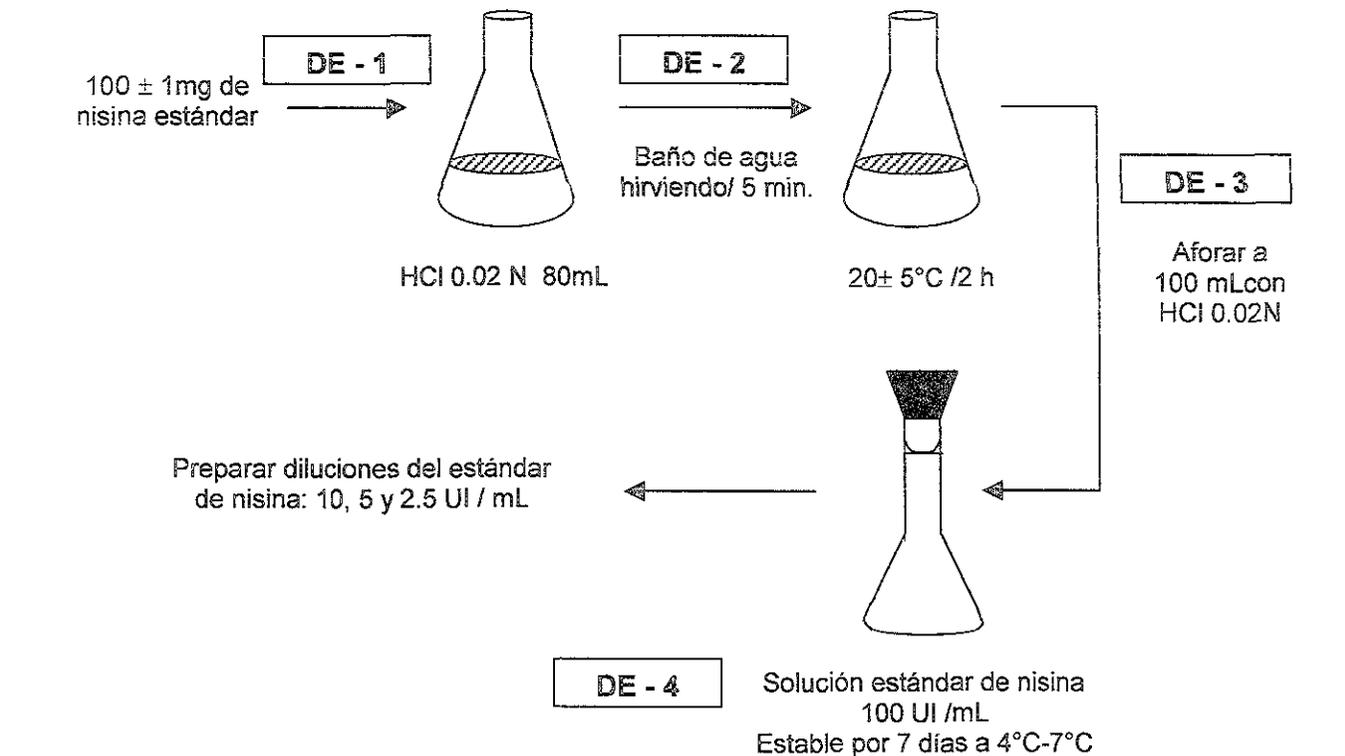
PLB - 6



Placas de ensayo  
Distancia entre los centros de pozos:  
30mm  
Distancia entre los pozos y la pared de la  
caja: 2 mm

Figura 1. Estándar Británico BS 4020:1974 para cuantificación de nisina (continuación).

## DILUCIÓN DEL ESTÁNDAR



## CUANTIFICACIÓN DE NISINA

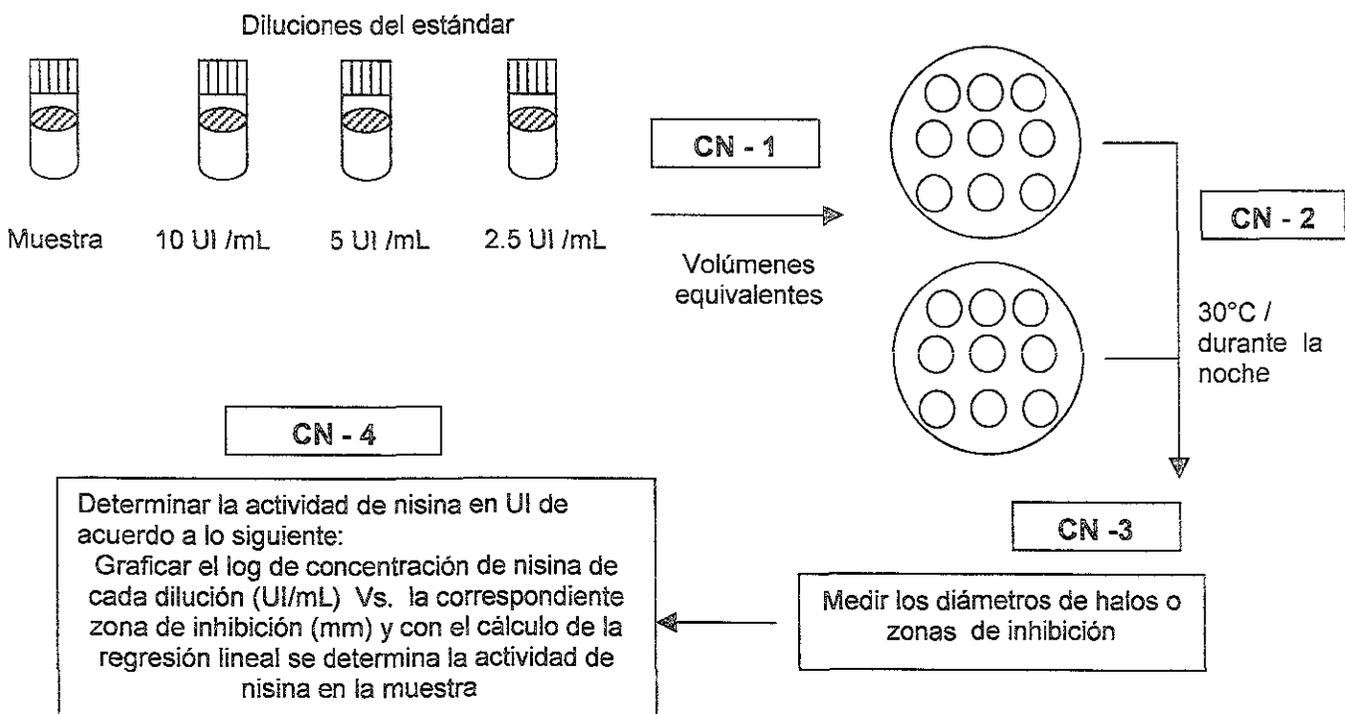


Figura 1. Estándar Británico BS 4020:1974 para cuantificación de nisina (continuación).

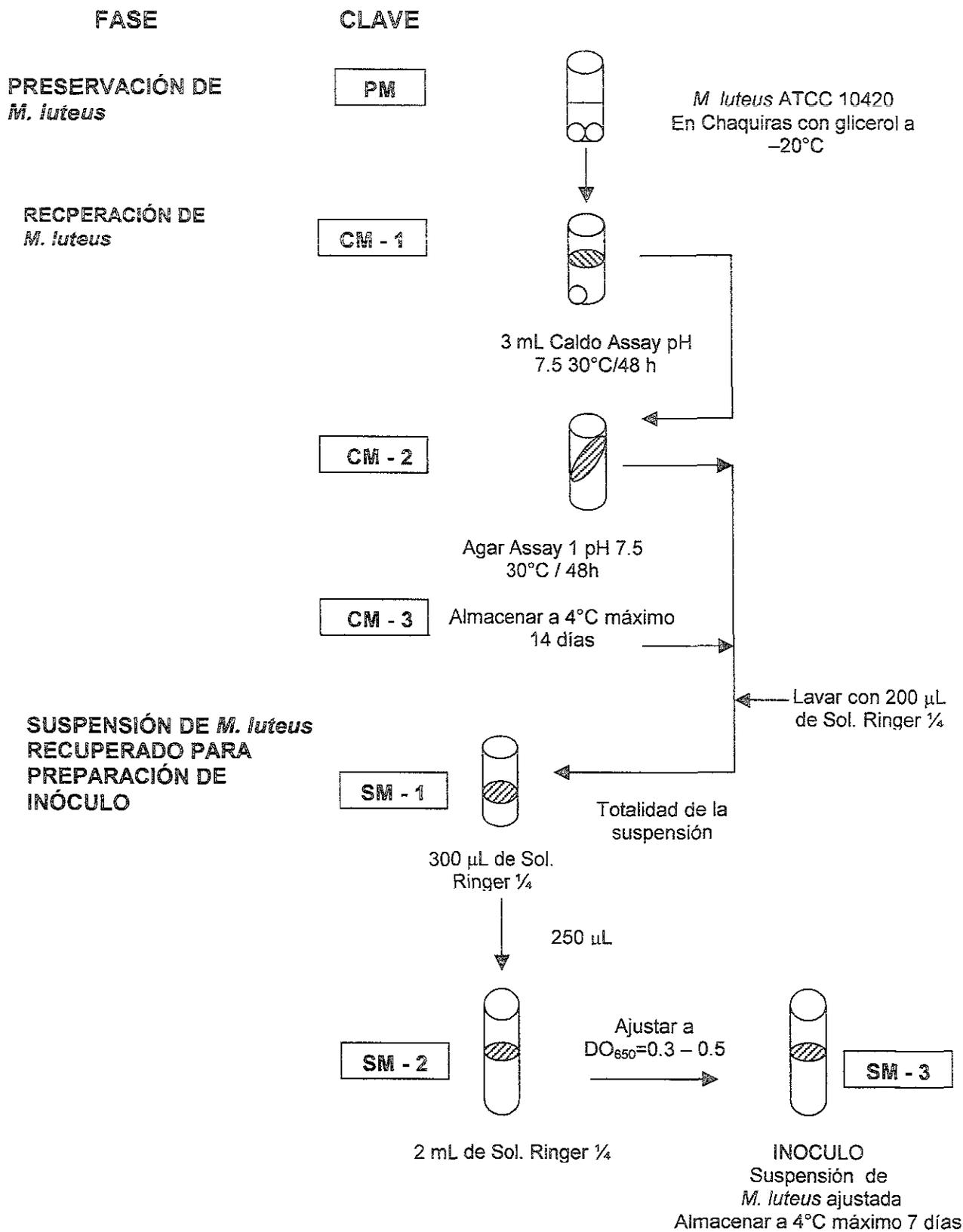
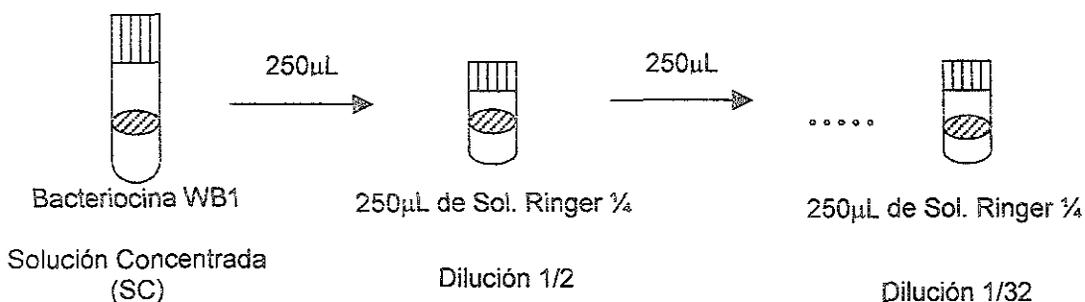


Figura 2 . Método Base S para cuantificar a la bacteriocina WB1 (Modificado del Estándar Británico BS 4020:1974) (continuación).



## PREPARACIÓN DE DILUCIONES SERIADAS



## CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD DE LA BACTERIOCINA WB1

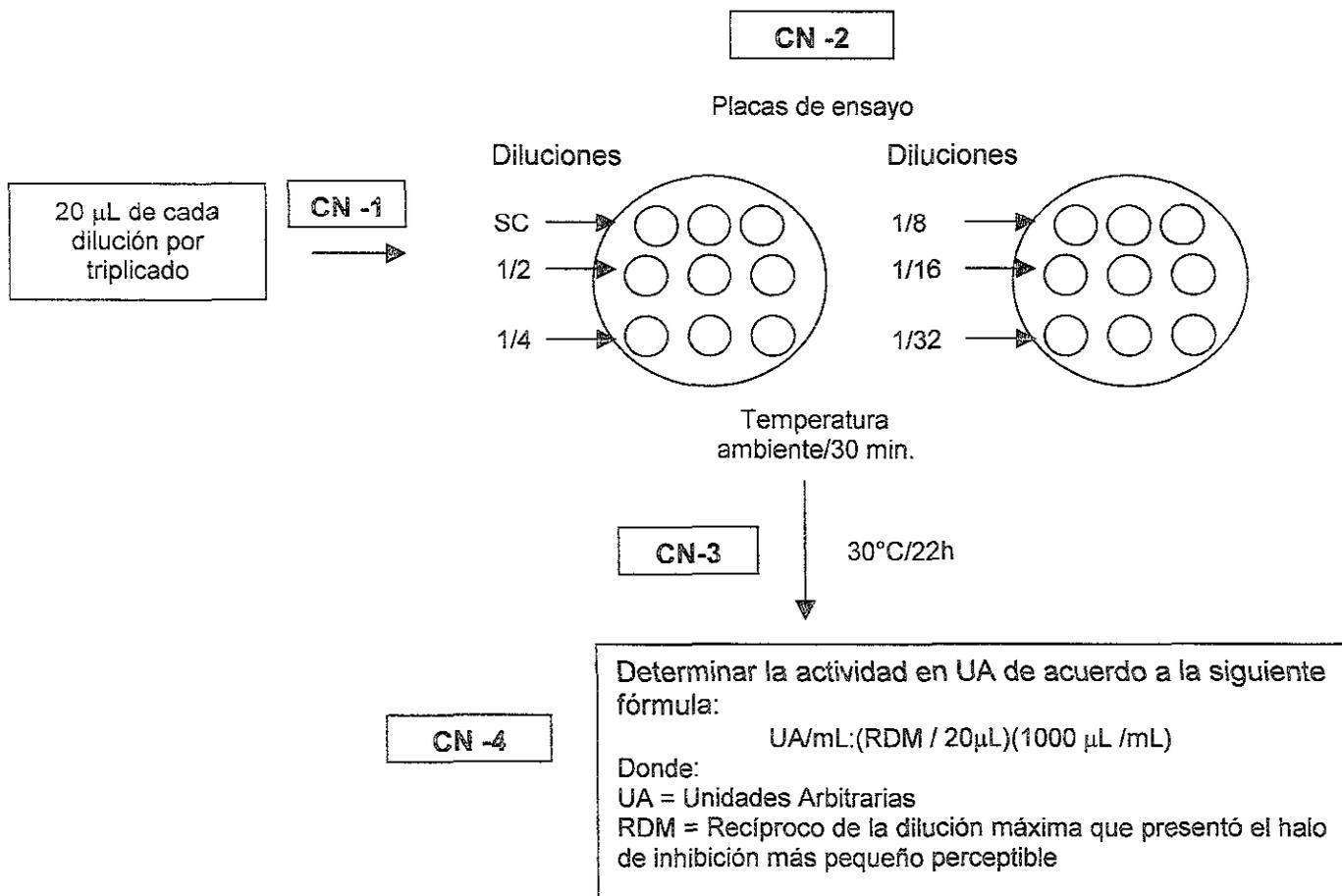


Figura 2 . Método Base S para cuantificar a la bacteriocina WB1 (Modificado del Estándar Británico BS 4020:1974) (continuación).

### 2.5.3 Deficiencias del Método Base S

La cuantificación de la bacteriocina WB1 mediante el Método Base S ha presentado dificultades frecuentes que involucran la falta de crecimiento o el crecimiento irregular de *M. luteus* en las siguientes etapas:

- 1) Cultivo de *M. luteus* en medio líquido. Específicamente en la fase CM- 1, descrita en la figura 2.
- 2) Cultivo de *M. luteus* en medio sólido. Particularmente en las fases CM – 2 (cultivo en viales ) y CN - 3 (cultivo en placas de ensayo), descritas en la figura 2.

La falta de crecimiento de *M. luteus* en las placas de ensayo (fase CN - 3) después del periodo de incubación impide observar zonas de inhibición imposibilitando la cuantificación a la bacteriocina WB1. El crecimiento irregular del microorganismo indicador ( en las fases CM - 1, CM – 2 y CN - 3) provoca un aumento del diámetro de los halos de inhibición imposibilitando la cuantificación de la bacteriocina WB1.

Otra dificultad frecuente es la cuantificación de la bacteriocina WB1 mediante el método Base S que se ha venido observando es la variación en el halo de inhibición más pequeño perceptible (fase CN – 4). Debido a que el método se realiza utilizando diluciones seriadas de 2 en 2, el uso de una dilución o la siguiente en el cálculo de actividad implica una reducción del 50% de actividad, afectando la reproducibilidad del método.

En todos los casos mencionados anteriormente, los experimentos tienen que ser repetidos, representando una gran inversión de tiempo y recursos.

Las deficiencias mencionadas en el método Base S pueden atribuirse a problemas que se detallan a continuación.

## **2.6 Factores involucrados en las deficiencias del Método Base S para la cuantificación de la bacteriocina WB1**

### **2.6.1 Crecimiento del microorganismo indicador**

La principal deficiencia del Método Base S consiste en problemas durante el cultivo del microorganismo indicador (*M. luteus*). Dichos problemas involucran la falta de crecimiento o crecimiento irregular de *M. luteus* tanto en medio sólido como en medio líquido. De acuerdo a la literatura, en ambos casos (sólido y líquido) los factores determinantes de crecimiento de un microorganismo son:

- a) El método de preservación
- b) Las condiciones de cultivo
- c) La manipulación del inóculo

#### **2.6.1.1 Métodos de preservación de cultivos**

El objetivo principal de la preservación de cultivos es mantener al organismo vivo, libre de contaminación y sin variaciones o mutaciones, es decir, preservar al cultivo en una condición tan cercana como sea posible al microorganismo aislado originalmente. Muchos métodos han sido usados para preservar bacterias pero no todas las especies responden en forma similar a un método dado (Collins, 1989; Kirsop & Doyle, 1991; Gerhardt y col., 1994; Smith, 1997). Los métodos de preservación se clasifican generalmente en:

### A. Métodos a corto plazo

- Subcultivo (3 meses – 5 meses)
- Inmersión en aceite (3 meses – 2 años)
- Congelación ordinaria (6 meses – 2 años)
- Congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  en glicerol o DMS y en chaquiras de vidrio (10 años)
- Secado sobre arena, tierra, silicagel, tiras o discos de papel y discos de agar (2 años - 5 años)

### B. Métodos a largo plazo

- Liofilización ( hasta 50 años)
- Ultracongelación ( más de 35 años)

#### 2.6.1.2 Condiciones de cultivo

Los factores de cultivo que influyen en la multiplicación de bacterias pueden dividirse en dos categorías principales: factores ambientales y factores nutricionales.

Factores Ambientales	Factores Nutricionales	Reportados por
Temperatura, oxígeno, pH, presión osmótica y efectos de luz	Requerimientos de carbono, hidrógeno, nitrógeno, fósforo y azufre, así como elementos traza	Prescott y col., 1996; Atlas, 1997; Tórtora y col., 1998; Nester y col., 1998.

En medio sólido un factor determinante de crecimiento es la concentración del agar utilizado. Un agar al 1% - 2% proporciona una superficie lo suficientemente húmeda para facilitar el crecimiento y lo bastante seca para mantener separadas las colonias ( Tortora y col., 1998; Prescott y col., 1996 ; Davis y col., 1984). Si se usan concentraciones muy altas, el crecimiento de algunas bacterias puede ser inhibido por el aumento de la presión osmótica (Tortora y col., 1998).

### 2.6.1.3 Manipulación del inóculo

El inóculo debe provenir de un microorganismo recién cultivado, el cuál se diluye para obtener una suspensión ajustada del microorganismo indicador y posteriormente se resuspende en un medio sólido previamente fundido (Gruenwedel & Whitaker, 1985).

Una fuente común de errores es la inadecuada manipulación del inóculo, ocasionada por el uso de diluyentes inapropiados (Parish & Davidson, 1989), o por malas condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura) (Barry, 1976).

### 2.6.2 Difusión de la bacteriocina WB1

Otra dificultad observada en el Método Base S ha sido la variación en el halo de inhibición más pequeño perceptible (fase CN - 4).

Un factor determinante en el tamaño del halo de inhibición es la difusión de la bacteriocina WB1 a través del agar de la placa de ensayo (fase CN - 2). Para facilitar el proceso de difusión algunos autores incluyen como parte de su método de cuantificación a los siguientes procedimientos:

- a) Adición de Tween al agar de las placas de ensayo (Estándar Británico BS 4020: 1974; De Martinis y col., 1997; Elegado y col., 1997).
- b) Aplicación de un periodo de preincubación a las placas de ensayo (Parente & Hill 1992; Jiménez-Díaz y col., 1995; Cintas y col., 1997; Suma y col., 1998).
- c) Variación de la concentración del agar de las placas de ensayo (Wolf & Gibbons, 1996; Carolissen – Mackay y col., 1997).

De acuerdo a la literatura, los factores determinantes en la difusión de una bacteriocina son:

- a) Composición de agar en las placas de ensayo
- b) Concentración de agar en las placas de ensayo

#### 2.6.2.1 Composición de agar en las placas de ensayo

La composición del medio sólido influye en la formación de halos o zonas de inhibición en las placas de ensayo, debido a su efecto sobre la actividad y velocidad de difusión del compuesto antimicrobiano, así como a su repercusión en la velocidad de crecimiento del microorganismo indicador (Barry, 1976).

#### 2.6.2.2 Concentración de agar en las placas de ensayo

La concentración de agar en las placas de ensayo para la cuantificación de bacteriocinas puede ser única o combinada. Lo anterior se logra mediante el uso de capas y sobrecapas de agar.

2.6.2.1 Placas de ensayo con capas de agar: Compuestas solamente por una capa de agar con una concentración única que varía de 0.7% a 1.5% (Parente & Hill, 1992; Mathieu y col., 1993; Jiménez-Díaz y col., 1995; Georgalaky y col., 2000).

2.6.2.2 Placas de ensayo con sobrecapa de agar: Compuestas de una capa de agar (1.5 %) y una sobrecapa de agar suave cuya concentración varía entre 0.7% y 0.8% (Elegado y col., 1997; Enan y col., 1996; Bogovic- Matijasic y col., 1998; Choi y col., 2000; Zhu y col., 2000).

## 2.7 Factores del Método Base S sujetos a optimización

Con base en los factores descritos en el inciso anterior se considera que las deficiencias en el Método Base S pueden ser superadas mediante el estudio específico de las siguientes fases (ilustradas en la figura 2):

- Fase PM: Preservación de *M. luteus*
- Fase CM-1: Recuperación de *M. luteus* en caldo Assay
- Fase CM-2: Resiembra de caldo Assay a agar Assay para recuperación de *M. luteus*.
- Fase CM-3: Almacenamiento de *M. luteus* recuperado en agar Assay
- Fase SM-3: Almacenamiento del inóculo de *M. luteus*
- Fase PLM-5: Efecto de placa de ensayo con sobrecapa de agar

Adicionalmente, podría incluirse a uso de un estándar de referencia en el Método Base S. El Estándar Británico BS: 4020: 1974 menciona que las variables que influyen en la detección de las zonas de inhibición son compensadas por la aplicación de controles y establece el uso de una solución estándar de nisina como parte de estos controles permite la cuantificación de nisina en una muestra. El Método Base S no incluye el uso de un estándar de referencia por lo que puede estudiarse la posibilidad de incorporarlo para mejorar el método.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

- Optimizar el Método Base S para la cuantificación de la bacteriocina WB1

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar el método de preservación actual de *M. luteus* (fase PM del método Base S) con otros posibles métodos de preservación.
- Estudiar la metodología para la recuperación de *M. luteus* en medio líquido a partir de medio de preservación (fase CM-1 del Método Base S).
- Estudiar la resiembra de medio líquido a medio sólido para la recuperación de *M. luteus* (fase CM-2 del Método Base S) .
- Monitorear la viabilidad a través del tiempo de *M. luteus* recuperado en medio sólido (fase CM-3 del Método Base S).
- Estudiar la preparación del inóculo (fase SM-1 a SM-3 del Método Base S).
- Monitorear la viabilidad a través del tiempo del inóculo de *M. luteus* (fase SM-3 del Método Base S).
- Establecer un estándar de referencia para la cuantificación de actividad de la bacteriocina WB1.
- Evaluar la composición y concentración de agar para la determinación de actividad de la bacteriocina WB1 (fase PLM-5 del Método Base S).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Medios de cultivo y soluciones

#### 4.1.1 Medios de cultivo

##### 4.1.1.1 Medios de cultivo preparados por ingredientes

Caldo Assay (g/L: peptona bacteriológica (Difco 0118-17 )10; extracto de carne (Bioxon 160-3 ) 3; NaCl 3; extracto de levadura (Bioxon 155-3 ) 1.5 y azúcar mascabado (Genuino ) 1); pH 7.0.

Agar Assay 1. Caldo Assay adicionado con 1% (P/V) de agar bacteriológico (Bioxon 150-1 ); pH 7.5.

Agar Assay 2. Caldo Assay adicionado con 0.8 % (P/V) de agar bacteriológico; pH 7.5.

Agar Assay 3. Caldo Assay adicionado con 1% (P/V) de agar bacteriológico; pH 7.0.

##### 4.1.1.2 Medios de cultivo comerciales

Caldo BHI (Brain Heart Infusión) (Difco 0037-17-8 ) preparado de acuerdo a las instrucciones del proveedor, excepto que se ajustó el pH a 7.0

Agar BHI 1. Caldo BHI adicionado con 1% (P/V) de agar bacteriológico; pH 7.0.

Agar BHI 2. Caldo BHI adicionado con 0.8% (P/V) de agar bacteriológico; pH 7.0.

Agar BHI 3. Caldo BHI adicionado con 1.5% (P/V) de agar bacteriológico; pH 7.0.

Caldo nutritivo (Bioxon 103-1) pH 7.0.

Agar nutritivo 1. Caldo nutritivo adicionado con 1% (P/V) de agar bacteriológico y 7% de peptona de caseína (Bioxon 153-3); pH 7.0.

#### 4.1.2 Soluciones

Solución Ringer concentrada (g/L: NaCl 9; KCl 0.42 g; CaCl<sub>2</sub> anhidro 0.24; NaHCO<sub>3</sub> 0.2) pH 7.5.

Solución Ringer ¼: (a una parte de la solución Ringer se le adicionan 3 partes de agua destilada) pH 7.5

Agua peptonada 0.1% (g/L: peptona de caseína (Bioxon 153-3), 1) pH 7.0

Glicerol 10% (V/V)

Soluciones de Nisaplin<sup>®</sup> (Aplin & Barrett):

A) 100 mg/0.1 L HCl 0.02N.

B) 100 mg /0.1L HCl 0.02 N – NaCl 0.075%.

C) 100 mg /L Agua pH 2.

D) 100 mg/L Agua pH 5.

#### 4.2 Microorganismo

La cepa utilizada fue *Micrococcus luteus* ATCC 10240 / NCIB 8166 adquirida en presentación liofilizada y reconstituida de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

##### 4. 2.1 Cultivos de trabajo

Cultivo de trabajo A: Obtenido a partir de *M. luteus* reconstituido y congelado en medio Assay con glicerol a –70°C (apéndice 2).

Cultivo de trabajo B: Obtenido a partir de cultivo de trabajo A y congelado en medio BHI con glicerol a –70°C (apéndice 2).

### 4.3 Métodos de preservación

Para el estudio de comparación métodos de preservación para *M. luteus* se realizaron siembras por abundancia en Agar Assay a partir del cultivo de trabajo A como se describe en la figura 3. Se compararon 3 métodos de preservación: secado en discos de agar, congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  en chaquiras con glicerol (método actual) y congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  en medio de cultivo con glicerol (figuras 4, 5 y 6) utilizando métodos adaptados de los procedimientos descritos por Hernández y col. (2000); Jones y col.,(1991) y Gherna (1994) respectivamente . Se realizaron cuentas viables de *M. luteus* por vertido en placa y por extensión superficial antes y después de efectuar cada método (apéndice 3), para determinar pérdida de viabilidad en cada uno de ellos. Las cuentas viables se calcularon mediante las siguientes fórmulas:

A) Vertido en placa

$\text{UFC/mL} = \text{Promedio de las colonias contadas} \times \text{Recíproco de la dilución leída}$

B) Extensión superficial

$\text{UFC/mL} = \frac{\text{Promedio de las colonias contadas} \times \text{Recíproco de la dilución leída}}{\text{Volumen de la dilución}}$

Volumen de la dilución

La pérdida de viabilidad se calculó mediante la reducción log de acuerdo la siguiente fórmula:

$\text{Reducción log} = \log \text{UFC/mL inicial} - \log \text{UFC/mL final}$

Donde, inicial = antes de efectuar el método de preservación

final = después de efectuar el método de preservación

#### 4.4 Recuperación de *M. luteus* en medio líquido a partir del medio de preservación

Se evaluó el crecimiento de *M. luteus* variando las siguientes condiciones:

- i) Crecimiento en dos medios de cultivo: caldo BHI y caldo Assay
- ii) Velocidad de agitación: estático y a  $150 \text{ rev min}^{-1}$
- iii) Volumen de cultivo de trabajo

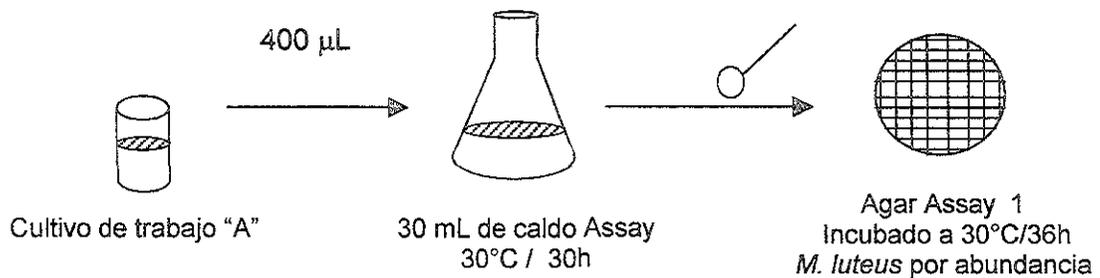


Figura 3. Preparación de cultivos de *M. luteus* por abundancia.

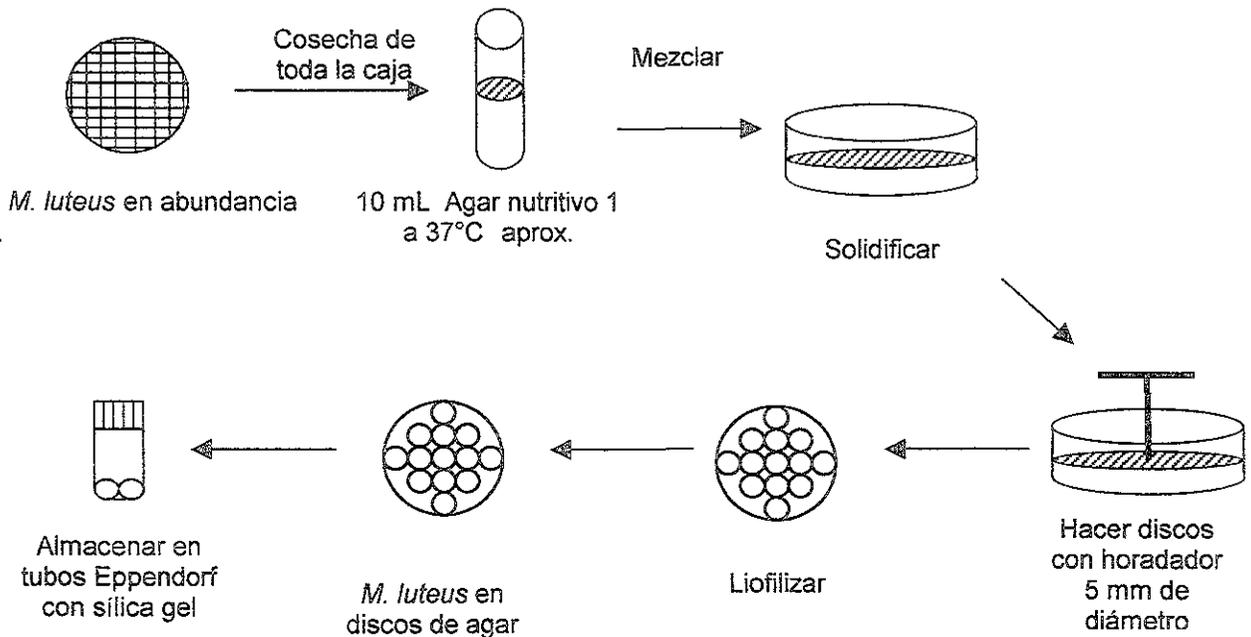


Figura 4. Preservación de *M. luteus* por secado en discos de agar (adaptado de Miranda y Hernández, 1999).

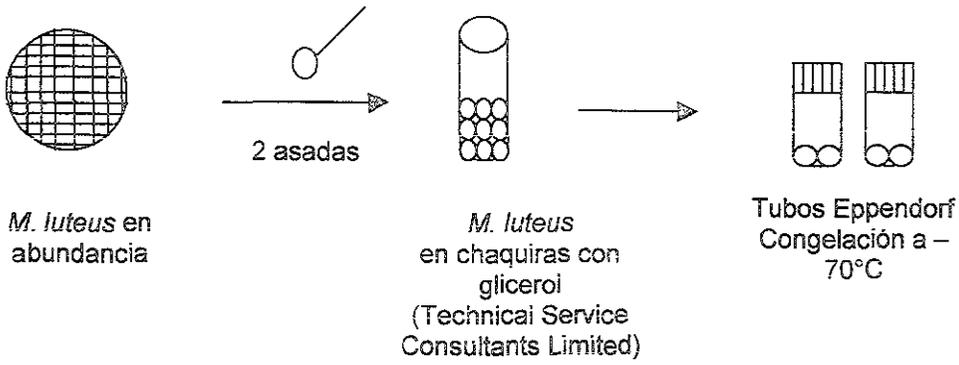


Figura 5. Preservación de *M. luteus* por congelación a -70°C en chaquiras con glicerol (adaptado de Jones y col. 1991).

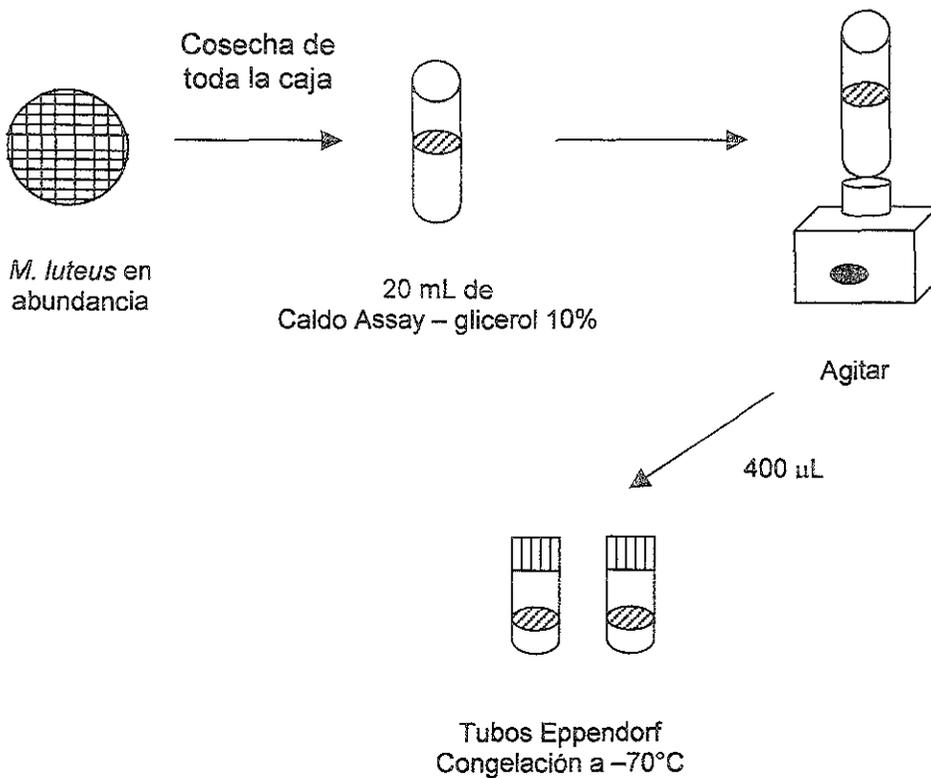


Figura 6. Preservación de *M. luteus* por congelación a -70°C en medio de cultivo con glicerol (adaptado de Gherna, 1994).

#### **.4.1 Efecto del medio de cultivo.**

El Estándar Británico BS 4020: 1974 y el Método Base S establecen como medio de cultivo para *M. luteus* al medio Assay. Por su parte Oscáriz y Pisabarro (2000) utilizan el medio BHI. En el presente trabajo se experimentó con ambos medios.

Se inocularon volúmenes de 4 mL de caldo BHI y 4 mL de caldo Assay con una muestra del cultivo de trabajo "A" previamente descongelado a temperatura ambiente. Los volúmenes inoculados se incubaron por 48 horas a 30°C. Se determinó la Densidad Óptica (DO) de cada cultivo a 550 nm a las 24 y 48 horas de incubación. Los experimentos se realizaron por duplicado.

#### **4.4.2 Efecto de la agitación**

El Estándar Británico BS 2040:1974 y el Método Base S establecen el cultivo de *M. luteus* sin agitación, en tanto que algunos autores como Welby y col. (1996); Votyakova y col (1994) recomiendan el uso de agitación. Por lo tanto, se estudió el efecto de la agitación en el crecimiento de *M. luteus*.

Por otro lado, en el Método Base S se cultiva a *M. luteus* a partir del medio de preservación en 3 mL de caldo Assay (fase CM-1). En éste trabajo se inocularon diferentes volúmenes de medio Assay y BHI con 2.5% de cultivo de trabajo "A" previamente descongelado, como se muestra en la Tabla 1. Inmediatamente después de inocular se tomó 1 mL de muestra de cada medio para determinar DO a 550 nm. Los cultivos se incubaron a 30°C en condiciones estáticas y en cultivo agitado a 150 rev min<sup>-1</sup>. Después de 11 horas de incubación se determinó nuevamente la DO a 550 nm de cada cultivo. Cada experimento se realizó por duplicado.

Caldo de cultivo	Volumen del medio (mL)	Volumen de cultivo de trabajo inoculado ( $\mu$ L)
Assay		125
BHI	5 mL en vial de 10 mL	125
	10 mL en Matraz Erlenmeyer de 25 mL	250

Tabla 1. Condiciones experimentales para el cultivo de *M. luteus* con agitación.

#### 4.4.3 Efecto del volumen de cultivo de trabajo

En el Método Base S se utiliza una chaquiras de *M. luteus* inoculada en 3 mL de caldo Assay para iniciar la recuperación del medio de conservación (fase CM- 1).

En el presente trabajo se emplearon matraces Erlenmeyer de 25 mL trabajando con volúmenes de 10 mL de caldo BHI, los cuales se inocularon con 100 $\mu$ L y 250  $\mu$ L de cultivo de trabajo "B" previamente descongelado. Los medios inoculados fueron incubados a 30°C con agitación de 150 rev min<sup>-1</sup> por un lapso de 11 horas. El crecimiento de *M. luteus* se determinó por DO a 550 nm. Cada experimento se realizó por duplicado.

#### 4.5 Resiembra de medio líquido a medio sólido para la recuperación de *M. luteus* a partir del cultivo de trabajo

El Método Base S establece que la resiembra de medio líquido a medio sólido para la recuperación de *M. luteus* se realice en viales inclinados de agar Assay 1 (fase CM-2). Por las deficiencias presentes en dicha etapa en el presente trabajo se estudió

la alternativa de utilizar Agar BHI. Se estudiaron diferentes concentraciones de agar BHI tanto en tubos inclinados como en cajas de Petri como se describe a continuación.

#### 4.5.1 Efecto de la concentración del agar

Se inocularon 10 mL de caldo BHI con 250  $\mu$ L de cultivo de trabajo "B" previamente descongelado. El medio inoculado se incubó a 30°C agitado a 150 rev min<sup>1</sup>. Después de 11 horas de incubación se estirió el cultivo tanto en cajas de Petri como tubos inclinados con tapón de algodón conteniendo agar BHI 1 y agar BHI 3. Los tubos y cajas se incubaron a 30°C por 48 h. Se determinaron las siguientes características morfológicas de cada cultivo: abundancia, borde, textura, color, tamaño y elevación de las colonias.

#### 4.6 Viabilidad a través del tiempo de *M. luteus* recuperado en medio sólido

El Estándar Británico BS 4020: 1974 y el Método Base S recomiendan que *M. luteus*, una vez recuperado en agar Assay a partir del medio de preservación, sea almacenado durante un máximo de 14 días a 4°C – 7°C (fase CM-3).

En este trabajo se estudió la viabilidad a través del tiempo de *M. luteus* recuperado en tubos inclinados y en cajas de Petri con agar BHI 3. Los cultivos se almacenaron a 4°C y cada 0, 9, 14 y 21 días se preparó una suspensión de cada cultivo (inóculo) como se describe en la figura 7. Se determinaron las cuentas viables de cada suspensión por vertido en placa utilizando 1 mL de la suspensión ajustada ( $DO_{550} = 0.2$ ). Así mismo, se plaqueó *M. luteus* en capas de agar BHI 2 (como se muestra en la figura 8). Cada experimento se realizó por duplicado.

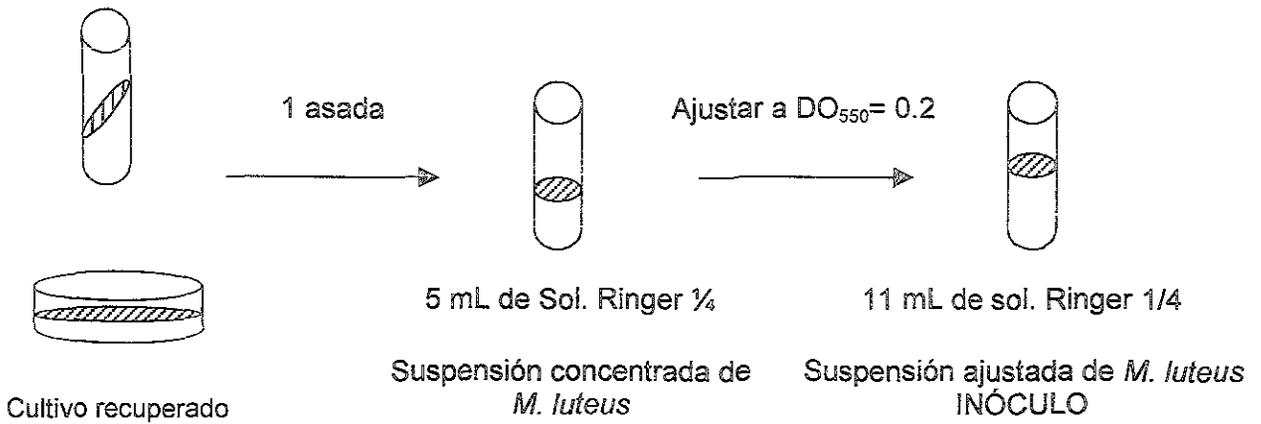


Figura 7. Preparación de la suspensión de *M. luteus* (inóculo) a partir de un cultivo en medio sólido.

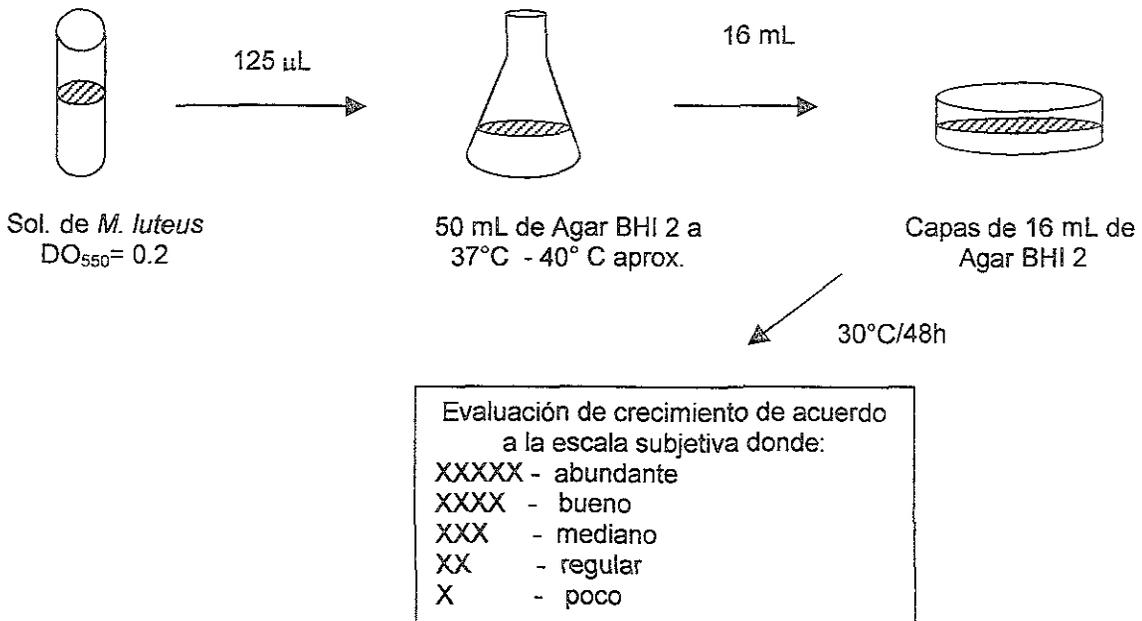


Figura 8. Evaluación de calidad del crecimiento de *M. luteus*.

#### **4.7 Preparación de inóculo**

En el Método Base S el inóculo de *M. luteus* se prepara suspendiendo el cultivo recuperado en tubos de agar Assay inclinado (fase SM-1 a SM-3). De acuerdo al Método Base S, dicho inóculo permanece viable en almacenamiento por no más de 7 días a 4°C – 7°C.

En el presente trabajo el inóculo de *M. luteus* se preparó a partir de cultivos recuperados en agar BHI 3 (cajas de Petri y tubos con agar inclinado) como lo indica la figura 7. Se estudiaron cultivos recuperados almacenados durante 0 y 14 días a 4°C. Una vez preparados los inóculos se almacenaron a 4°C y se evaluaron a los 0, 2, 4 y 9 días. La evaluación se realizó por recuento de células viables por vertido en placa. Se evaluó también la calidad de crecimiento en capas de agar BHI 2 (figura 8). Cada experimento se realizó por duplicado.

#### **4.8 Estándar de referencia**

##### **4.8.1 Preparación del estándar de referencia**

En este trabajo se realizaron estudios de nisina como estándar de referencia. Se estudiaron cuatro soluciones de nisaplin<sup>®</sup>:

- A) 100 mg diluidos en 0.1 L HCl 0.02 N de acuerdo al Estándar Británico BS 4020:1974.
- B) 100 mg diluidos en 0.1 L de HCl 0.02 – NaCl 0.75% de acuerdo a Montville y col., (1999).
- C) 100 mg diluidos en 1L de agua a pH 2 , de acuerdo a Aplin & Barrett (2000).
- D) 100 mg diluidos en 1L de agua a pH 5, de acuerdo a Aplin & Barrett (2000).

Se colocaron 20µL de cada solución concentrada en placas de ensayo con *M. luteus* como microorganismo indicador en capa y en sobrecapas de agar Assay 3 con fosas preparadas de acuerdo a la figura 2. Las placas se incubaron a 30°C por 22h. Posteriormente se midió el diámetro del halo de inhibición de cada solución. Se realizaron controles utilizando soluciones diluyentes ( HCl 0.2 N, HCL 0.2 N – Na Cl 0.75%, agua a pH 2 y agua a pH 5) sin nisaplin<sup>®</sup>. Las placas se incubaron a 30°C por 22 horas. Debido a la distancia que existe entre cada pozo en las cajas de Petri (figura 9) se establecieron  $16 \pm 1$  mm como diámetro deseado de halo de inhibición (incluyendo el pozo).

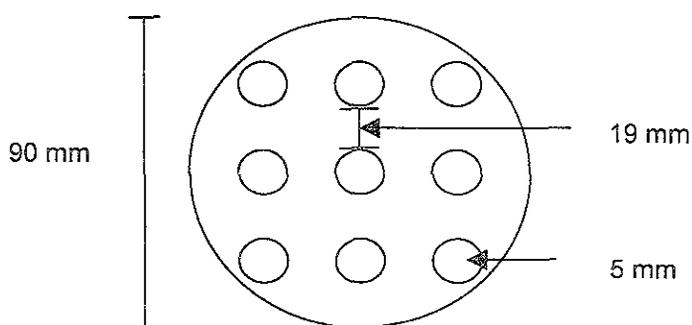


Figura 9. Distribución de fosas o pozos en la caja de Petri.

#### 4.8.2 Variabilidad del estándar de referencia

Para determinar la variabilidad del diámetro del halo de inhibición que produjo la solución elegida como estándar de referencia, dicha solución fue evaluada en placas de ensayo con agar Assay 1 y 2 (como lo establece el Método Base S) y en placas de ensayo con Agar BHI 1 y 2. Se realizaron 2 repeticiones por triplicado. Los diámetros obtenidos se promediaron y se calculó la desviación estándar para cada medio de cultivo.

### **4.8.3 Estabilidad del estándar de referencia almacenado a 4°C**

Una vez determinada la solución de nisina cuyo halo de inhibición presenta el valor más cercano a 16 mm  $\pm$ 1, se evaluó la estabilidad de la misma en refrigeración. La solución se almacenó en la oscuridad a 4°C y se cuantificó su actividad a los 0, 7 y 17 días por el método de fosas descrito en el método Base S (figura 2).

## **4.9 Cuantificación de la bacteriocina WB1**

### **4.9.1 Efecto de la composición y concentración de agar en la cuantificación de la bacteriocina WB1**

La preparación de placas de ensayo con sobrecapas de agar (fase PLM-5) implica un aumento considerable en el tiempo y esfuerzo de realización del Método Base S (fases , PL-1, PL-2, PLM-1, PLM-2, PLM-3, PLM-4). Para estudiar simultáneamente los efectos de concentración y composición del agar en la cuantificación de la bacteriocina WB1 se evaluó el uso de placas de ensayo con capas (sin sobrecapa). Se realizó un control utilizando placas de ensayo con sobrecapas de ambos medios (Assay y BHI).

Las placas de ensayo con capas de agar se prepararon utilizando 16 mL de agar 0.8%. Las placas de ensayo con sobrecapa de agar se prepararon utilizando 10 mL de agar 1.0% y adicionados con 8 mL de agar 0.8%.

La cuantificación de actividad de la bacteriocina WB1 se realizó empleado el Método Base S modificado a lo largo del presente trabajo (figura 10). Los ensayos se realizaron utilizando un estándar de referencia (solución de 100 mg de nisaplin®/L agua a pH 5). Cada experimento fue realizado por duplicado.

## V. RESULTADOS

### 5.1 Métodos de preservación para *M. luteus*

Las cuentas viables de *M. luteus* para determinar la pérdida de viabilidad con cada uno de los métodos de preservación estudiados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Pérdida de viabilidad de *M. luteus* de acuerdo al método de preservación utilizado (secado en disco de agar, congelación en chaquiras con glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$ , congelación en medio de cultivo con glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$ )

Método de Preservación	UFC/mL		Reducción log
	Inicial *	Final *	
Secado en disco de agar	$2.5 \times 10^{11}$ $1.2 \times 10^7$	$2.5 \times 10^7$ $2.5 \times 10^6$	4 0.68
Congelación en chaquiras con glicerol a $-70^{\circ}\text{C}$	$2.5 \times 10^7$ $2.2 \times 10^7$	$2.5 \times 10^7$ $6.3 \times 10^5$	0 1.55
Congelación en medio de cultivo con glicerol a $-70^{\circ}\text{C}$	$1.0 \times 10^7$ $3.2 \times 10^{12}$	$2.5 \times 10^7$ $2.0 \times 10^6$	-0.39 6.2

\*Valor superior calculado por vertido en placa y valor inferior por extensión superficial

### 5.2 Recuperación de *M. luteus* en medio líquido a partir del medio de preservación

#### 5.2.1 Efecto del medio de cultivo

La  $\text{DO}_{550}$  de *M. luteus* a partir del medio de preservación a las 24 y 48h fue de 0.297 y 0.613 en caldo BHI y de 0.269 y 0.452 en caldo Assay.

#### 5.2.2 Efecto de la agitación

El efecto de la agitación en el crecimiento de *M. luteus* en medio líquido a partir del medio de preservación se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Efecto de la agitación en la recuperación de *M. luteus* en medio líquido a partir del medio de preservación

Medio	Volumen de trabajo	DO <sub>(550 nm)</sub> *		
		T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	Δ
Assay	5 mL en vial de 10 mL	0.628	0.772	0.144
		0.608	0.796	0.188
BHI	5 mL en vial de 10 mL	0.591	0.437	-0.154
		0.609	0.747	0.138
	10 mL en matraz de 25 mL	0.639	0.722	0.083
		0.599	4.957	4.358

\*El valor superior corresponde al cultivo estático y el valor inferior al cultivo agitado a 150 rev min<sup>-1</sup>. Los resultados son el promedio de dos determinaciones, en donde cada determinación difirió menos del 11% del promedio.

DO = Densidad óptica del cultivo incubado a 30°C

T<sub>1</sub> = 0 horas de incubación.

T<sub>2</sub> = 11 horas de incubación.

### 5.2.3 Efecto del volumen de cultivo de trabajo

El desarrollo de *M. luteus* a partir de diferentes volúmenes de cultivos de trabajo "A" y "B" inoculados en caldo BHI se muestra en la tabla 4.

## 5.3 Resiembra de medio líquido a medio sólido para la recuperación de *M. luteus* a partir del cultivo de trabajo

### 5.3.1 Efecto de la concentración de agar

Las características morfológicas de las colonias de *M. luteus* sembradas en medio BHI con concentraciones de agar de 1% y 1.5% se describen en la tabla 5.

## 5.4 Viabilidad a través del tiempo de *M. luteus* recuperado en medio sólido

La viabilidad a través del tiempo de *M. luteus* recuperado en cajas y tubos con agar inclinado BHI 1.5% y almacenado a 4°C, se observa en la tabla 6.

Tabla 4. Efecto del volumen de inóculo en la recuperación de *M. luteus* en medio líquido.

Cultivo de trabajo	Volumen de inóculo (μL)	DO <sub>550</sub>		
		T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	Δ
A	500	1.130	5.340	4.210
	250	0.599	4.957	4.358
B	250	0.676	6.989	6.313
	100	0.286	5.205	4.916

Los resultados son el promedio de dos determinaciones, en donde cada determinación varió menos del 2% del promedio.

DO = Densidad óptica del cultivo incubado a 30°C a 150 rev min<sup>-1</sup>

T<sub>1</sub> = 0 horas de incubación.

T<sub>2</sub> = 11 horas de incubación

Tabla 5. Características morfológicas de colonias de *M. luteus* recuperado en agar BHI 1% y 1.5%

Concentración de Agar	Cultivo	Características del cultivo
1%	Tubo inclinado	Desarrollo escaso, no se distinguen tamaño y borde, de consistencia viscosa y color amarillo. Se observa sinéresis.
	Caja de Petri	Desarrollo abundante, colonias circulares, pequeñas, de borde entero y elevación convexa con textura viscosa de color amarillo.
1.5%	Tubo inclinado	Desarrollo abundante, con borde uniforme, de consistencia viscosa y color amarillo.
	Caja de Petri	Desarrollo abundante, colonias circulares, pequeñas de borde entero, elevación convexa con textura viscosa de color amarillo.

Tabla 6. Viabilidad a través del tiempo de *M. luteus* recuperado en agar BHI 1.5% y almacenado a 4°C.

Cultivo recuperado	Tiempo de almacenamiento de <i>M. luteus</i> (días)*											
	0			9			14			21		
	DO 550 nm	UFC/mL	CC	DO 550 nm	UFC/mL	CC	DO 550 nm	UFC/mL	CC	DO 550 nm	UFC/mL	CC
En cajas de Petri	0.195	3.2 x 10 <sup>9</sup>	xxxxx	0.231	6.8 X 10 <sup>7</sup>	xxxxx	0.210	5.8 x 10 <sup>7</sup>	xxx	0.224	4.8 x 10 <sup>6</sup>	xx
En tubos con agar inclinado	0.210	2.7 x 10 <sup>8</sup>	xxxx	0.234	2.3 x 10 <sup>7</sup>	xxxx	0.202	5.0 x 10 <sup>7</sup>	xxx	0.234	1.3 x 10 <sup>7</sup>	xxxxx

\* De un cultivo de *M. luteus* suspendido en Sol. Ringer ¼

CC = Calidad de cultivo en capa de agar, donde el crecimiento es: XXXXX, abundante; XXXX, bueno; XXX, mediano; XX, regular; X poco

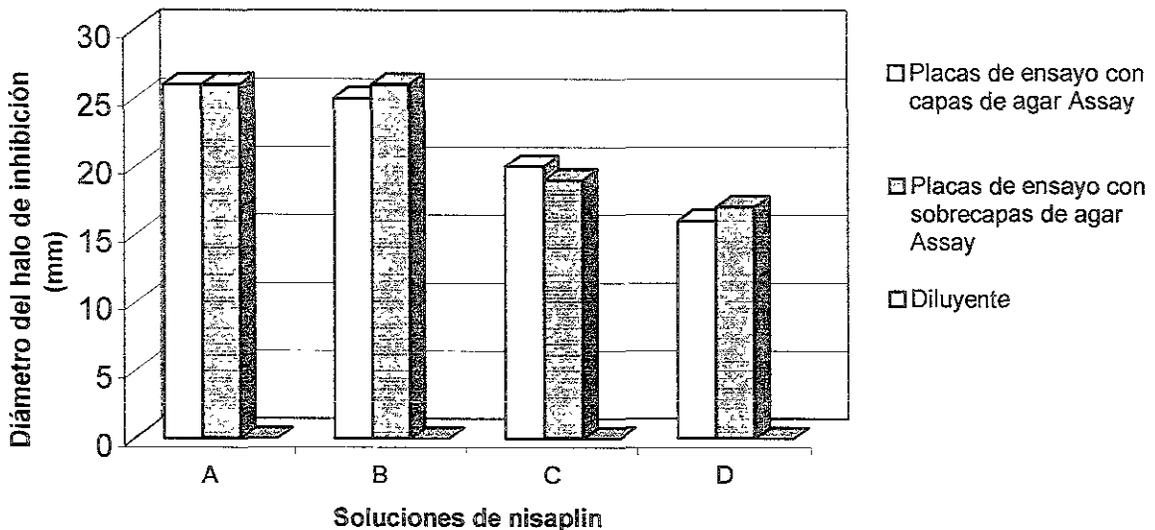
## 5.5 Preparación de inóculo de *M. luteus* a partir del cultivo recuperado del medio de preservación

Las cuentas viables del inóculo preparado a partir de diferentes cultivos recuperados (tubo con agar inclinado o caja de Petri) se presentan en la tabla 7. En la misma Tabla se presentan también los datos obtenidos para la viabilidad del inóculo a través del tiempo a 4°C.

## 5.6 Estándar de referencia

### 5.6.1 Selección del estándar de referencia

Los diámetros de inhibición observados en las placas de ensayo con capas y placas de ensayo con sobrecapas de agar Assay 3 para las 4 soluciones de nisaplin® utilizadas como estándares de referencia se describen en la figura 10.



- A) 100 mg de nisaplin® /100 mL HCl 0.02N
- B) 100 mg de nisaplin® /100 mL HCl 0.02 N – NaCl 0.75%
- C) 100 mg de nisaplin® /L agua pH 2
- D) 100 mg de nisaplin® /L agua pH 5

Figura 10. Diámetro de inhibición de nisina en el crecimiento de *M. luteus* en agar Assay.

Tabla 7. Cuentas viables y calidad de crecimiento del inóculo de *M. luteus* preparado a partir de cultivos recuperados en tubos con agar inclinado y cajas de Petri (agar BHI 1.5%) y su viabilidad a través del tiempo de almacenamiento a 4°C.

Cultivo recuperado				Tiempo de almacenamiento del inóculo de <i>M. luteus</i> a 4°C (días)					
	**Tiempo (días)	UFC/mL	CC	2		4		9	
				UFC/mL	CC	UFC/mL	CC	UFC/mL	CC
En caja de petri	0	3.2 x 10 <sup>9</sup>	xxxxx	6.7 x 10 <sup>7</sup>	xxxxx	5.1 x 10 <sup>7</sup>	xxxx	2.7 x 10 <sup>7</sup>	xxx
	14	5.8 x 10 <sup>7</sup>	xxx	4.2 x 10 <sup>7</sup>	xxxx	3.4 x 10 <sup>7</sup>	xxx	ND	ND
En tubo con agar inclinado	0	2.7 x 10 <sup>8</sup>	xxxx	9.5 x 10 <sup>7</sup>	xxxxx	4.4 x 10 <sup>7</sup>	xxx	3.6 x 10 <sup>7</sup>	xxx
	14	5.0 x 10 <sup>7</sup>	xxx	2.1 x 10 <sup>7</sup>	xxxx	2.0 x 10 <sup>7</sup>	xxxx	ND	ND

\*Suspensión de *M. luteus* ajustada a DO<sub>550</sub>= 0.2.

\*\* El tiempo que el cultivo recuperado estuvo almacenado a 4°C.

CC = Calidad de cultivo en capa de agar, donde el crecimiento es: XXXXX, abundante; XXXX, bueno; XXX, mediano; XX, regular; X poco.

ND = No determinado

### 5.6.2 Variabilidad del estándar de referencia

Los diámetros de inhibición producidos por el estándar de referencia tuvieron un promedio de 15.75 , 18.83 y una desviación de 0.92, 0.98 en agar Assay y BHI respectivamente.

### 5.6.3 Estabilidad del estándar de referencia almacenado a 4°C

La actividad inicial del estándar de referencia fue de 1600 UA / mL, después de 7 días dicha actividad disminuyó a 800 UA /mL y al cabo de 17 días a 400 UA /mL.

### 5.7. Efecto de la composición y concentración de agar en la cuantificación de la bacteriocina WB1

Los resultados referentes al efecto de la composición (tipo de medio) y la concentración (capa o sobrecapa) de agar en la cuantificación de la bacteriocina WB1 se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Cuantificación de la bacteriocina WB1 en placas de ensayo con capas y placas de ensayo con sobrecapas de agar BHI y de agar Assay.

Placa de ensayo	Actividad* (UA/mL)	Estándar Interno* (mm)
Capa	200	18
	200	18
Sobrecapa	400	21
	200	19

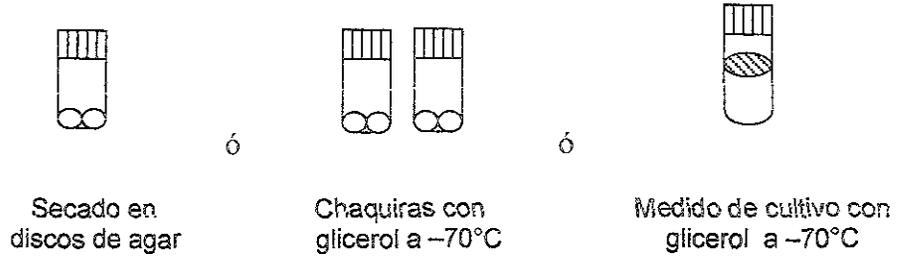
\* El valor superior corresponde a placa de ensayo con agar BHI y el valor inferior a placa de ensayo con agar Assay.

Las placas de ensayo con capa de agar se componen de una sola capa de agar 0.8% (16 mL).

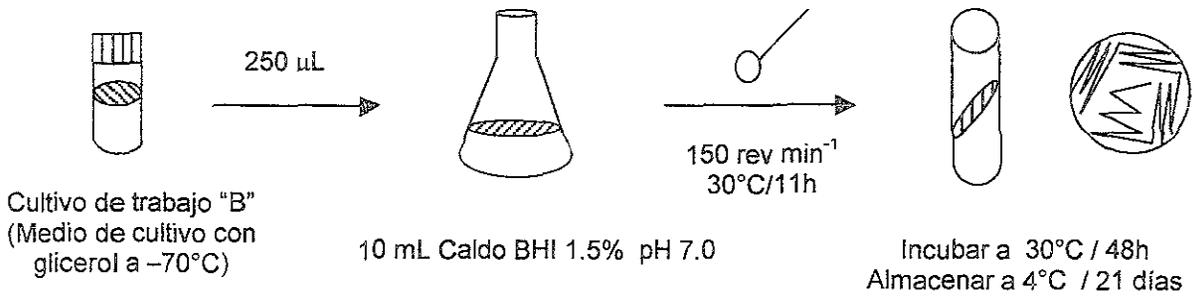
Las placas de ensayo con sobrecapa de agar se componen de: una capa de agar 1.0% (10 mL) y una sobrecapa de agar 0.8% (8 mL).

El diámetro del halo de inhibición del estándar interno incluye el diámetro de la fosa (5mm).

**PRESERVACIÓN DE *M. luteus***



**RECUPERACIÓN DE *M. luteus***



**SUSPENSIÓN DE *M. luteus* RECUPERADO PARA PREPARACIÓN DE INÓCULO**

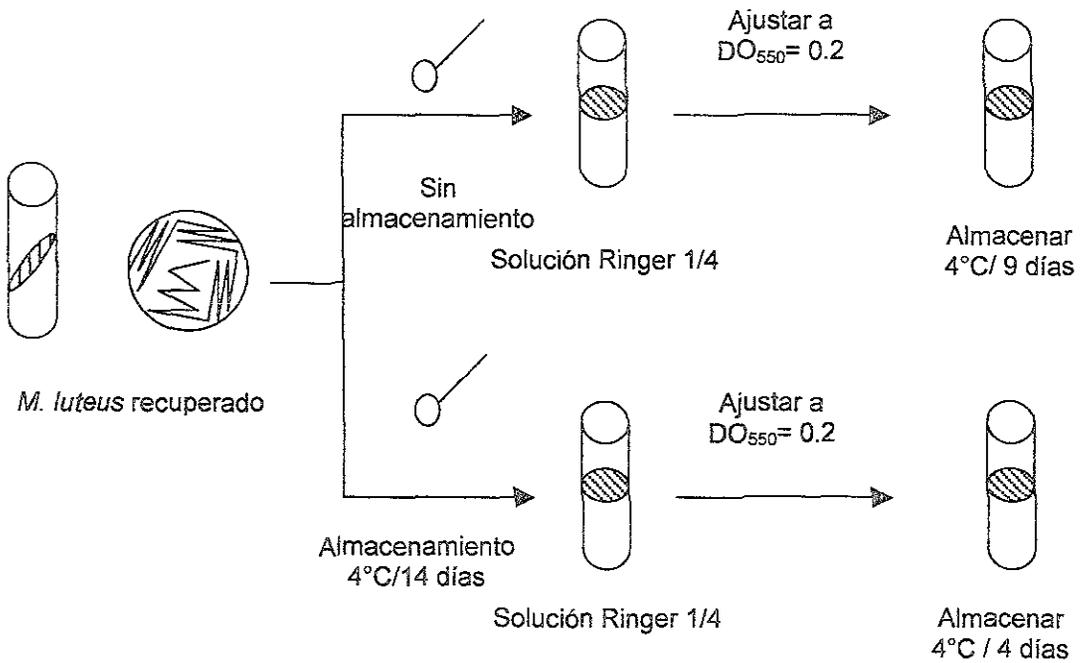
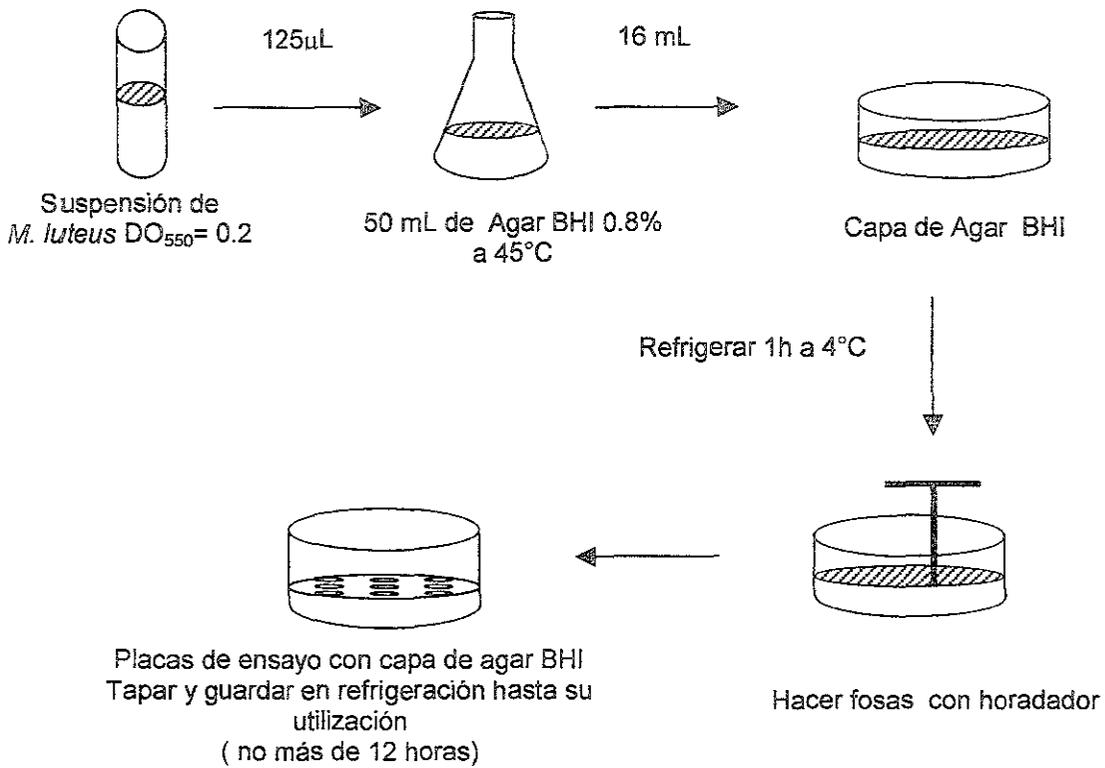


Figura 11. Método Base S modificado para cuantificar a la bacteriocina WB1.

## PREPARACIÓN DE PLACAS DE ENSAYO



## PREPARACIÓN DE DILUCIONES SERIADAS

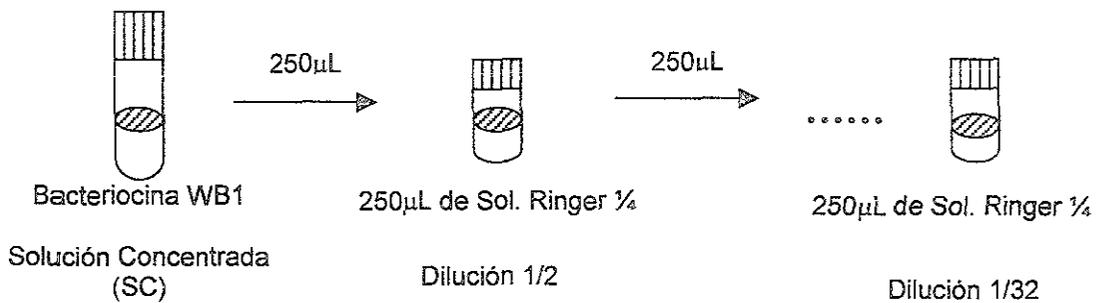


Figura 11 . Método Base S Modificado para cuantificar a la bacteriocina WB1 (continuación).

## CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD DE LA BACTERIOCINA WB1

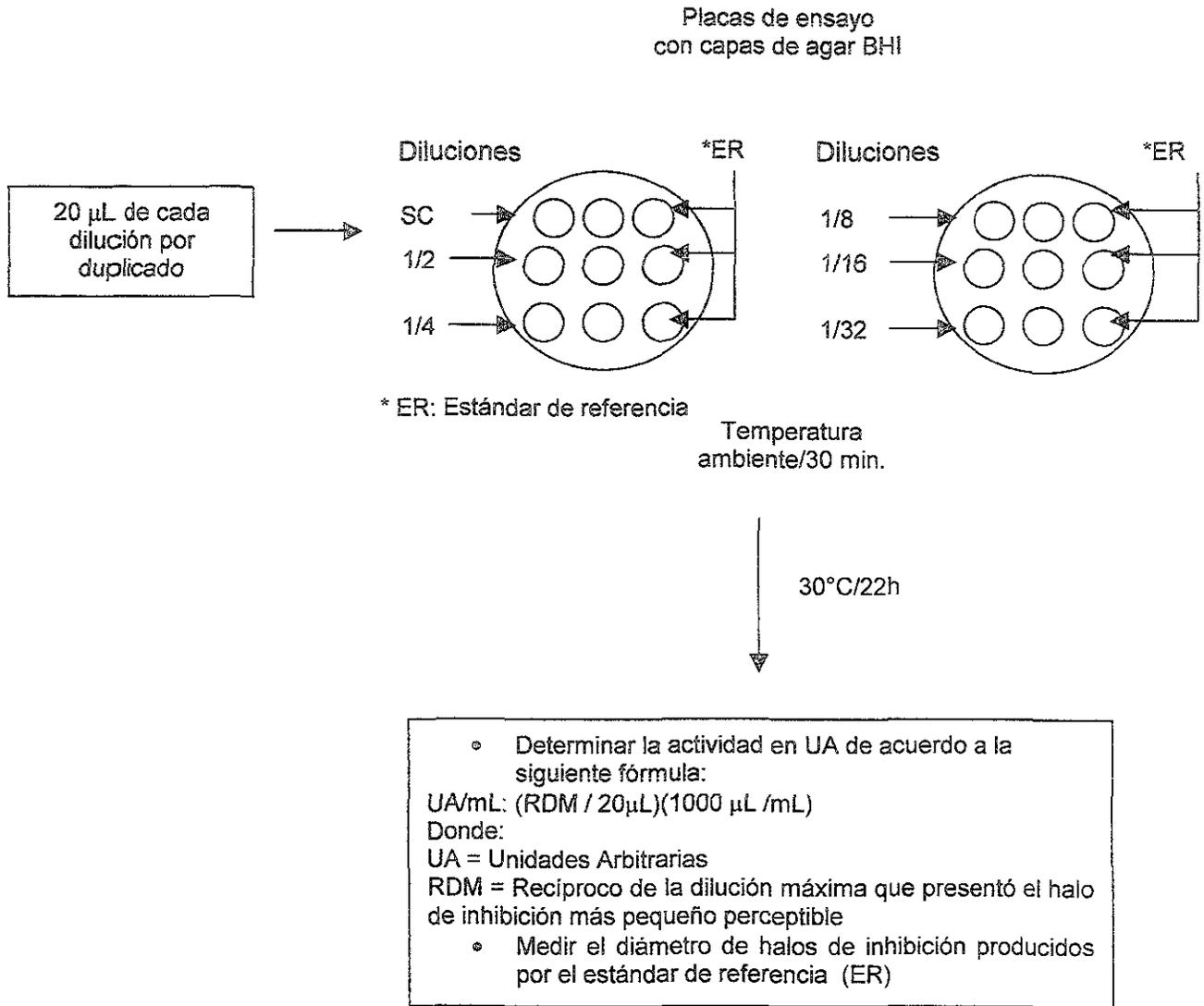


Figura 11 . Método Base S Modificado para cuantificar a la bacteriocina WB1 (continuación).

## VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 6.1 Comparación de métodos de preservación para *M. luteus*

La viabilidad de *M. luteus* después de utilizar los 3 métodos de preservación estudiados (secado en discos de agar, congelación en chaquiras con glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$ , congelación en medio con glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$ ), se cuantificó utilizando el método de vertido en placa y el método por extensión superficial, observándose que los métodos de plaqueo presentaron diferencias aparentes (tabla 2). Esto dificultó la comparación entre los métodos de preservación. Sin embargo, tomando en consideración las cuentas finales puede observarse que no hay diferencia en el número de microorganismos iniciales que proporcionará cada cultivo.

### 6.2 Recuperación de *M. luteus* en medio líquido a partir del medio de preservación

A partir del medio de preservación *M. luteus* cultivado en viales se desarrolló a las 24 horas de incubación de manera similar tanto en caldo BHI como en caldo Assay ( $\text{DO}_{550} = 0.297$  y  $0.269$  respectivamente). Sin embargo después de 48 horas el microorganismo se desarrolló mejor en caldo BHI ( $\text{DO}_{550} = 0.613$ ) que en caldo Assay ( $\text{DO}_{550} = 0.452$ ).

Así mismo se observó que la agitación no tiene efecto en el crecimiento del microorganismo cultivado en viales, pero sí lo tiene cuando *M. luteus* es cultivado en matraz (tabla 3). Lo anterior se atribuye al mayor espacio de cabeza en el matraz, que

proporciona a su vez mayor exposición del medio al oxígeno, ya que *M. luteus* se ha reportado como un microorganismo aerobio (Sneath y col. 1986). Es interesante mencionar que el Estándar Británico BS 4020:1974 no establece el crecimiento de *M. luteus* en agitación aunque la diferencia en densidad óptica que puede obtenerse es de cuatro unidades (  $DO_{550} = 4.358$  y  $0.144$  con y sin agitación respectivamente) además de una considerable reducción en el tiempo de incubación ( 11 h Vs. 30 h con y sin agitación respectivamente).

En cuanto al efecto del volumen de cultivo de trabajo en la fase de recuperación de *M. luteus* en medio líquido, se observó (tabla 4) que al aumentar el volumen de inóculo de los cultivos de trabajo A y B, aumentó también el desarrollo del microorganismo. Cabe señalar que éste aumento no fue en forma proporcional al incremento del volumen de inóculo probado.

En éste experimento se observó también que el cultivo de trabajo B (en BHI) produjo un mejor desarrollo de *M. luteus* que el cultivo de trabajo A (en caldo Assay).

Por todo lo anterior para la recuperación de *M. luteus* se sugiere el uso de caldo BHI inoculado con  $250 \mu\text{L}$  de cultivo de trabajo "B" e incubado a  $150 \text{ rev. min}^{-1}$ . El uso de medio BHI en lugar de medio assay presenta la ventaja adicional de que en su condición de medio de cultivo comercial se minimizan variaciones de composición y se facilita la preparación del medio, en comparación con el caldo Assay, que es preparado por ingredientes.

### **6.3 Resiembra de medio líquido a medio sólido para la recuperación de *M. luteus* a partir del cultivo de trabajo**

#### **6.3.1 Efecto de la concentración de agar**

En la resiembra de medio líquido a medio sólido para la recuperación de *M. luteus* se observó que al utilizar la concentración de agar establecida por el Método Base S (1%), las características del cultivo en caja de Petri fueron mejores que las obtenidas en tubo inclinado (tabla 5). Por el contrario el cultivo de *M. luteus* en agar BHI 1,5% se desarrolló con buenas características tanto en tubo inclinado como en caja de Petri. Este resultado indica que la concentración de agar de 1% no es suficientemente seca en el tubo inclinado de agar, ocasionando que el desarrollo de *M. luteus* sea deficiente.

Por lo anterior, se recomienda recuperar a *M. luteus* en agar BHI al 1.5% ya sea en tubo inclinado o en caja de Petri.

### **6.4 Viabilidad a través del tiempo de *M. luteus* recuperado en medio sólido**

En el estudio de la viabilidad de cultivos de *M. luteus* en cajas de Petri y tubos con agar inclinado BHI 1.5% (tabla 6) se observó que el número de células viables una vez iniciada la refrigeración es igual tanto en caja como en tubo ( $10^7$ ) hasta el día 14, disminuyendo en caja para el día 21 a  $10^6$ . Se observó también que aunque los valores iniciales de DO se mantienen constantes, para el día 21 ha habido una

reducción de 3 ciclos log. en *M. luteus* almacenado en placa y de 1 ciclo log en *M. luteus* almacenado en tubo. Sin embargo, en la literatura se reporta que para la cuantificación de bacteriocinas por difusión en agar, el inóculo del microorganismo indicador debe contener entre  $10^6$  UFC/mL (Montville y col. 1999; Oscáriz & Pisabarro, 2000) y  $10^7$  UFC/mL (Mathieu y col. 1993; Toit y col. 2000).

De acuerdo a lo anterior, el cultivo de *M. luteus* almacenado tanto en caja de Petri como en tubo con agar inclinado BHI 1.5% durante el periodo recomendado por el Método Base S (14 días) puede ser utilizado para la cuantificación de la bacteriocina WB1 y ser extendido hasta 21 días.

#### **6.5 Preparación de inóculo de *M. luteus* a partir del cultivo recuperado del medio de preservación**

En los resultados (tabla 7) se observó que no hay diferencia ni en las cuentas ni en la calidad del cultivo cuando el inóculo de *M. luteus* se prepara a partir de cultivos recuperados de cajas de Petri o de tubos con agar inclinado BHI 1.5%.

Así mismo se observó que, una vez suspendido y almacenado a 4°C, *M. luteus* puede ser usado como inóculo para la preparación de las placas de ensayo 9 días después de iniciado el almacenamiento cuando la suspensión proviene de un cultivo recuperado fresco (sin almacenamiento) y 4 días cuando la suspensión es preparada a partir de un cultivo recuperado y almacenado (14 días).

## **6.6 Estándar de referencia**

### **6.6.1 Selección del estándar de referencia**

En los resultados de la evaluación de las soluciones de nisaplin® (figura 10) se observó que las soluciones A , B y C produjeron diámetros de halo de inhibición mayores al requerido para su uso como estándares de referencia(26 mm, 26 mm y 19 mm Vs. Valor deseado de  $16 \pm 1$  mm). Mientras que con la solución D (100 mg de nisaplin / L agua pH 5) se obtuvo el diámetro de halo más cercano al deseado( $16 \pm 1$  mm).Las diferencias observadas pueden explicarse con lo reportado en la literatura que indica el aumento de solubilidad y estabilidad de nisina al descender el pH (Liu & Hansen, 1990).

### **6.6.2 Variabilidad del estándar de referencia**

No se encontró variabilidad entre los diámetro producidos por el estándar de referencia en los dos medios estudiados. (BHI y Assay). Por otra parte debido a la reproducibilidad del diámetro de los halos producidos puede establecerse que su uso como estándar de referencia será un parámetro adecuado para determinar variaciones en el método Base S.

### **6.6.3 Estabilidad del estándar de referencia almacenado a 4°C**

Al cuantificar la actividad del estándar de referencia almacenado, se observó una disminución del 50% al cabo de 7 días y de 75% al cabo de 17 días en comparación a la actividad inicial (de 1600 UA/mL a 800 UA/mL y 400 UA/mL). De lo anterior se sugiere que el estándar de referencia sea preparado en el momento de su uso.

### **6.7 Efecto de la composición y concentración de agar en la cuantificación de la Bacteriocina WB1**

En los resultados obtenidos (tabla 8) se observó que ni la composición ni la concentración del agar (BHI ó Assay) influyeron en la cuantificación de actividad de la bacteriocina WB1 dado que la actividad en todos los casos fue de 200 UA/mL, excepto en placas de ensayo con sobrecapas de agar BHI donde la actividad fue de 400 UA/mL pero el estándar de referencia produjo un diámetro de halo de inhibición de 21 mm, mayor que el establecido como parámetro de evaluación por lo que no se considera válido el aumento observado.

De acuerdo a lo anterior el método Base S puede realizarse usando agar BHI y eliminado el uso de sobrecapas, además que se establece que el estándar de referencia es un parámetro de utilidad.

## **6.8 Aplicación del Método Base S Modificado**

Con base en los experimentos realizados en el presente trabajo el Método Base S Modificado se describe en la figura 11. Este método a partir de su obtención ha sido utilizado por Santiago y col. para la cuantificación de la bacteriocina WB1, sin que hasta el momento se hayan presentado problemas como los que existían al utilizar el Método Base S.

## VII. CONCLUSIONES

- Se obtuvo el método de cuantificación denominado Método Base S Modificado que supera las deficiencias que presenta el método Base S.

En el Método Base S modificado:

- Los métodos estudiados para la preservación de *M. luteus* (secado en discos de agar, congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  en chaquiras con glicerol y congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  en medio de cultivo con glicerol) no presentan diferencia en el número de microorganismos iniciales que proporcionará cada cultivo.
- La recuperación de *M. luteus* es más recomendable en matraz inoculado con 250  $\mu\text{L}$  de cultivo de trabajo e incubado con agitación que en vial inoculado con una chaquiras e incubado sin agitación.
- Para la recuperación de *M. luteus* del cultivo de preservación se recomienda resembrar de medio líquido a medio sólido en agar al 1.5% y no al 1%.
- *M. luteus* recuperado y almacenado a  $4^{\circ}\text{C}$  puede ser usado para preparación del inóculo por 21 días si se recupera en tubo y 14 días si se recupera en caja
- No hay diferencia entre preparar al inóculo a partir de *M. luteus* recuperado en tubos o recuperado en cajas.
- Una vez preparado el inóculo de *M. luteus* en suspensión, es viable de 4 a 9 días.
- Se puede establecer como estándar de referencia a la solución de 100 mg de nisaplin<sup>®</sup> / L de agua a pH 5.
- Se recomienda eliminar el uso de sobrecapas y el uso de agar Assay del Método Base S.

**APÉNDICE 1**  
**CUANTIFICACIÓN DE BACTERIOCINAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

GÉNERO	MICROORGANISMO PRODUCTOR	BACTERIOCINA	MICROORGANISMO INDICADOR	METODO DE CUANTIFICACIÓN	REPORTADA POR
<b>Lactococcus</b>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DPC 3147	Lacticina 3147	<i>L. lactis</i> HP	DA - P	Ryan y col. (1998, 1999 b);
	IPLA972	Lactococcina 972	<i>L. lactis</i> AM2 <i>Strep. dysgalactiae</i> <i>L. lactis</i> MG 1614	DA - F DA - P	Mc. Auliffe y col. (1998, 1999 y 2000); Scanell y col. (2000); Morgan y col. (2000) Tomey y col. (2000) Ryan y col. (1999 b) Mc. Auliffe y col. (2000); Ryan y col. (1999 a). Martinez y col. (2000).
	IL1403 LMG2081	Lactococcina B Lactococcina G	<i>L. lactis</i> SK 112 <i>L. lactis</i> IL 1403	DA - P DA - P	Vénema y col. (1993). Moll y col. (1998)., Nissen – Meyer y col. (1992).
	NCDO 497 A164	Nisina A Nisina	<i>L. sake</i> DSM 20017, 20497 <i>Lactobacillus sake</i> ATCC 15521	DA - P Turbidimétrico	Bennik y col. (1997). Choi y col.(2000)
	NCK400, LJH80 ATCC 11454	Nisina Nisina	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactobacillus leichmannii</i> ATCC 4797	DA - F DA - F	Harris y col. (1992). Burianek & Yousef(2000).
	AFISC 2011	Nisina	<i>L. curvatus</i> L789 <i>Brochothrix thermosphacta</i> <i>L. monocytógenes</i> Scott A	DA - F DA - P DA - F	Wan y col. (1995). Coventry y col. (1996). Cai y col. (1997)
	HPB 1688 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> UL719 S50	Nisina Z Bacteriocina S50	<i>Pediococcus acidilactici</i> <i>L. lactis</i> subs. <i>cremoris</i> NS1	Turbidimétrico DA - F	Bouksaim y col. (1999). Kojic y col. (1991).
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> R LMG 2130	Lactococcina R Lactococcina A	<i>L. plantarum</i> <i>L. lactis</i> . subsp. <i>cremoris</i>	DA - P Turbidimétrico	Yildirim & Jonson (1998). Holo y col. (1991).

DA – P: Difusión en agar por el método de puntos. DA-F Difusión en agar por el método de fosas.

**CUANTIFICACIÓN DE BACTERIOCINAS ÁCIDO LÁCTICAS (CONTINUACIÓN)**

GÉNERO	MICROORGANISMO PRODUCTOR	BACTERIOCINA	MICROORGANISMO INDICADOR	METODO DE CUANTIFICACIÓN	REPORTADA POR
<b>Lactobacillus</b>	<i>Lb. acidophilus</i> 88	Lactacina F	<i>L. leichmanii</i> 4797, 1750	DA - P	Muriana & Klaenhammer (1987)
	OSU 133 TK 9201 IBB 801 30 SC	Lacidina A Acidocina A Acidofilina 801 Bacteriocina de <i>Lb. acidophilus</i> 30SC	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 <i>Lb. acidophilus</i> JMC 2010 <i>Lb. helveticus</i> <i>Leuconostoc</i> sp k2	Turbidimétrico DA - F DA - P DA - P	Liao y col. (1993). Kanatani y col. (1995) Zamfir y col. (1999) Oh y col. (2000)
	OSU 133 <i>Lb. amylovorus</i> DCE 471	Lacidina A Amylovorina L471	<i>L. leichmanii</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	DA - P DA - P DA - P	Burianek & Yousef (2000) Callewaert y col. (1999) De Vuyst y col. (1996). Callewaert & De Vuyst (2000).
	LMGP-13139 <i>Lb. bavaricus</i> MI401	Lactobina A Bavaricina A	<i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. Sake</i> LMG 9468	DA - F Turbidimétrico	Contreras y col. (1997). Larsen y col. (1993).
	<i>Lb. brevis</i> V83286 <i>Lb carnosum</i> Lm 1	Brevicina 286 Leuconocina LcM1	<i>L. monocytogenes</i> 4A <i>Enterococcus faecalis</i> MB1	DA - P DA - P	Wan y col. (1995). Yang y col. (1992).
	<i>Lb. casei</i> CRL 705	Lactocina 705	<i>Lb. plantarum</i> CRL 691	DA - F	Cuozzo & col.(2000).
	<i>Lb. curvatus</i> LTH 1174	Curvacina A	<i>Lb. curvatus</i> LTH 1432 <i>Lb. curvatus</i> DSM20019 <i>Lb. sake</i> NCDO 2714	Turbidimétrico Turbidimétrico Turbidimétrico	Gänzle y col.( 1999 a). Gänzle y col. (1999 b) Eijsink y col. (1998).
	SB 13	Curvaticina 13 No referido	<i>L. monocytogenes</i> <i>Listeria innocua</i> F	DA - F DA - F	Bouttefroy y col. (2000) Miteva y col. (1998).
	<i>Lb. johnsonii</i> VPI 11088	Lactacina F	<i>Lb. delbrueckii</i> ATCC 4797 <i>Lb. helveticus</i> 87	DA - P	Allison y col. (1994).FQ

DA - P: Difusión en agar por el método de puntos. DA-F Difusión en agar por el método de fosas

**CUANTIFICACIÓN DE BACTERIOCINAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (CONTINUACIÓN)**

GÉNERO	MICROORGANISMO PRODUCTOR	BACTERIOCINA	MICROORGANISMO INDICADOR	METODO DE CUANTIFICACIÓN	REPORTADA POR
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 1106,1107 JCM 1248	Lacticina A Lacticina B	<i>Lb. bulgaricus</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> JCM 1002	DA - F DA - F	Taoba y col. (1991 b). Taoba y col. (1991 b).
	<i>Lb. gasseri</i> KT7 LA39	Gassericina KT7 Gassericina A	<i>Lb. plantarum</i> M16 <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	DA - F DA - F	Zhu y col. (2000). Kawai y col. (1998)
	<i>Lb. gelidium</i> UAL 187	Leucocina A-UAL 187	<i>Carnobacterium divergens</i>	No especificado	Hasting y col (1991).
	<i>Lb. helveticus</i> 481	Helveticina J	<i>Lb. vulgaricus</i> 1489	DA - P	Joerger & Klaenhammer (1986).
	<i>Lb. plantarum</i> LPCOIO	Plancaricina A	<i>Lb. plantarum</i> 965	Turbidimétrico	Nissen - Meyer y col. (1993), Hauge y col. (1998).
	LL441 BFE 905 C11	Plantaricina C Plantaricina D Plantaricina EF,JK	<i>Lb. sake</i> <i>Lb. sake</i> <i>Lb. plantarum</i> 965	DA - F DA - P Turbidimétrico Turbidimétrico	Bárcena y col. (1998). Franz y col. (1998). Andersen y col. (1998)., Hauge y col.(1999).
	LPO10	Plantaricina S  Plantaricina T	<i>Lb. plantarum</i> 128/2  <i>Lb. plantarum</i> J - 81	DA - F  Turbidimétrico DA - F	Jiménez-Díaz y col.(1993),  Leal y col. (1998). Jiménez-Díaz y col.(1993)
	TMW 1.25 423 J-51	Plantaricina 1.25 Plantaricina 423 Extracto de <i>Lb. plantarum</i> J-51	<i>Lb. plantarum</i> TMW 1.191 <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Lb. plantarum</i> J-81	Turbidimétrico DA - P DA - D	Klostermaier y col. (1999). Van Reenen y col. (1998). Navarro y col. (2000).
	KW30 ST 31 UG1	Plantaricina KW30 Plantaricina ST31 Plantaricina UG1	<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014 <i>Lb. plantarum</i> LAB73 <i>L. lactis</i> MG 164	DA - F DA - F DA - F	Kelly y col.(1996) Todorov y col. (1999). Enan y col. (1996).

DA- P: Difusión en agar por el método de puntos. DA-F Difusión en agar por el método de fosas  
DA-D: Difusión en agar por el método de disco de papel

**CUANTIFICACIÓN DE BACTERIOCINAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (CONTINUACIÓN)**

GÉNERO	MICROORGANISMO PRODUCTOR	BACTERIOCINA	MICROORGANISMO INDICADOR	METODO DE CUANTIFICACIÓN	REPORTADA POR
<b>Pediococcus</b>	<i>P. acidilactici</i> H	Pediocina AcH/PA-1	<i>Lb. plantarum</i> NCDO 955  <i>L.innocua</i> LIN 11	DA - P DA - P DA - P DA - P	Bhunia y col. (1991)., Biswas y col. (1991)., Yang y col. (1992). Ennahar & Deschamps (2000).
	PAC1.0	Pediocina AcH/PA-1	<i>L. monocytogenes</i> ScottA <i>P. pentosaceus</i> FBB63	DA - P DA - F	Chen y col. (1997). Pucci y col. (1988).
	1521 LMG2351	Pediocina AcH/PA-1 Pediocina PA-1 Pediocina PA-1 Pediocina PA-1	<i>Listeria ivanovi</i> BUG 496 <i>Lb. sake</i> NCDO 2714., <i>E. faecalis</i> NCDO 58., <i>P. acidilactici</i> NCDO 1859	DA - F DA - F Turbidimétrico	Guyonnet y col. (2000). Johnsen y col. (2000).
	M PO2		<i>Lb. plantarum</i> NCDO 955 <i>L. monocytogenes</i> 4A <i>L. monocytogenes</i> ScottA	DA - F DA - P No especificado	Elegado y col. (1997). Coventry y col. (1996). Liao y col. (1993).
	<i>P. parvulus</i> AT034 AT077	Pediocina AcM Pediocina PO2	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. botulinum</i>	Turbidimétrico	Bennik y col. (1997).
	<i>P. pentosaceus</i> FBB61, L7230		<i>Lb. plantarum</i> W50	DA - P	Daeschey & Klaenhammer. (1985).
	N5p	Pediocina PA-1 Pediocina PA-1	<i>P. pentosaceus</i> E5p	DA - F	Manca de Nadra y col. (1998).
		Pediocina A Pediocina N5p			
<b>Streptococcus</b>	<i>S. milleri</i> NMSCC 061	Millericina B	<i>M. luteus</i> ATCC 468998	DA - F	Beukes y col. (2000).
	<i>S. mutans</i> Ny266 UA787	Mutacina B-Ny266 MutacinII MutacinIII Mutacina	<i>M. luteus</i> ATCC 272 <i>S. sobrinus</i> OMZ176 <i>S. sanguis</i> Ny101 <i>S. sanguis.</i> , <i>S. mutans.</i>	Turbidimétrico No especificado Turbidimétrico DA - P	Mota-Meira y col. (2000). Chen y col. (1998). Qi y col. (1999). Nóvak y col. (1994).
	T8				

DA- P: Difusión en agar por el método de puntos. DA-F Difusión en agar por el método de fosas

**CUANTIFICACIÓN DE BACTERIOCINAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (CONTINUACIÓN)**

GÉNERO	MICROORGANISMO PRODUCTOR	BACTERIOCINA	MICROORGANISMO INDICADOR	METODO DE CUANTIFICACIÓN	REPORTADA POR
<i>Streptococcus</i>	<i>S. mutans</i> N	I7	<i>S. mutans</i> I7	DA - P	Balakrishnan y col. (2000).
	<i>S. thermophilus</i> ACA-DC 0040 81	Termofilina T Termofilina 81	<i>L. cremoris</i> CNRS 117 <i>Listeria innocua</i> F	DA - F DA - F	Aktypis y col. (1998). Ivanova y col. (1998).
<i>Lecucorinostoc</i>	<i>Leuc. carnosum</i> LA54A	Carnocina 54	<i>Leuc. mesenteroides</i> TA10C	DA - F	Becker y col. (1994).
	Ta11a	Leucocina B- Ta11a	<i>Leuc. mesenteroides</i> TA10c	No especificado	Felix y col. (1994).
	<i>Leuc. gelidium</i> UAL 187	Leucocina A-UAL 187. Leucocina A	<i>C. divergens</i> LV13  <i>C. piscicola</i> LV17C	No especificado  DA - P	Hasting y col. (1991).  Van Belkum y col. (1995).
	<i>Leuc. mesenteroides</i> UL5 FR 52 Y105	Mesentoricina 5 Mesentoricina 52 Mesentericina Y105	<i>Listeria ivanovii</i> 28 <i>Leuc. paramesenteroides</i> <i>L. monocytogenes</i> E 20., <i>L. ivanovii</i>	Turbidimétrico DA - F DA - F DA - F	Daba y col. (1991). Mathieu y col. (1993). Guyoneet y col. (2000)., Fleury y col. (1996).
	MF215B	Leucocina H $\alpha$ ., Leucocina H $\beta$	<i>L. ivanovii</i> Li4., <i>Lb. sake</i>	Turbidimétrico	Blom y col. (1999).
	F10	Leucocina F10	<i>L. innocua</i>	DA - F	Parente y col. (1996).

DA- P: Difusión en agar por el método de puntos. DA-F Difusión en agar por el método de fosas

**CUANTIFICACIÓN DE BACTERIOCINAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (CONTINUACIÓN)**

GÉNERO	MICROORGANISMO PRODUCTOR	BACTERIOCINA	MICROORGANISMO INDICADOR	METODO DE CUANTIFICACIÓN	REPORTADA POR
<i>Carnobacterium</i>	<i>C. divergens</i> V41	Divercina V41	<i>Listeria innocua</i> F	DA - P	Bhugaloo -Vial y col. (1999)
	LV13 AST <i>C. piscicola</i> LV 17A	Divergicina A Divercina	<i>Listeria ivanovii</i> BUG 496 <i>C. piscicola</i> NCDO 2762 <i>C. piscicola</i> LV17C <i>C. piscicola</i> NCDO 2762	DA - F DA - P DA - P Turbidimétrico	Guyonnet y col. (2000). Métivier y col. (1998). Worobo y col. (1995). Sip y col. (1998).
	JG 126	Carnobacteriocina A Piscicolina	<i>C. piscicola</i> LV17C., <i>Lb. sakei</i> DSM 20017 <i>Listeria monocytognes</i> 4A	DA - P DA - P	Franz y col. (2000). Coventry y col (1996).
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> 336 BFE 1071	Enterocina A Enterocina 1071A ., Enterocina 1071B	<i>Listeria ivanovii</i> <i>E. faecalis</i> LMG 13566	DA - F DA - P	Guyonnet y col (2000). Balla y col. (2000).
	22	Enterococcina EF52	<i>Listeria innocua</i> LIN 11	DA - P	Ennahar & Deschamps (2000).
	<i>E. faecium</i> DPC1146	Enterocina A	<i>Listeria innocua</i> DPC 1170	DA - P	O'Keeffe y col. (1999).
	EFM01	Enterocina A	<i>Listeria innocua</i> LIN 11	DA - P	Ennahar & Deschamps (2000).
	CTC492	Enterocina A	<i>P. pentosaceus</i> FBB63 <i>P. pentosaceus</i> FBB63 <i>Listeria innocua</i> BL86126 <i>L. sake</i> NCDO 2714	DA - P Turbidimétrico Turbidimétrico Turbidimétrico Turbidimétrico	Aymerich y col. (1996)., Nilsen y col. (1998). Aymerich y col. (2000). Eijsink y col. (1998)., Fimland y col (1998)., Aymerich y col. (1996)., Nilsen y col. (1998).
	BFE 900 P13	Enterocina B Enterocina P	<i>Lb. sake</i> FVM 148  <i>Lb. sake</i> DSM 20017 <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	DA - P  Turbidimétrico DA - P Turbidimétrico	Franz y col. (1999). Cintas y col. (1997)
	NIAI 157	ON - 157	<i>E. faecium</i> IFO13712	DA - D	Ohmomo y col. (2000).

DA- P: Difusión en agar por el método de puntos. DA-F Difusión en agar por el método de fosas

DA-D: Difusión en agar por el método de disco de papel

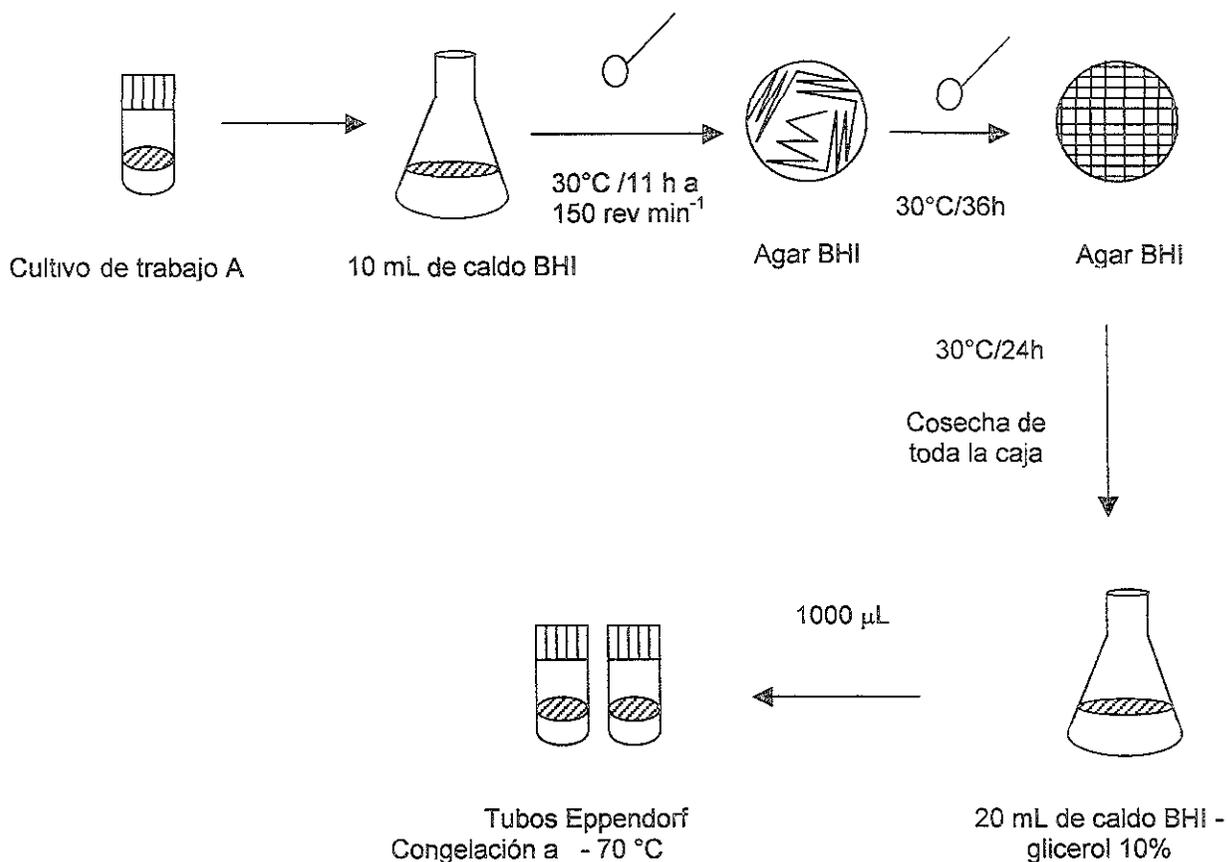
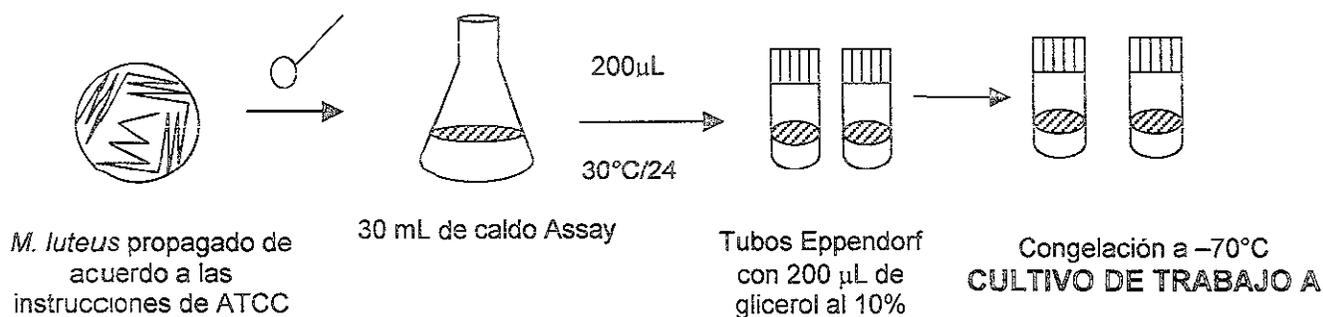
## CUANTIFICACIÓN DE BACTERIOCINAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (CONTINUACIÓN)

GÉNERO	MICROORGANISMO PRODUCTOR	BACTERIOCINA	MICROORGANISMO INDICADOR	METODO DE CUANTIFICACIÓN	REPORTADA POR
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i> CCM 4231	Enterocina CCM 4231	<i>L. monocytogenes</i>	DA - P	Lauková & Czikková. (1999).
	WHE 81 L50	Enterocina 81 Enterocina L50A., Enterocina L50 B	<i>L. monocytogenes</i> 4d <i>P. acidilactici</i> 347	<b>DA - F</b> Turbidimétrico	Ennahar y col. (1998). Cintas y col. (1998).
	671a	Enterocina P., Enterocina Q. Enterocina I	<i>E. faecium</i> P13 <i>E. faecium</i> T136 <i>E. faecium</i> 20	Turbidimétrico	Cintas y col. (2000).
	<i>E. gallinarum</i> 012	Enterocina 012	<i>Lb. sake</i> LMG 13558	DA - P	Jenes y col. (2000).
	<i>E. mundtii</i> AT06	Mundticina	<i>Lb. sake</i> DSM 20017	Turbidimétrico	Bennik y col. (1998).

DA- P: Difusión en agar por el método de puntos. DA-F Difusión en agar por el método de fosas

## APÉNDICE 2

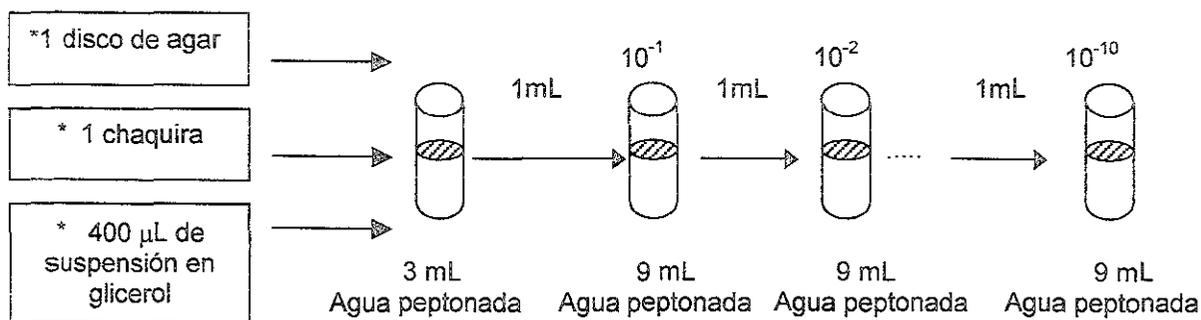
### Preparación de los cultivos de trabajo A y B



### **CULTIVO DE TRABAJO B**

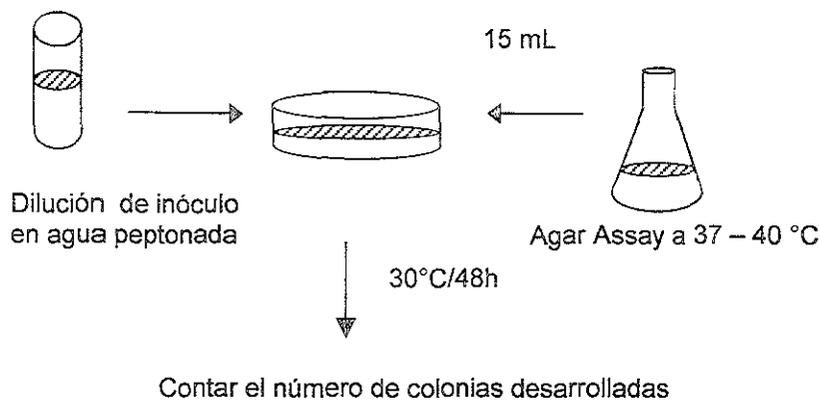
### APÉNDICE 3

#### Cuenta de células viables de *M. luteus* a partir de diferentes métodos de conservación



\* Antes (0 horas) y después (72 horas) de los procesos de secado (discos de agar) y congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  (chaquiras con glicerol y medio de cultivo con glicerol).

#### A) VERTIDO EN PLACA



#### B) EXTENSIÓN SUPERFICIAL



## APÉNDICE 4

### Datos crudos de cuenta de células viables de *M. luteus* a partir de diferentes métodos de conservación

Método de preservación	Colonias observadas en placas / UFC/mL			
	Inicial		Final	
Secado en disco de agar	25 X 10 <sup>10</sup> 48 X 10 <sup>5</sup>	2.5X 10 <sup>11</sup> 1.2 X 10 <sup>7</sup>	25 X 10 <sup>6</sup> 98 X 10 <sup>6</sup>	2.5X10 <sup>7</sup> 2.5X 10 <sup>6</sup>
Congelación en chaquiras con glicerol a -70°C	245 X 10 <sup>5</sup> 86 X 10 <sup>5</sup>	2.5 X 10 <sup>7</sup> 2.2 X 10 <sup>7</sup>	25 X 10 <sup>6</sup> 25 X 10 <sup>5</sup>	2.5X10 <sup>7</sup> 6.3X10 <sup>5</sup>
Congelación en medio con glicerol a -70°C	1.0 X 10 <sup>7</sup> 127 X 10 <sup>10</sup>	1.0X 10 <sup>7</sup> 3.2 X 10 <sup>12</sup>	25 X 10 <sup>6</sup> 8 X 10 <sup>5</sup>	2.5 X 10 <sup>7</sup> 2.0 X 10 <sup>6</sup>

\*Valor superior calculado por vertido en placa y valor inferior por extensión superficial

- Vertido en placa

UFC/mL = Promedio de las colonias contadas X Recíproco de la dilución

- Extensión superficial

UFC/mL= Promedio de colonias contadas X Recíproco de la dilución

Volumen de la dilución

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Aasen, IM; Moretro, T; Katla, T; Axelsson, L. & Storro, I. (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. Appl. Microbiol. Biotechnol; 53(2):159 –166.
- 2 Aktypis, A; Kalantzopoulos, G; Huis in't Veld, J.H.J & ten Brink B.(1998). Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. J. Appl. Microbiol; 84:568 – 576.
3. Aplin & Barrett (2000). Nisaplin®. Hojas Técnicas.
4. Anderssen, E.L; Diep, D. B; Nes, I. F; Eijsink, V.G.H. & Nissen-Meyer, J. (1998). Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. Appl. Environ. Microbiol; 64 (6):2269 –2272.
- 5 Atlas, R.M. (1995). *Microorganisms in our World*. Editorial Mosby. Pág. 24 – 33.
6. Axelsson, L; Holck, A; Birkeland, S.- E; Aukrust, T. & Blom, H. (1993). Cloning and Nucleotide Sequence of a Gene from *Lactobacillus sake* Lb 706 Necessary for Sakacin A Production and Immunity. Appl Environ. Microbiol. 59 (9): 2868 – 2875.
- 7 Aymerich, T; Artigas, M. G; Garriga M; Monfort, J. M. & Hugas, M. (2000). Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocin A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of in vitro production and anti-listerial effect in dry fermented sausages. J. Appl. Microbiol; 88 (4): 686 – 694.
8. Aymerich, T; Holo, H; Havarstein, L. S; Hugas, M; Garriga, M. & Nes, I. F. (1996). Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin A from *Enterococcus faecium*, a New Antilisterial Bacteriocin in the Pediocin Family of Bacteriocins. Appl. Environ. Microbiol; 62 (5): 1676 . 1682.
9. Balakrishnan, M; Simmonds, R.S; Carne, A. & Tagg, J. R. (2000). *Streptococcus mutans* strain N produces a novel low molecular mass non- lantibiotic bacteriocin. FEMS Microbiol. Lett. 183 (1): 165 – 169.
10. Balla, E; Dicks, L. M. T; Toit, M. D; Merwe, M. J. V.- D. & Holzapfel, W. H. (2000). Characterization and cloning the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. Appl. Environ. Microbiol; 66 (4): 1298 – 1304.
11. Bárcena, J. M. B; Siferiz, F; de Hano. D. G; Rodríguez, A. & Suárez, J. E. Chemostat production of plantaricin C by *Lactobacillus plantarum* LL441. Appl. Environ Microbiol; 64 (9): 3512-3514.
12. Barry, A. L. (1976). *The Antimicrobial susceptibility Test*. Principles and Practices. LEA & Febiger, U.S.A. pp117 – 179.
13. Becker, B; Holzapfel, W. H. & von Holy, A. (1994). Effect of pH and the bacteriocin carnioicin 54 on growth and cell morphology of two *Leuconostoc* strains. Lett. Appl. Microbiol; 19:126–128.

14. Benik, M. H. J; Vanloo, B; Brasseur, R; Gorria, L. G. M. & Smid, E. J. (1998). **A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus munditi*: full characterization and interaction with target organisms.** *Biochim. Biophys. Acta*; 1373 (1): 47 – 58.
15. Bennik, M. H.J; Smid, E. J. & Gorris, L. G. M. (1997). **Vegetable Associated *Pediococcus parvulus* Produces Pediocin PA – 1.** *Appl. Environ. Microbiol*; 57 (4):1265 – 1267.
16. Beukes, M; Bierbaum, G; Sahl, H.-G. & Hastings, J. W. (2000). **Purification and Partial Characterization of a Murein Hydrolase, Millericin B, Produced by *Streptococcus milleri* NMSCC 061.** *Appl. Environ. Microbiol*; 66 (1): 23 – 28.
17. Bhugaloo – Vial, P; Douliez, J. – P; Mollé, D; Dousset, X; Boyaval, P. & Marion, D. (1999). **Delineation of key Amino Acid Side Chains and Peptide Domains for Antimicrobial Properties of Divecirin V4, a Pediocin . Like Bacteriocin secreted by *Carnobacterium divergens* V41.** *appl. Environ. Microbiol*; 65 (7): 2895 – 2900.
18. Bhugaloo – Vial, P; Douliez, J. – P; Mollé, D; Dousset, X; Boyaval, P. & Marion, D. (1999). **Delineation of key Amino Acid Side Chains and Peptide Domains for Antimicrobial Properties of Divecirin V4, a Pediocin . Like Bacteriocin secreted by *Carnobacterium divergens* V41.** *appl. Environ. Microbiol*; 65 (7): 2895 – 2900.
19. Bhugaloo-Vial, P; Dousset, X; Metivier, A; Sorokine, O; Anglade, P; Boyaval, P. & Marion, D. (1996). **Purification and Amino Acid Sequences of Piscicocins V1a and V1b, Two Class Iia Bacteriocins Secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 That Display Significantly Different Levels of Specific Inhibitory Activity.** *Appl. Environ. Microbiol*; 62(12): 4410 – 4416.
20. Bhunia, A. K; Johnson, M.C; Ray, B. & Kalchayanand, N. (1991). **Mode of action o Pediocin Ach from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains.** *J. Appl. Bacteriol*; 70: 25–33.
21. Biswas, S.R; Purbita, R; Johnson, M. C; Ray, B. (1991). **Influence of Growth conditions on the Production of a Bacteriocin, Pediocin Ach, by *Pediococcus acidilactici* H.** *Appl. Environ. Microbiol*; 57 (4): 1265 – 1267.
22. Blom, H; Katla, T; Hagen, B. F. & Axelsson, L. (1997). **A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect difusión of bacteriocins.** *Int. J. Food Microbiol*; 38: 103 – 109.
23. Blom, H; Katla, T; Holck, A; Sletten, K, Axelsson, L & Holo, H. (1999). **Characterization , Production, and Purification of Leucocin H, a Two – Peptide Bacteriocin from *Leuconostoc* MF215B.** *Curr. Microbiol*; 39: 43-48.
24. Bogovic – Matijasic, B; Rogelj, I; Nes, I. F. & holo, H. (1998). **Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221.** *App. Microbiol. Biotech*; 49: 606 – 612.
25. Bouttefroy, A; Linder, M. & Milliére, J. B. (2000). **Predictive models of the combined effects of curvaticin 13, NaCl and pH on the behaviour of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in broth.** *J. Appl. Microbiol*; 88 (6): 919 – 929.
26. British Standards Institutions. (1974). **BS:4020. Methods for the stimations and differentiation of nisin in processes cheese.**

27. Burianek, L. L. & Yousef, A. E. (2000). Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures. *Let. Appl. Microbiol.*, 31(3):193- 197.
28. Cabo, M. L; Murado, M. A; González, M. P. & Pastoriza, L. (1999). A method for bacteriocin quantification. *J. Appl. Microbiol*; 87: 07 – 914.
29. Cai, Y; Ng, L. – K. & Farber, J. M: (1997). isolation and characterization of nisin – producing *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* from bean sprouts. *J. Appl. Microbiol*; 83: 499 – 507.
30. Callewaert, R. & De Vuyst, L. (2000). Bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by fed-batch fermentation. *Appl. Environ. Microbiol*; 66 (2): 606 – 613.
31. Carolissen-Mackay, V; Arendse, G; Hastings, J. W. (1997). Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol*; 34: 1 – 16.
32. Chen, P; Novak, J; Kirk, M; Barnes, S; Qi, F. & Caufield, P. W. (1998). Structure-activity study of the lantibiotic mutaci II from *Streptococcus mutans* T8 by a gene replacement strategy. *Appl. Environ. Microbiol*; 64 (7):2335 – 2340.
33. Chen, Y; Shapira, R; Eisenstein, M. & Montville, T. J. (1997). Functional Characterization of Pediocin PA-1 binding to Liposomes in the Absence of a Protein Receptor and Its Relationship to a Predicted Tertiary Structure. *Appl. Environ. Microbiol*; 63(2): 524 – 531.
34. Choi, H.-J; Cheigh, C.-I; Kim, S.- B. & Pyun, Y.-R.(2000). Production of a nisin- like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. *J. Appl. Microbiol*; 88 (4): 563 – 71.
35. Choi, H.-J; Lee, H.-S; Her, S; OH, D.-H. & Yuun, S.- S. (1999). Partial characterization and cloning of leucocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. J2 isolated from the Korean fermented vegetable Kimchi. *J. Appl. Microbiol*; 86 (2). 175 – 181.
36. Cintas, L. M; Casaus, P; Havarstein, L. S; Hernández, P. E. & Nes, I. F. (1997). Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin P, a Novel sec- Dependent Bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a Broad Antimicrobial Spectrum. *Appl. Environ. Microbiol*; 63(11): 4321 . 4330.
37. Cintas, L. M; Casaus, P; Herranz, C; Havarstein, L. S; Holo, H; Hernández, P. E. & Nes, I. F. (2000). Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol*; 182 (23): 6806- 6814.
38. Cintas, L. M; Casaus, P; Holo, H; Hernández, P. E; Nes, I. F. & Havarstein, L. S. (1998). Enterocin L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol*; 180 (8): 1988- 1994.
39. Contreras. B. G. L; De Vuyst. L; Devreese, B; Busanyova, K; Raymaeckers, J; Bosman, F; Sablon, E & Vandamme, E. J. (1997). Isolation, Purification, and amino Acid Sequence of Lactobin A,

- One of Two Bacteriocins Produced by *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139. *Appl. Environ. Microbiol*; 63 (1): 13 – 20.
40. Coventry, M. J; Gordon, J. B; Alexander, M; Hickey, M. W. & Wan, J. (1996). A Food- Grade Process for Isolation and Partial Purification of Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria That Uses Diatomite Calcium Silicate. *Appl. Environ. Microbiol*; 62(5): 1764 – 1769.
  41. Cuozzo, S. A; Sesma, F; Palacios, J. M; de Ruiz Holgado, A. P. & Ray, R.R. (2000). Identification and nucleotide sequence of genes involved in the syntesis of lactocin 705, a two- peptide bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL 705. *FEMS Microbiol Lett*; 185 (2): 157 – 161.
  42. Daeschel, m. A. & Klaenhammer, T. R. (1985). Association of a 13.6 Megadalton Plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with Bacteriocin Activity. *Appl. Environ. Microbiol*; 50 (6): 1538 – 1541.
  43. Davidson, P. M. & Parish, M. E. (1989). Methods for Testing the Efficacy of Food Antimicrobials. *Food Technology*; 148 – 155
  44. De Martinis, E. C. P; Crandall, A. D; Mazzotta, A. S & Montville, T. J.(1997). Influence of pH, Salt, and Temperature on Nisin Resistance in *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect*; 60 (4): 420 – 423.
  45. De Vuyst, L. & Vandamme, E. J. (1994). **Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications**. Blackie Academic & Professional. Pp
  46. Delves-Broughton J. (1998). Bulletin of the IDF329.
  47. Diem, P. B; Axelsson, L; Grefsl. C. & Nes, I. F. (2000). The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. *Microbiol*; 146 (9): 2155 – 2160.
  48. Eijnsink, V. G. H; Skeie, M; Middelhoven, P. H; Brurberg, M. B. & Nes, I. F. (1998). Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*; 64 (9): 3275 – 3281.
  49. Elegado, F. B; Kim, W. J; Kwon, D. Y. (1997). Rapid purification, partical characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, Pediocin AcM, from *Pediococcus acidilactici* M. *Int. J. Food Microbiol*; 37 (1): 1-11.
  50. Enan, G; El- Essawy, A. A; Uyttendaele, M. & Debevere, J. (1996).Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: characterization, productin and bactericidal action of plantaricin UG1. *Int. J. Food Microbiol*; 30: 189 – 215.
  51. Ennahar, S. & Deschamps, N. (2000). Anti-Listeria effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol*; 88 83): 449 –457.
  52. Ennahar, S; Werner, A. D; Assobhei, O. & Hasselmam, C. (1998). Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. *J. Appl. Microbiol*; 85 (3): 521 – 526.

53. Felix, J. V; Papathanasopoulos, M. A; Smith, A. A. van Holy, A; Hastings, J. W. (1994). **Characterization of Leucocin B-Ta11a: A Bacteriocin from *Leucocostoc carnosum* Ta 11a Isolated from Meat.** *Curr. Microbiol*; 29: 207 – 212.
54. Fimland, G; Jack, R; Jung, G; Nes, I. F. & Nissen-Meyer, J. (1998). **The bactericidal activity of pediocin PA-1 is specifically inhibited by a 15-mer fragment that spans the bacteriocin from the center toward the C terminus.** *Appl. Environ. Microbiol*; 64(12): 5057-5060.
55. Fieury, Y; Dayem, M. A; Montayne, J.J; Chaboisseau, E; Le Caer, J. P; Nicolas, P. & Delfour, A. (1996). **Covalent Structure, Synthesis, and Structure-Function Studies of Mesentericin Y105, a Defensive Peptide from Gram-positive Bacteria *Leuconostoc mesenteroides*.** *J. Biol. Chem*; 271 (24): 14421 - 14429.
56. Franz, C. M. A. P; Toit, M. D; Olasupo, N. A; Schillinger, U. & Holzapfel, W. H. (1998). **Plantaricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 from ready-to-eat salad.** *Lett. Appl. Microbiol*; 26: 231 – 235.
57. Franz, C. M. A. P; van Belkum, M. J; Worobo, R. W; Vederas, J.C. & Stiles, M. E. (2000). **Characterization of the genetic locus responsible for production and immunity of carnobacteriocin A: the immunity gene confers cross – protection to enterocin B.** *Microbiol*; 146: 621 – 631.
58. Franz, C. M. A; Worobo, R W; Quadri, L. E. N; Schillinger, V; Holzapfel, W. H; Vederas, J. C. & Stiles, M. J. (1999). **Atypical genetic loci associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900.** *Appl. Environ. Microbiol*; 65 (5): 2170 – 2178.
59. Gänzle, M. G; Hertel, C. & Hammes, W. P. (1999). (a). **Resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* against nisin and curvacin A.** *International J. Food Microbiol.* 48: 37 – 50.
60. Gänzle, M. G; Weber, S; Hammes, W. P. (1999 b). **Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins.** *Int. J. Food Microbiol*; 46: 207 – 217.
61. Georgalaki, M. D; Sarantinopoulos, P; Ferreira, E. S; De Vuyst, L; Kalantzopoulos, G. & Tsakalidou, E. (2000). **Biochemical properties of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from Greek Kasser cheese.** *J. Appl. Microbiol*; 88: 817 – 825.
62. Germond, J. E; Marciset, O; Mollet, B. (1997). **Bacteriocins from *Streptococcus thermophilus*.** United State Patent. 5,683,890.
63. Gherna, R. L. (1994). **Culture Preservation.** In *Methods for General and Molecular Bacteriology.* Gerhardt, P; Murray, R. G. E; Wood, W.A. and Krieg, N. American Society for Microbiology. Washington pp 279 - 291
64. Gruenwedel, D. W. & Whitaker, J. R. (1985). **Food Analysis Principles and Techniques.** Biological Techniques. Marcel Keckker Inc. U.S.A. Vol. 3: 35 – 41.

65. Guyonnet, D; Fremaux, C; Cenatiempo, Y. & Berjeaud, J. M. (2000). **Method for Rapid Purification of Class Ila Bacteriocins and Comparison of Their Activities.** Appl. Environ. Microbiol; 66 (4): 1744-1748.
66. Guyonnet, T; Fremaux, C; Cenatiempo, Y. & Berjeaud, M. (2000). **Method for Rapid Purification of Class Ila Bacteriocins and Comparison of Their Activities.** Appl. Environ. Microbiol; 66 (4): 1744 – 1748.
67. Harris, L. J; Fleming, H. P. & Klaenhammer, T. R. (1992). **Characterization of Two Nisin-Producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Isolated from commercial sauerkraut Fermentation.** Appl. Environ. Microbiol; 58 (5): 1477 – 1483.
68. Hasting, J. W; Sailer, M; Jhonson, K; Roy, K. L; Vederas, J. C. & Stiles, M. E. (1991). **Characterization of Leucocin A- UAL 187 and cloning of the Bacteriocin Gene from *Leuconostoc gelidium*.** J. Bacteriol; 173 (23): 7491 – 7500.
69. Hastings, J. W; Sailer, M; Johnson, K; Roy, K. L; Vederas, J.C. & Stiles, M.E. (1991). **Characterization of Leucocin A-UAL 187 and Cloning of the Bacteriocin Gene from *Leuconostoc gelidium*.** J. Bacteriol. 173 (23): 7491 – 7500.
70. Hauge, H. H; Mantzilas, D; Moll, G. N; Konings, W.N; Driessen, A. J. M. Eijsink, V. G. H. & Meyer, J. N. (1998). **Plantaricina A is an amphiphilic alpha-helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms.** Biochem; 37 (46):16026-16032.
71. Holo, H; Nilssen, O. & Nes, I. F. (1991). **Lactococcin A, a New Bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: Isolation and Characterization of the Protein and Its Gene.** J. Bacteriol. 176 (12): 3879 – 3887.
72. Holt, J. G; Krieg, N. R; Sneath, P. H. A; Stanley, J. T & Williams, S. T. (1994). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** Williams & Wilkins. U.S.A: 527- 542.
73. Hoover, D. G; Steenson, L. R. (1993). **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria.** Academic Press.
74. Ivanova, I; Miteva, V; Stefanova, Ts; Pantev, A; Budakiv, I; Danova, S; Moncheva, P; Nikolova, I; Dousset, X. & Boyaval, P. (1998). **Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81.** Int. J. Food Microbiol; 42 (3): 147- 158.
75. Jay, J. M. (1992). **Microbiología Moderna de los alimentos.** 3ra. Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España; pp: 443 – 449.
76. Jennes, W; Dicks, L. M. T. & Verwoerd, D. J. (2000). **Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich.** J. app. Microbiol; 88 (2): 349 – 357.
77. Jiménez-Díaz, R; Ríos – Sánchez, R. M; Desmazeaud, M; Ruiz-Barba, J. L. & Piard, J.-C. (1993). **Plantaricins S and T, Two New Bacteriocins Produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 Isolated from a Green Olive Fermentation.** Appl. Environ. Microbiol; 59 (5): 1410 – 1424.
78. Jiménez-Díaz, R; Ruiz – Barba, J. L; Cathcart, D. P; Holo, H; Nes, I. F; Sletten, K. H. & Warner, P. J. (1995). **Purification and Partial Amino Acid Sequence of Plantaricin S, a Bacteriocin**

- Produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the Activity of Which Depends on the Complementary Action of Two Peptides. *Appl. Environ. Microbiol*; 61(12): 4459 – 4463.
79. Joerger, M.C. & Klaenhammer, T. R. (1986). **Characterization and Purification of Helveticin J and Evidence for a Chromosomally Determined Bacteriocin Produced by *Lactobacillus helveticus* 481.** *J. Bacteriol*; 167 (2): 439 – 446.
  80. Johnsen, L; Firmland, G; Eijsink, V. & Nissen – Meyer, J. (2000). **Engineering increased stability in the antimicrobial peptide pediocin PA-1.** *Appl. Environ. Microbiol*;66 (11):4798 –4802.
  81. Jones, D; Pell, D.A & Sneath, P. H. A. (1991).**Maintenance of Bacteria on Glass Beads at – 60°C to 76°C.** in *Maintenance of Microorganisms and Culture Cells. A manual of Laboratory Methods.* Kirsop, B.E. & Doyle, A. Second Edition. Academic Press pp 45 – 50
  82. Kanatani, K; Oshimura, M. & Sano, K. (1995). **Isolation and Characterization of Acidocin A and Cloning of the bacteriocin Gene from *Lactobacillus acidophilus*.** *Appl. Environ. Microbiol*; 61(3): 1061 – 1067.
  83. Kaser, A. L. & Montville, T. J. (1996). **Purification of the Bacteriocin Bavaricin MN and Characterization of Its Mode of Action against *Listeria monocytogenes* ScottA Cells and Lipid Vesicles.** *Appl. Environ. Microbiol*; 62 (12): 4529 – 4535.
  84. Kawai, Y; Saito, T; Suzuki, M. & Itoh, T. (1998). **Sequence analysis by cloning of the structural gene of gassericina A, a hydrophobic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39.** *Biosci. Biotechnol. Biochem*; 62 (5): 887- 892.
  85. Kelly, W. J; Asmundson, R. V. & Huang, C. M. (1996). **Characterization of plantaricin KW30 , a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*.** *J. Appl. Microbiol*; 81: 657– 662.
  86. Klostermaier, P; Scheyhing C.H; Ehrmann, M. & Vogel, R.F. (1999). **Mathematical evaluation of plantaracin formation supports an auto- induced production mechanism.** *Appl. Microbiol. Biotechnol*; 51: 462 – 469.
  87. Kojic, M; Svircevic, j; Banina, A. & Topisirovic, L. (1991). **Bacteriocin – Producing Strain of *Lactococcus lactis* subsp *diacitilactici* S50.** *Appl. Environ. Microbiol*; 57 (6): 1835 – 1837.
  88. Larsen, A. G; Vogensen, F. K. & Josephsen, J. (1993). **Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour dough: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* M1401.** *J. Appl. Bacteriol*; 75: 113- 122.
  89. Lauková, A. & Czikková, S. (1999). **The use of enterocin CCM 4231 in soy milk to control the grow of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*.** *J. Appl. Microbiol*; 87 (1): 182 – 186.
  90. Leal, Ma. V; Baras, M; Ruiz-Barba, J. L; Flonaro, B; Jiménez – Díaz, R. (1998). **Bacteriocin production and competitiveness of *Lactobacillus plantarum* LPCO10 in olive juice broth, a culture medium obtained from olives.** *Int. J. Food. Microbiol*; 43 (1-2): 129 – 134.
  91. Leroy, F. & De Vuyst, L. (1999). **The Presence of Salt and Curing Agent Reduces Bacteriocin Production by *Lactobacillus sakei* CTT494, a Potential Starter Culture for Sausage Fermentation.** *Appl. Environ. Microbiol*; 65 (12): 5350-5356.

92. Liao, C.-C; Yousef, A.E; Chism, G.W. & Richter, E. R. (1993). **Inhibition of *Staphylococcus aureus* in Buffer, Culture Media and foods by Lacidin A, A Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* OSU133.** J.Food Safety; 14: 87 – 101.
93. Liao, C.-C; Yousef, A.E; Chism, G.W. & Richter, E. R. (1993). **Inhibition of *Staphylococcus aureus* in Buffer, Culture Media and foods by Lacidin A, A Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* OSU133.** J.Food Safety; 14: 87 101.
94. Manca de Nadra, M. C; Sandino de Lamelias, D. & Strasser de Saad, A. M. (1998). **Pediocin N5p from *Pediococcus pentosaceus*: adsorption on bacterial strains.** international J. Food Microbiol; 39: 79 – 85.
95. Martinez, J. M; Kok, J; Sanders, J. W. & Hernández, P. E. (2000). **Heterologous Coproduction of Enterocin A and Pediocin PA- 1 by *Lactococcus lactis*: Detection by Specific Peptide-Directed Antibodies.** Appl. Environ. Microbiol; 66 (8): 3543 – 3549.
96. Mathieu, F; Suwandhi, S; Rekhif, N; Milliére, J. B. & Lefebvre, G. (1993). **Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* FR 52.** J. Appl. Bacteriol; 73: 372 – 379.
97. Mayr – Harthing, A., Hedges, A. J. & Berkeley, R. C. W. (1972). **Methods for studying bacteriocins.** In Methods in Microbiology. Ed., Norris, J.R. and Ribbons, D. W. pp. 315 – 342. New York: Academic Press.
98. Mc Auliffe, O; Hill, C. & Ross, R.P. (1999). **Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lacticin 3147- producing starter culture.** J. Appl. Microbiol; 86 (2): 251 – 256.
99. Mc Auliffe, O; Hill, C. & Ross, R.P. (2000). **Each peptide of the two component lantibiotic lacticin 3147 requires a separate modification enzyme for activity.** Microbiol; 146:2147 –2152.
100. Mc Auliffe, O; Ryan, M. P; Ross, R.P. , Hill, C. , Breeuwer, P. & Abee, T. (1998). **Lacticin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential.** Appl. Environ. Microbiol; 64 (2): 439 – 445.
101. Métivier, A; Pilet, M.-F; Dousset, X; Sorukine, O; Anglade, P; Zagorec, M; Piard, J.- C; Marion, D; Cenatiempo, Y. & Fremaux, Ch. (1998). **Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacteriu divergens* V41: primary structure and genomic organization.** Microbiol; 144 (10): 2837 – 2844.
102. Miranda, G. A. & Hernández, G. L. (1999). **Preservación de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* y *Leuconostoc* en Discos de Agar.** Memorias del VIII Congreso Nacional de Educación Química Farmacéutica Biológica.
103. Miteva, V; Ivanova, I; Budakov, I; Pantev, A; Stefanova, T; Danova, S; Mmoncheva, P; Mitev, V; Dousset, X. & Boyaval, P. (1998). **Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by characterization of a novel antibacterial substance produced by a *Lactobacillus delbrueckii* strain 1043.** J. Appl. Microbiol; 85: 603 – 614.

104. Moll, G. Hildeny – Hauge, H; Nissen – Meyer, J; Nes, I.F; Konings, W. N; Driessen, A.J.M. (1998). **Mechanistic Properties of the Two – Component Bacteriocin Lactococcin G.** J. Bacteriol; 180 (1): 96 – 99.
105. Monodane, T; Kawabata, Y. & Takada, H.(1996) **Micrococcus luteus cells and cell walls induce anaphylactoid reactions accompanied by early death and serum cytokines in mice primed with muramyl dipeptide.** FEMS Immun. Med. Microbiol;17: 49 – 55.
106. Montville, T. J; Chung, H. J; Chikindas, M. L. & Chen, Y. (1999). **Nisin A depletes intracellular ATP and acts in bactericidal manner against Mycobacterium smegmatis.** Lett. Appl. Microbiol; 28: 189 – 193.
107. Moretro, T; Aasen, I. M; Storro, I. & Axelsson, L. (2000). **Production of sakacin P by Lactobacillus sakei in a completely defined medium.** J. Appl. Microbiol; 88 (3): 536 –545.
108. Morgan, S. M; Ross, R. P; Beresford, T. & Hill, C. (2000). **Combination of hydrostatic pressure and lactacin 3147 causes increased killing of Staphylococcus and Listeria.** J. Appl. Microbiol. 88 (3); 414 – 420.
109. Mota – Meira, M; Lapointe, G; Lacroix, C & Lavoie, M. C. (2000). **MICs of Mutacin B-Ny266, Nisin A, Vancomycin, and Oxacillin against Bacterial Pathogens.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 44 (1): 24 – 29.
110. Mukamolova, G. V; Kaprelyants, A. S; Young, D. I; Young M. & Kell, D. B. (1998). **A bacterial cytokine.** Microbiol; 95 (15): 8916- 8921.
111. Muriana, P. M. & Klaenhammer, T. R. (1987). **Conjugal transfer of plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in Lactobacillus acidophilus 88.** appl. Environ. Microbiol; 53 (3): 553 – 560.
112. Navarro, L; Zaragoza, ; Sáenz, J; Ruiz-Larrea, F. & Tores, C.**Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines.**J. Appl. Microbiol; 88(1):44-51.
113. Nes, I. F; Diep, D. B; Havarstein, L. S; Brurberg, M. B; Eijsink, V. & Holo H. (1996). **Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria.** Antonie van Leeuwenhoek; 70: 113 – 128.
114. Nilsen, T; Nes, I. F. & Holo, H. (1998). **An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in Entrococcus faecium CTC492.** J. Bacteriol; 180 (7): 1848 – 1854.
115. Nissen – Meyer, J; Holo, H; Havarstein, L. S; Sletten, K. & Nes, I. F. (1992). **A Novel Lactococcal Bacteriocin Whose Activity Depends on the complementary Action of Two Peptides.** J. Bacteriol; 174 (17): 5686 – 5692.
116. Nissen – Meyer, J; Larsen, A. G; Sletten, K; Daeschel, M; Nes, I. F. (1993). **Purification and characterization of plantaricin A, a Lactobacillus plantarum bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides.** J. Gen. Microbiol; 139: 1973 – 1978.
117. Nývák, J; Caufield, P. W. & Miller, E. J. (1994). **Isolation and Biochemical Characterization of a Novel Lantibiotic Mutacin from Streptococcus mutans.** J. Bacteriol. 176 (14): 4316 – 4320.

118. O’Keeffe, T; Hill, C. & Ross, R. P. **Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin a production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC 1146.** Appl. Environ. Microbiol; 65 (4): 1506 – 1515.
119. Oh, S; Kim, S.H. & Worobo, R. W. (2000). **Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30 SC.** J. Dairy Sci; 83 (12): 2747-2752.
120. Ohmomo, S; Murata, S; Katayama, N; Nitisinprasart, S; Kobayashi, M; Nakajiman T; Yajima, M. & Makanishi, K. (2000).**Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157.** J. App. Microbiol; 88 (1): 81 – 89.
121. Oscáriz, J. C. & Pisabarro, A. G. (2000). **Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc 7.** J. Appl. Microbiol; 89: 361 – 369.
122. Parente, E. & Hill, C. (1992). **A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria.** J. appl. Bacteriol; 73: 290 – 298.
123. Parente, E. & Ricciardi, A. (1999). **Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria.** Appl Microbiol. Biotechnol; 52: 628 – 638.
124. Parente, E; Morales, M. & Ricciardi, A. (1996). **Leucocin F10, a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum*.** Int. J. Food Microbiol; 33:231 – 243.
125. Qi, F; Chen, p. & Caufield, P. W. (1999). **Purification of mutacin III from group III *Streptococcus mutans* UA 787 and genetic analyses of mutacin III biosynthesis genes.** Appl. Environ. Microbiol; 65 (9): 3880 – 3887.
126. Regalado, C & García, B. (2000). **Comunicación personal.**
127. Requena, T. & Peláez, C. (1995). **Revisión: Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas.** Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment. 35 (1): 19 – 44.
128. Ryan, M. P; Flynn, J; Hill, C; Ross, R. P. & Meaney, W, J. (1999 a). **The natural food grade inhibitor, lactacin 3147, reduced the incidence of mastitis after experimental challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in nonlactating dairy cows.** J. Dairy Sci; 82 (12): 2625 – 2631.
129. Ryan, M. P; Jack, R. W; Josten, M; Sahl, H.-G; Jung, G; Ross; R. P. & Hill, C. (1999 b). **Extensive Post- translation Modification, Including Serine to D- alanine Conversion in the Two Component Lantibiotic, Lactacin 3147.** J. Biological Chemistry.
130. Ryan, M. P; Meaney, W. J; Ross, R. P. & Hill, C. (1998). **Evaluation of lactocin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens.** App. Environ. Microbiol; 64 (6): 2287 – 2290.
131. Scanell, A. G. M; Hill, C; Ross, R. P; Marx, S; Hartmeier, W. & Arendt, E. K. (2000). **Continuous production of lactacin 3147 and nisin using cells immobilized in calcium alginate.** J. Appl. Microbiol; 89 (4): 573 – 579.
132. Schillinger, U. & Lücke, F.-K. (1989). **Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat.** Appl. Environ. Microbiol; 55 (8):1901 –1906.

133. Sip, A; Grajek, W. & Boyaval, P. (1998). Enhancement of bacteriocin production by *Carnobacterium divergens* AS7 in the presence of a bacteriocin-sensitive strain *Carnobacterium piscicola*. *Int. J. Food Microbiol*; 42 (1-2): 63 – 69.
134. Sip, A; Grajek, W. & Boyaval, P. (1998). Enhancement of bacteriocin production by *Carnobacterium divergens* AS7 in the presence of a bacteriocin-sensitive strain *Carnobacterium piscicola*. *Int. J. Food Microbiol*; 42 (1-2): 63-69
135. Sneath, P. H.A; Mair, N. S; Sharpe, M. E. & Holt J. G. (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins. U.S.A. Vol.2:1004 – 1008.
136. Snell, J. J. S. & Kocur, M. (1991). Maintenance of Bacteria in gelatin discs. In Maintenance of Microorganisms and Culture Cells. A manual of Laboratory Methods. Kirsop, B.E. & Doyle. A. Second Edition. Academic Press pp 51 – 55.
137. Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*: 70: 331 – 345.
138. Stoffels, G; Nes, I. F. & Guomundsdóttir, A. (1992). Isolation and properties of a bacteriocin – producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *J. Appl. Bacteriol*; 73: 309 – 316.
139. Suárez, A. M; Rodríguez, J. M; Hernández, P. E. & Azcona – Olivera, J. I.(1996). Generation of Polyclonal Antibodies against Nisin: Immunization Strategies and Immunoassay Development. *Appl. Environ. Microbiol*; 62 (6): 2117 – 2121.
140. Szabo, E. A. & Cahill, M. E. (1998). The combined effects of modified atmosphere, temperature, nisin and ALTA™ 2341 on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol*; 43: 21 – 31.
141. Taoba, T; Samant, S. K; Yashioka, E. & Itoh, T. (1991 a). Reuterin G, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LAG. *Lett. Appl. Microbiol*; 13: 281 – 286.
142. Taoga, T; Yoshioka, E. & Itoh, T. (1991 b). Lacticin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *Lett Appl. Microbiol.* 12: 43 – 45.
143. Ten Brink, B; Minekus, M; van der Vossen, J. M. B. M, Leer, R. J. & Huis in't Veld, J. H. J. (1994). Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J. Appl. Bacteriol*; 77: 140 – 148.
144. Todorov, S; Onno, B; Sorokine, O; Chobert, J. M; Ivanova, I; Dousset, X. (1999). Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *Int. J. Food Microbiol*; 48: 167 – 177.
145. Toit, M. D; Franz, C. M. A. P. Dicks, L. M. T. & Holzapfel, W. H. (2000). Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *J. Appl. Microbiol*; 88:483 – 494.
146. Tomey, D. P; Wheelock, A. I; Flynn, J; Meaney, W. J; Hill, C. & Ross, R. P. (2000). Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lacticin 3147. *J. Dairy Sci*; 83 (9):1981-1988.

- 147 van Belkum, M. J. & Stiles, M. E. (1995). **Molecular Characterization of –Genes Involved in the Production of the Bacteriocin Leucon A from *Leuconostoc gelidium***. *Appl. Environ. Microbiol*; 61 (10): 3573 – 3579
148. Van Reenen, C. A; Dicks, L. M. T; Chikindas, M. L. (1998). **Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum***. *J. Appl. Microbiol*; 84: 1131 – 1137.
149. Vaughan, E. E; Daly, C. & Fitzgerald, G. F. (1992). **Identification and characterization of helveticin V- 1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829**. *J. Appl. Bacteriol*; 73: 299 – 308.
150. Venema, K; Abee, T; Haandrikman, A.J; Leenhouts, K.J; Kok, J; Konings, W.N. & Venema, G. (1993). **Mode of Action of Lactococcin B, a Thiol – Activated Bacteriocin from *Lactococcus lactis***. *Appl. Environ. Microbiol*; 59(4): 1041 – 1048.
151. Votyakova, T. V; Kaprelyants, A. S. & Kell, D. B. (1994). **Influence of Viable Cells on the Resuscitation of Dormant Cells in *Micrococcus luteus* Cultures Held in an Extended Stationary Phase: the Population Effect**. *Appl. Environ. Microbiol*; 60 (9): 3284 – 3291.
152. Wahlström, G. & Saris, P. E. J. (1999). **A Nisin Bioassay Based on Bioluminescence**. *Appl. Environ. Microbiol*; 65 (8): 3742 – 3745.
153. Wan, J; Hickey, M. W. & Coventry, M. J. (1995). **Continuous production of bacteriocins, brevicin, nisin and pediocin, using calcium alginate- immobilized bacteria**. *J. Appl. Bacteriol*; 79: 671 – 676.
154. Wan, J; Hickey, M.W;Coventry, M. J. (1995). **Continuous production of bacteriocins, brevicin, nisin and pediocin, using calcium alginate-immobilized bacteria**. *J. Appl. Bacteriol*; 79:671 – 676.
155. Welby, M; Poquet, Y. & Tocanne, J.(1996). **The spatial distribution of phospholipids and glycolipids in the membrane of the bacterium *Micrococcus luteus* varies during the cell cycle**. *FEB Lett*; 384: 107 – 111.
156. Wessels, S; Jelle, B; Nes, I. F. (1999). **Bacteriocins of the Lactic Acid Bacteria: an overlooked benefit for food**. Second printing
157. Wolf, C.E. & Gibbons W. R. (1996). **Improved method for quantification of the bacteriocin nisin**. *J. Appl. Bacteriol*; 80: 453 – 547.
158. Worobo, R. W; Belkum; M. J.V; Sailer, M; Roy, K; Vederas, J. C. & Stiles, M. E. (1995). **A Signal Peptide Secretion-Dependent Bacteriocin from *Carnobacterium divergens***. *J. Bacteriol.* 177 (11): 3143 – 3149.
159. Yang. R; Jhonson, M. C. & Ray, B.(1992). **Novel Method To Extract Large Amounts of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria**. *Appl. Environ. Microbiol*; 58 (10): 3355-3359.

160. Yildirim, Z. & Johnson, M. G. (1998). **Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* R isolated from radish.** J. Appl. Microbiol; 26: 297 – 304.
161. Zamfir, M; Callewaert, R; Cornea, P.C; Savu, L; Vatafu, I. & De Vuyst, L.(1999). **Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801.** J. Appl. Microbiol; 87: 923 – 931.
162. Zheng, G. & Slavik, M. F. (1999). **Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain.** Lett. Appl. Microbiol; 28: 363 - 367.
163. Zhu, W. M; Liu, W. & Wu, D. Q. (2000). **Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7.** J. Appl. Microbiol; 88: 877 – 886.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA  
LIBRARY