

BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS CON CAPACIDAD ANTAGÓNICA Y ACTIVIDAD BACTERIOCINOGÉNICA AISLADAS DE QUESOS FRESCOS.

Cástulo I. Martín del Campo M¹., Héctor E. Gómez H². Ricardo Alaníz de la O.³
camarcamo@hotmail.com.mx/ hgomez@cencar.udg.mx

Recibido: septiembre 10, 2007 / Aceptado: marzo 28, 2008 / Publicado: enero 11, 2008

RESUMEN. Se aislaron 350 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL), a partir de 35 muestras de quesos frescos, fueron probadas en contra de cuatro microorganismos patógenos, tres Gram+ (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) y un Gram- (*Salmonella agona*). Sólo 25 cepas mostraron capacidad antagónica, el mayor efecto inhibidor fue debido al pH, por la producción de ácidos orgánicos. 8 de ellas, mostraron un efecto inhibidor diferente al pH, Todas las cepas mostraron actividad antagónica en contra de bacterias Gram+. *S. agona*, no fue inhibida en su desarrollo, por ninguna de las cepas de bacterias ácido lácticas. Tres cepas que mostraron inhibición con el sobrenadante, se trataron con enzimas proteolíticas, y se determinó que el factor inhibidor es de origen proteico. 16 cepas mostraron que es necesaria la presencia de las BAL para inhibir a los patógenos, al probar el sobrenadante libre de BAL, el efecto inhibidor no se manifestó.

PALABRAS CLAVE. Antibacteriano, Péptidos, Inocuidad, Sobrenadante.

1-2. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Blvd. Marcelino García Barragán y Calzada Olímpica, S.R. Guadalajara, Jalisco, México.

3. Carretera a Nogales, Km. 15.5. Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. www.cucba.udg.mx

Introducción

Las bacterias ácido lácticas (BAL) están presentes en la alimentación del hombre desde hace mucho tiempo y es posible encontrarlas en diferentes productos de leche fermentada como jocoque y yogurt, también se encuentran en quesos frescos y madurados, en diferentes carnes y sus productos y en algunas hortalizas. Metchnikoff, investigador del siglo XIX, relacionó desde hace más de un siglo el efecto benéfico sobre la salud humana, con el consumo de leche fermentada que contenía cierto tipo de bacilos (1).

Desde hace mucho tiempo, se ha reconocido la importancia de las (BAL) como microorganismos benéficos en los alimentos y en la salud, mejora el tracto gastrointestinal de los seres humanos, evitando el desarrollo de microorganismos patógenos capaces de producir enfermedades, por la estimulación del sistema inmunológico y por consiguiente, la producción de anticuerpos.

Con la denominación de “bacterias ácido lácticas” (BAL) se generaliza a un grupo de bacterias que fermentan azúcares como glucosa y lactosa para producir ácido láctico. Dentro de este grupo se reconoce la existencia de microorganismos aerobios, anaerobios y anaerobios facultativos. Los géneros representativos de las BAL se denominan: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* y *Pediococcus*. Con excepción de *Bifidobacterium*, todos son aeróbicos (2).

Estos microorganismos se pueden clasificar además por su metabolismo, en homofermentativos y heterofermentativos, los primeros producen exclusivamente ácido láctico, mientras que los segundos, producen además ácido acético, etanol y dióxido de carbono (2) op.cit.

La actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas ha sido atribuida a la acumulación de los productos finales de los procesos de fermentación, como ácido láctico, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, etc. o a la producción de bacteriocinas (3).

Las bacterias ácido lácticas tienen una amplia aplicación como cultivos iniciadores en una variedad de alimentos fermentados. Los ácidos orgánicos producidos, con una reducción en el pH, se considera como el principal agente inhibidor del crecimiento de microorganismos contaminantes en los alimentos fermentados (4).

Las BAL se han utilizado desde hace algunas décadas en la industria de alimentos como bioconservadores debido a la producción de sustancias que ejercen acción antibacteriana, que contribuyen a la prevención de la descomposición de los alimentos y evitan el desarrollo de microorganismos patógenos. Otras características deseables de las BAL, son que pueden mejorar el sabor y la textura y en algunos casos aumentan el valor nutricional, por sus efectos sobre la digestibilidad (5), (6).

Debido a que las bacterias ácido lácticas pueden ser destruidas en el tracto intestinal, son termo resistentes, activas en pH bajos, inocuas para los consumidores y estables en los alimentos, se han utilizado como un bioconservador natural en los alimentos (7).

Se han obtenido numerosas bacteriocinas producidas por las BAL, observando que cada una tiene espectros de inhibición específicos en contra de algunos microorganismos, esta particularidad se aprovecha en la industria de los alimentos para su aplicación en distintos procesos. En algunos casos, las bacteriocinas se emplean para la inhibición del crecimiento de bacterias indeseables específicas relacionadas con el

productor de la bacteriocina; en otros casos, se aplican para inhibir el crecimiento de microorganismos degradadores de alimentos o de patógenos, como listerias y estafilococos (8).

Las bacteriocinas poseen un gran potencial para utilizarse en sistemas de alimentos para la inhibición natural de microorganismos patógenos. Esta biotecnología puede ser implementada relativamente a bajo costo para la conservación de una amplia variedad de alimentos (9).

El aumento en el consumo de alimentos procesados que se elaboran con conservadores químicos, ha originado en los consumidores una demanda por alimentos con un mínimo procesamiento y que tiendan a ser más naturales. Como resultado de este patrón en el consumo, existe un gran interés en la utilización de agentes antimicrobianos producidos naturalmente (10).

Considerando que las bacteriocinas son proteínas naturales, existe un gran interés en su aplicación como un método alternativo para asegurar la inocuidad de alimentos refrigerados con un mínimo procesamiento, objetivo que se ha buscado también empleando métodos combinados o tecnología de barreras (11), (12).

En la actualidad, la nisina es la única bacteriocina aprobada por la FDA. para incluirse en alimentos, para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. Sin embargo, se han aislado otras bacteriocinas, con potencial para utilizarse con el mismo fin.

La mayoría de las bacteriocinas, tienen un espectro de acción más bien reducido, preferentemente en contra de bacterias Gram+. Sin embargo, algunas bacteriocinas, pueden presentar un espectro más amplio en contra de algunas bacterias Gram-, por lo que existe un marcado interés por estudiar más cepas de BAL, para encontrar éstas características (13).

Las bacteriocinas se pueden definir como péptidos biológicamente activos que tienen propiedades bactericidas en contra de otras especies que pueden estar estrechamente relacionadas con las cepas productoras. No obstante, este concepto se ha visto modificado, debido a que se han encontrado efectos bactericidas en contra de microorganismos distanciados filogénicamente de las cepas de BAL productoras de bacteriocinas (14).

Las bacteriocinas se han clasificado considerando sus propiedades bioquímicas y a sus características genéticas (15), (16), En 1996, Nes propuso la siguiente clasificación:

Clase I. Lantibióticos: Son péptidos activos que actúan sobre la membrana citoplasmática, se caracterizan por poseer algunos aminoácidos poco frecuentes en las proteínas, tales como dihidroalanina, β -metil-lantionina y lantionina, estos se forman por una modificación posterior a la traducción. La transformación es debida a la deshidratación de los aminoácidos treonina y serina, a los que posteriormente se les adicionan átomos de azufre, procedentes de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. La nisina es una bacteriocina típica de esta clase (17), (18).

Clase II. No lantibióticos. Son bacteriocinas que se caracterizan por contener aminoácidos que se encuentran regularmente en las proteínas, pueden ser de peso molecular variable, en este grupo se han identificado tres subclases (19), (20) y (21).

Subclase IIa. Son péptidos que actúan en contra de *Listeria*, comparten la secuencia en la región N-terminal TGNGVXC son característicos de este grupo la sakacina P y la pediocina PA-1 (22).

Subclase IIb: Son péptidos que forman poros en la membrana citoplasmática, consisten de dos péptidos diferentes. Los dos péptidos son necesarios para una efectiva actividad antimicrobiana. En este grupo se han caracterizado a la lactococcina G y las plantarinas EF y JK.

Subclase IIc: Son péptidos pequeños no modificados, presentan termoestabilidad, son transportados por medio de péptidos líder. En esta subclase únicamente se han reportado a las bacteriocinas, divergicina A y acidocina B (23).

Clase III.- Las bacteriocinas caracterizadas en esta categoría son, la acidofilicina A, las lacticinas A y B y las helveticinas J y V. Su peso molecular es mayor de 30 kDa.

Tabla 6. Clases de bacteriocinas representativas de diferentes bacterias ácido lácticas.

<i>Bacteriocina</i>	<i>Clase</i>	<i>Microorganismo productor</i>
Nisina	I	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>
Pediocina PA-1	IIa	<i>Pediococcus acidilactici</i> y <i>Lactobacillus plantarum WHE92</i>
Sakacina P	IIa	<i>Lactobacillus sake LTH673</i>
Plantaricina E/F	IIb	<i>Lactobacillus plantarum C11</i>
Lactococcina G	IIb	<i>Lactococcus lactis subsp cremoris 9B4</i>
Divergicina	IIc	<i>Carnobacterium divergens LV13</i>
Helveticina	III	<i>Lactobacillus helveticus</i>

La [Tabla 6](#) presenta algunas bacteriocinas representativas de cada una de las clases y subclases en que han sido identificadas de acuerdo a sus propiedades, también se presentan los microorganismos de los que se han aislado las diferentes bacteriocinas.

Ennar y col. (1996), (24) aislaron 1962 cepas de 362 muestras, de queso “Munster” (francés). Estas cepas mostraron efectos antagonicos en contra de *L. monocytogenes*; en la mayoría de los casos, el efecto antagonico fue debido a la disminucion en el pH, por la produccion de ácidos orgánicos. Los autores señalaron que sólo seis de los sobrenadantes de cultivos, (tres *Lactobacillus*, dos *Enterococcus* y un *Lactobacillus*) presentaron actividad en contra de *L. monocytogenes* por la acción de sustancias antibacterianas diferentes a los ácidos orgánicos. El extracto del cultivo de *Lactobacillus* fue seleccionado por mostrar una mayor actividad antagonica (Au/ml Unidad Arbitraria de actividad con 17,017 unidades/ml). La capacidad antagonica del extracto no fue inactivado en presencia de catalasa, excluyendo que la inhibición fuera producida por la presencia de peróxido de hidrógeno; sin embargo, el extracto fue inactivado por las enzimas proteolíticas pepsina, tripsina, alfa quimiotripsina, determinando que la sustancia inhibidora es de naturaleza proteica y no fue inactivada en presencia de alfa amilasa y lipasa, determinando que la inhibición no se debe a la acción de carbohidratos o lípidos. El sobrenadante se probó en contra de diferentes bacterias Gram+ (*Lactobacillus sp*, *Enterococcus sp*, *Micrococcus sp*, *Staphylococcus sp* y

Bacillus sp) y Gram- (*Salmonella sp*, *Pseudomona sp*, y *E. coli*), inhibiendo el crecimiento de las Gram+ y no a las Gram-. Ennhar y col. (1996) (24) reportaron además, que la bacteriocina aislada corresponde a la pediocina AcH, producida originalmente por *P. acidolactici* H, señalando que es el primer caso en que una bacteriocina se produce naturalmente por bacterias de diferente género.

Carrasco y col. (2002) (2) op. cit. aislaron 27 cepas de BAL a partir de quesos artesanales y comerciales de Argentina, probando su actividad antimicrobiana. Sólo nueve cepas, presentaron actividad en contra de contra bacterias indicadoras Gram+ y Gram- que deterioran la leche, el queso y otros alimentos. Los autores seleccionaron únicamente tres cepas por presentar una mayor inhibición en contra de las bacterias indicadoras tanto Gram+ como Gram-. La sustancia inhibidora en el sobrenadante libre de BAL, fue destruida por la acción de las enzimas tripsina, pronasa E, pepsina y papaína, con una concentración en el sobrenadante de 0.5 µl/ml, indicando la naturaleza proteica del compuesto activo.

Ennhar y col. (1998) (25) investigaron la efectividad de *Lactobacillus plantarum* WHE 92, productor de la bacteriocina denominada pediocina AcH, en contra de *Listeria monocytogenes* 4d. La cepa de BAL fue aislada de muestras de quesos, lo que sugirió que la cepa no afecta el proceso de maduración; así como tampoco altera las características sensoriales del alimento. Una suspensión de la bacteria láctica (1×10^5 ufc.) fue rociada sobre la superficie del queso previamente inoculado con el patógeno (menos de 50 ufc/g) inhibiendo su desarrollo después de 21 días.

Wan y col. (1997) (26) observaron los efectos de la piscicolina 126, una bacteriocina producida por *Carnobacterium piscicola* JG 126, en contra del patógeno *Listeria monocytogenes* en la fabricación de quesos camembert. Utilizando leche pasteurizada, realizaron la inoculación del patógeno (1×10^2 ufc ml⁻¹) posteriormente se agregó la piscicolina 126 en una concentración de 2048 AU ml⁻¹, reportaron que la viabilidad del patógeno disminuyó en 3-4 log en comparación con los que no se agregó la bacteriocina; sin embargo, reportaron la recuperación de *L. monocytogenes* después de 21 y 47 días posteriores a la elaboración del queso, debido a la posible resistencia de *L. monocytogenes* a la bacteriocina.

Mc Auliffe y col. (1999) (27) aplicaron lacticina 3147 producida por la cepa de *Lactococcus lactis* DPC 3147, como cultivo iniciador en la elaboración de queso tipo cotagge. El microorganismo indicador de la actividad bacteriocinogénica, fue *Listeria monocytogenes* Scott A. La lacticina 3147 es una bacteriocina activa en contra de microorganismos patógenos Gram+ como *Listeria*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, la bacteriocina es activa en un amplio rango de pH, es termoestable, particularmente a pH bajos. La eficacia del láctico redujo hasta en 99% el número de *Listeria monocytogenes* inoculada en un periodo de cinco días y almacenada a 4° C.

En otra investigación, Lauková and Czikková. (1999) (28) estudiaron el efecto de la enterocina CCM 4231, caracterizada como una sustancia termoestable, hidrofóbica con un amplio espectro de acción en contra de microorganismos Gram+ y Gram-, producida por la cepa de *Enterococcus faecium* CCM 4231. El efecto de la enterocina CCM 4231, se investigó en leche de soya en polvo contaminada experimentalmente con *Listeria monocytogenes* Ohio y *Staphylococcus aureus* SA1. *Enterococcus faecium* mostró buen crecimiento en la leche de soya en polvo y posteriormente la producción de enterocina. Reportan que *L. monocytogenes* fue inhibida completamente después de 24 horas de cultivo en la muestra experimental, en tanto que *S. aureus* tuvo un comportamiento diferente; a las seis horas, se observó su menor desarrollo, a las 24 horas mostró un ligero aumento, concluyendo que, en contra de *L. monocytogenes* la enterocina 4231

actuó como un agente bactericida; en tanto que, en contra de *S. aureus* el efecto fue bacteriostático. Señalan además, que la adición de la enterocina CCM 4231, no tuvo influencia sobre el pH. Los resultados de este trabajo indican que las enterocinas pueden ser ampliamente aplicadas en la industria de los alimentos como agentes para aumentar su seguridad higiénica. Se señala también, que actualmente el único problema para su aplicación en alimentos, es legislativo.

Objetivo General

Aislar bacterias ácido lácticas y determinar su acción antagonica en contra de patógenos indicadores seleccionados para este trabajo.

Objetivos Específicos

- 1.- Aislar bacterias ácido lácticas a partir de quesos frescos de la zona metropolitana de Guadalajara (tomando muestras de mercados, centros de acopio y distribución de productos lácteos).
- 2.-Determinar la capacidad antagonica de las cepas de bacterias lácticas aisladas, en contra de los patógenos *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus β hemolítico* del grupo A y *Salmonella agona*.
- 3.-Determinar los mecanismos antagonicos de las bacterias lácticas en contra de los patógenos, incluyendo su capacidad bacteriocinogénica.

MATERIALES Y MÉTODOS

AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas (BAL), fueron aisladas a partir de muestras de quesos frescos que se expenden en los mercados de la zona metropolitana de Guadalajara, incluyendo los municipios conurbanos de Zapopan, Tlaquepaque y Tonalá.

Se determinaron los diferentes mecanismos antagonicos propios de las bacterias ácido lácticas, como pH, producción de peróxido de hidrógeno y la producción de bacteriocinas.

El aislamiento de las BAL se realizó de 35 muestras de quesos frescos, 14 de adobera, 11 de panela, 6 de queso tipo rancho y 4 de queso fresco, se pesaron 10 gramos de cada una colocándolas en bolsa para *stomacher* y se añadieron 90 ml. de diluyente de peptona para su homogenización. Se tomó 1 ml del homogenizado, y se añadió consecutivamente a tubos conteniendo 9 ml de diluyente de peptona, hasta alcanzar las diluciones 5, 6 y 7.

De cada una de las tres diluciones seleccionadas, se tomó un ml y se sembraron por la técnica de inoculación por superficie y extensión con varilla de vidrio en medio Actidiona-Polimixina-Nitrito (APN normal) (29) y se incubaron a 30° C durante 48 a 72 horas. Después de este tiempo, se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (ufc).

Se seleccionaron 10 diferentes colonias aisladas en el medio de APN, considerando algunas características de las colonias como tamaño, color forma, etc. sembrándose en placas de APN cc (conservación de colonias) (29) op. cit. Al desarrollo de las cepas se sometió a las pruebas de Gram, catalasa y movilidad confirmando su pertenencia al grupo de estos géneros. Las BAL son bacterias Gram positivas, catalasa negativas y son inmóviles.

Se seleccionaron cuatro microorganismos patógenos, que son reconocidos como causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella agona* y *Streptococcus β hemolítico del grupo A*. y fueron utilizados como indicadores de actividad antagónica de las BAL,

Determinación de la capacidad antagónica de las BAL en contra de los patógenos.

La conservación de los microorganismos patógenos, se realizó en tubos en el medio de Agar Soya Tripticasa (AST), para las cepas de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella agona*. El *Streptococcus β hemolítico del grupo A*, se conservó en agar sangre (ASTs). También se utilizaron placas de agar para la resiembra de los patógenos, asegurando que no existiera contaminación con otras cepas.

Cada uno de los microorganismos patógenos se inocularon en el medio APN mb en una concentración aproximada de 1×10^5 ufc/ml, en tubos conteniendo 14 ml del medio, se vaciaron en placas y se dejó solidificar.

La determinación de la actividad antagónica de las BAL en contra de los patógenos utilizados como indicadores, se realizó con la técnica de inoculación por picadura reportada por Galliano y Hinsdill (1970) (30), en medio APN mb (modificado blando) (29) op. cit. Se consideró como actividad antagónica positiva la observación de un halo de inhibición de 1 mm ó mayor alrededor de la picadura de las cepas de BAL.

Las cepas de BAL que presentaron actividad antagónica, se conservaron en el medio de APN cc (conservación de colonias) y en tubos de agar MRS.

Determinación de los mecanismos antagónicos de cultivos de BAL en contra de los patógenos.

La determinación de los mecanismos antagónicos de las cepas de BAL, se inició con los cultivos de cada cepa de 24 horas en medio de agar MRS, posteriormente se inocularon en caldo MRS y se incubaron por 24 horas.

Los caldos se centrifugaron a 12,000 RPM. durante 30 minutos, el sobrenadante se extrajo con pipeta Pasteur cuidando de no tocar el paquete celular y colocándolo en un vaso de precipitado.

Por cada una de las cepa, se utilizaron ocho microtubos, el primero, se tomó directamente del vaso de precipitado esterilizándolo por filtración e identificándose como sobrenadante sin tratamiento (ST), al resto del contenido, se le determinó el pH y se ajustó a pH 6.5 para todos los sobrenadantes, con una solución de NaOH 1M, y fueron expuestos por 30 minutos a una solución de catalasa (Sigma Chemical, C-100) con 500 u/ml del sobrenadante a 25° C, llenando siete microtubos por cada cepa y esterilizando por filtración, el resto del sobrenadante, se colocó en tubos estériles para su conservación en congelación.

Los patógenos se sembraron en AST Y ASTs, incubándose por 24 horas, estos cultivos nuevos se resembraron en caldo BHI en cultivos de 24 horas para la inoculación del medio APN mb.

El medio APN mb se inoculó con cada uno de los patógenos con una concentración aproximada de 1×10^5 ufc/ml y se dejó solidificar en placas. La técnica utilizada, fue la de la gota sobre la superficie (*spot-on-lawn*), que consiste en aplicar cinco microlitros del sobrenadante de los cultivos de BAL sobre la superficie seca del medio semisólido. Al medio de APN mb, previamente inoculado con cada una de las cepas indicadoras, se le aplicó una gota del sobrenadante de las BAL realizando tres divisiones en las placas e identificándolas como control (1), pH ajustado (2) y catalasa (3), incubándose a 30° C por 24 horas, finalmente se buscó la presencia de halos de inhibición en las áreas de aplicación del sobrenadante.

Determinación de la capacidad bacteriocinogénica de cultivos de BAL en contra de los patógenos.

Después de seleccionar las cepas que presentaron inhibición en contra de los patógenos indicadores, posterior al ajuste del pH, y a la exposición de catalasa, se repitió el procedimiento para obtener el sobrenadante libre de BAL, utilizándose con pH original, pH ajustado a 6.5 en estos se expusieron durante una hora a 37° C, a la acción de las enzimas alfa quimiotripsina (páncreas de bovino, tipo II; Sigma Chemical, C-4119), Proteinasa K (fúngica, GIBCO, BRL, 25530-015) y proteasa (*Streptomyces griseus*, Sigma Chemical P-5147), en forma individual, a una concentración final de 0.1 mg/ml del sobrenadante.

Todos los sobrenadantes se esterilizaron por filtración, repitiendo la técnica de *spot-on lawn* (Gratia, 1946) (31), aplicando cinco microlitros sobre las placas, previamente inoculadas con las cepas indicadoras y se incubaron a 30° C durante 24 horas, por último se observaron las placas para encontrar zonas de inhibición.

Resultados

Los resultados experimentales se muestran en el orden en que fueron obtenidos, iniciando con el tipo de muestra, su identificación, los recuentos de ufc/ml y la actividad antagonica en contra de los patógenos utilizados como indicadores. Asimismo, se describen los factores responsables de la actividad antagonica y de la capacidad bacteriocinogénica.

De las 35 muestras de cuatro tipos de quesos frescos, los recuentos de ufc/ml, presentaron valores de 5.3×10^6 como el valor más bajo, correspondiente a la muestra número 13 de queso adobera y el valor más alto, se obtuvo en la muestra número 2 de panela con 6.1×10^8 , los demás valores se encuentran dentro de estos límites (Tabla1).

Tabla 1. Muestra de quesos y aislamiento de bacterias ácido-lácticas con sus recuentos ufc/ml.

Adobera		Panela		Ranchero		Fresco	
No de m.*	ufc**	No de m.	ufc	No de m.	ufc	No de m.	ufc
1	8.4×10^7	2	6.1×10^8	4	1.3×10^7	5	1.8×10^7
7	9.3×10^7	3	1.1×10^7	6	2.8×10^8	23	1.3×10^7
9	1.5×10^8	8	1.1×10^8	10	2.8×10^8	27	2.0×10^8
12	6.0×10^7	11	3.8×10^7	15	1.0×10^8	33	1.1×10^8

13	5.3×10 ⁶	14	1.1×10 ⁸	18	2.6×10 ⁷	
17	1.3×10 ⁷	16	2.4×10 ⁸	24	2.2×10 ⁷	
19	3.1×10 ⁸	22	1.3×10 ⁷			
20	9.0×10 ⁷	26	1.6×10 ⁸			
21	1.7×10 ⁸	30	3.6×10 ⁷			
25	1.3×10 ⁸	31	7.5×10 ⁷			
28	1.7×10 ⁸	34	1.6×10 ⁸			
29	3.4×10 ⁷					
32	7.5×10 ⁷					
35	1.3×10 ⁸					
14 quesos		11 quesos		6 quesos		4 quesos

*No. de muestra. **ufc = Unidades formadoras de colonias/ml.

De las 350 cepas de BAL, que fueron aisladas y probadas mediante la técnica de inoculación por picadura, en contra de los cuatro microorganismos patógenos utilizados como indicadores: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella agona* y *Streptococcus β hemolítico* del grupo A, sólo 25 mostraron actividad antagonica en contra de alguno de los patógenos mencionados, mostrando halos de inhibición de 1 mm de diámetro ó mayores, los resultados se muestran en la [Tabla 8](#).

Tabla 2. Inhibición de cepas de BAL aisladas de diferentes quesos, probadas en contra de cuatro patógenos.

Muestra	Cepas	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella agona</i>	<i>Streptococcus β-hemolítico</i>
16 panela	151	+	-	-	-
17 adobera	162	+	-	-	-
	163	-	+	-	-
	170	+	-	-	-
19 adobera	181	+	-	-	-
	183	-	-	-	+
	184	-	-	-	+
	190	+	-	-	-
20 adobera	195	+	-	-	-
21 adobera	206	+	-	-	-
	210	+	-	-	+
25 adobera	245	+	-	-	-
	248	-	-	-	+
	249	+	-	-	-
28 adobera	272	+	-	-	+
	277	+	-	-	+
30 panela	292	+	+	-	-
	293	+	+	-	-
	294	+	+	-	-
	299	+	+	-	-
31 panela	301	+	-	-	+

	303	+	-	-	+
32 adobera	316	-	+	-	+
33 q. Fresco	324	-	+	-	-
	329	+	-	-	+
TOTALES	25	19	7	0	9

+ = Con actividad antagonica. - = Sin actividad antagonica.

La cepa indicadora de *Listeria monocytogenes*, fue la que mostró mayor inhibición, con un total de 19 cepas de BAL que inhibieron su desarrollo, seguido por *Streptococcus β hemolítico* grupo A con 9, y *Staphylococcus aureus* con 7 cepas.

De las cepas probadas, ninguna mostró efectos antagonicos en contra de *Salmonella agona*, que fue el microorganismo Gram-, seleccionado para el presente estudio.

Ninguna de las cepas de BAL que presentaron actividad antagonica, mostraron inhibición en contra de tres ó cuatro de los patógenos utilizados como indicadores.

Las cepas de BAL aisladas que mostraron inhibición en contra de un sólo patógeno fueron: nueve en contra de *Listeria monocytogenes*; tres en contra de *Streptococcus β hemolítico*; y dos cepas en contra de *Staphylococcus aureus*.

Once cepas mostraron inhibición en contra de dos patógenos.

Seis cepas inhibieron a *Listeria monocytogenes* y a *Streptococcus β hemolítico*. Cuatro cepas, inhibieron a *Listeria monocytogenes* y a *Staphylococcus aureus*. Una cepa, inhibió a *Staphylococcus aureus* y a *Streptococcus β hemolítico*.

Todas las cepas seleccionadas, se colocaron en tubos con medio APN cc sembradas por punción y en placas de agar MRS para su conservación en refrigeración.

La determinación de los factores de antagonismo, se probó con los sobrenadantes libres de BAL, ajustando el pH a 6.5, con objeto de poder excluir que la inhibición fue debida a la producción de ácidos orgánicos, y por la exposición de los sobrenadantes a la acción de la enzima catalasa, para descartar que la inhibición fuera debida a la producción de peróxido de hidrógeno. El sobrenadante de cada una de las cepas, se colocó en un microtubo sin ajustar el pH, utilizándose como control, al resto se le determinó su pH, como se puede apreciar en la [Tabla 3](#).

Tabla 3. Valor del pH del sobrenadante del cultivo de las cepas de BAL antes de ajustar el pH a 6.5 para todos los tratamientos.

Cepa	pH	Cepa	pH	Cepa	pH
Ba-1	4.5	Ba-10	6.1	Ba-19	4.4
Ba-2	5.8	Ba-11	4.5	Ba-20	4.4
Ba-3	4.8	Ba-12	4.3	Ba-21	4.5
Ba-4	5.5	Ba-13	4.3	Ba-22	4.4
Ba-5	3.8	Ba-14	4.3	Ba-23	4.8

Ba-6	3.7	Ba-15	4.4	Ba-24	4.3
Ba-7	3.7	Ba-16	4.5	Ba-25	4.5
Ba-8	3.7	Ba-17	4.4		
Ba-9	3.7	Ba-18	4.4		

Como se puede apreciar en la [Tabla 3](#), el pH de cada uno de los sobrenadantes obtenido a partir del cultivo de las cepas de BAL aisladas, se encuentra entre 3.7 como el valor más bajo, se apreció en las capas Ba-6, Ba-7, Ba-8 y Ba-9. En tanto que, el valor más alto de 6.1 se observó en la capa Ba-10. Los datos del pH sin ajustar, sugieren que la acidez por sí misma podría ser la causa de la inhibición microbiana.

Los patógenos fueron inoculados en APN mb y colocados en placas de Petri para su solidificación, posteriormente ya solidificadas, se aplicaron cinco microlitos de los sobrenadantes. Los resultados se muestran en la [Tabla 4](#).

De las 25 cepas que se probaron en contra de los patógenos indicadores que exhibieron actividad antagonica; sólo se presentan las que exhibieron actividad antagonica, después de haber ajustado el pH y que fueron expuestos a la actividad de la enzima catalasa.

Tabla 4. Determinación de los mecanismos antagonicos de las bacterias ácido-lácticas aisladas de quesos frescos de la zona metropolitana de Guadalajara.

CEPA	BA-1	BA-11	BA-16	BA-17
PATÓGENO	ST ¹ pH ² Cat ³	ST pH Cat	ST pH Cat	ST pH Cat
<i>Listeria monocytogenes</i>	+ + +	+ + -	- - -	- - -
<i>Staphylococcus aureus</i>	- - -	+ ± ±	- - -	- - -
<i>Streptococcus. β hemolítico</i>	- - -	+ ± ±	+ + ±	± ± ±
	BA-18	BA-19	BA-20	BA-21
PATÓGENO	ST pH Cat	ST pH Cat	ST pH Cat	ST pH Cat
<i>Listeria monocytogenes</i>	± - -	- - -	+ + +	+ + +
<i>Staphylococcus aureus</i>	+ ± -	+ ± ±	- - -	- - -
<i>Streptococcus. β hemolítico</i>	± ± ±	- - -	- - -	- - -

1 = Sin tratamiento. 2 = pH ajustado. 3 = Catalasa.

+ = Inhibición. ± = Inhibición parcial. - = Sin inhibición.

Los números 1, 2 y 3, de la Tabla 4, representan los tratamientos que se hicieron de cada uno de los caldos, el número 1, se aplicó sin ningún tratamiento y fue utilizado como control para la determinación del mecanismo antagonico. El número 2, se refiere al ajuste del pH a 6.5 del caldo probado contra los patógenos, y el número 3, muestra el comportamiento del caldo tratado con catalasa para eliminar el peróxido de hidrógeno.

Se consideró como inhibición, cuando se observó un halo nítido de inhibición en el lugar en donde se colocó la gota del sobrenadante de los cultivos de las BAL sobre la superficie del medio. En la observación al microscopio, no se apreció ningún desarrollo de colonias de las cepas indicadoras sobre el área tratada.

Se determinó como inhibición parcial, cuando a la observación macroscópica, la presencia del halo fue nítida. Sin embargo, en la observación al microscopio, se apreció un desarrollo de colonias de las cepas indicadoras, en menor cantidad que en el resto del medio que no recibió tratamiento, sin inhibir completamente su desarrollo.

No se reportó alguna inhibición, cuando no se encontró ningún halo en la superficie tratada y cuando las colonias de las cepas indicadoras, no mostraron cambios en su desarrollo.

En todos los casos en donde no se apreció inhibición en el control (No.1) en la etapa primaria de selección del antagonismo, sugiere ampliamente que la presencia del láctico es necesaria para inhibir a los patógenos, el mecanismo de acción puede ser debido a la competencia por el sustrato, en donde los lácticos, probablemente tienen una mayor capacidad de adaptación al medio y no permiten el desarrollo de otros microorganismos.

Las cepas indicadoras, en todas las observaciones, fueron *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus β hemolítico*.

Las cepas BA-1, BA-20 y BA-21, presentaron inhibición positiva por el sobrenadante, únicamente en contra de *Listeria monocytogenes*, en el control, pH ajustado y en presencia de catalasa, sugiriendo que existe otro factor inhibidor, probablemente una bacteriocina. *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus β hemolítico*, no presentaron inhibición en ninguno de los tratamientos.

La cepa BA-11, Presentó inhibición positiva en contra de *Listeria monocytogenes*, en el control y pH ajustado, mostrando que el efecto inhibidor fue debido a la producción del peróxido de hidrógeno. En las cepas indicadoras de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* grupo beta hemolítico, se observó inhibición positiva, sólo en el control, en el pH y en presencia de catalasa, se observaron con inhibición parcial, indicando la probable presencia de otra sustancia responsable de la inhibición.

Las cepas BA-16 y BA-17, mostraron un comportamiento similar, el antagonismo sólo se manifestó en contra de *Streptococcus* grupo beta hemolítico, en el control, la cepa BA-16, presentó inhibición positiva; en tanto que en la cepa BA-17, se observó inhibición parcial. En el ajuste de pH, y la inhibición por peróxido de hidrógeno, en ambas cepas, fue inhibición parcial, por lo que se considera que es posible que exista alguna bacteriocina, que se demuestra por la persistencia de la inhibición en contra de este patógeno.

La cepa BA-18 presentó inhibición apreciable en contra de *Listeria monocytogenes* solamente en el control, por lo que se considera que los mecanismos de inhibición fueron debidos al pH y a la producción de peróxido de hidrógeno. En el caso de *Staphylococcus aureus*, la inhibición positiva se observó en el control, en el pH ajustado la inhibición fue apreciable, con el tratamiento de catalasa, no hubo inhibición, considerándose que el factor inhibidor, fue el peróxido de hidrógeno. En el *Streptococcus* grupo beta hemolítico, es probable la existencia de una bacteriocina, por la persistencia de la inhibición.

La cepa BA-19 mostró actividad antagonica positiva sólo en contra de *Staphylococcus aureus* en el control, en el pH ajustado y en presencia de la enzima catalasa, para inhibir al peróxido de hidrógeno, la inhibición fue apreciable, se considera, que es probable la presencia de una bacteriocina.

De las cepas, de las que se obtuvo el sobrenadante y que mostraron una inhibición positiva, aún con el ajuste de pH y de la acción de la catalasa sobre el peróxido de hidrógeno, únicamente se seleccionaron tres, ello debido a que presentaron una inhibición más definida que en las demás, correspondiendo a las cepas BA-1, BA-20 y BA-21 en contra de *L. monocytogenes*. Éstas se probaron nuevamente, ajustando el pH y exponiendo los sobrenadantes a la acción de enzimas proteolíticas, resultando ser cepas bacteriocinogénicas, se pudo corroborar que su efecto antagonico desapareció por la actividad enzimática, al probarse en contra de los patógenos indicadores, como se puede observar en la [tabla 5](#).

Tabla 5. Determinación de la naturaleza proteica de la sustancia inhibidora en los sobrenadantes de BAL en contra de *L. monocytogenes*.

Cepa	Control	pH	Catalasa	1	2	3
BA- 1	+	+	+	-	-	-
BA-20	+	+	+	-	-	-
BA-21	+	+	+	-	-	-

1= Alfa quimiotripsina; 2= Proteinasa K; 3= Proteasa

Los resultados obtenidos del presente estudio, fueron debidos al efecto del pH sobre los patógenos indicadores, como el principal inhibidor. La actividad antagonica, provocada aún por los efectos del pH ajustado y de la enzima catalasa, permitió observar que existió una sustancia inhibidora, diferente a la acumulación de ácido láctico, o a la presencia de peróxido de hidrógeno respectivamente. Finalmente, se demostró la presencia de las bacteriocinas al exponer el sobrenadante a la acción de las enzimas proteolíticas, manifestándose por la desaparición de la actividad antagonica.

DISCUSIÓN

Las BAL se han utilizado en la alimentación desde hace mucho tiempo, es posible encontrarlas en diferentes alimentos, en la leche y sus derivados como en el jocoque y yogurt, en quesos frescos y madurados; también, es posible aislarlas de carnes y sus productos y en algunas hortalizas. Metchnikoff, investigador del siglo XIX, relacionó el efecto benéfico sobre la salud humana, con el consumo de leche fermentada que contenía cierto tipo de bacilos (1) op. cit.

En el presente estudio, se aislaron BAL a partir de quesos frescos por considerar que es una fuente importante por el proceso de fermentación de estos productos, como se pudo corroborar al aislar 350 cepas de 35 muestras de quesos.

Los factores de antagonismo probados en el presente estudio, fueron el pH, el peróxido de hidrógeno y la producción de bacteriocinas. Se considera que la reducción en el pH es el principal efecto inhibidor debido a la producción de ácidos orgánicos de acuerdo a lo señalado por Carrasco y col. (2002) (4) op. cit. Los resultados obtenidos en este trabajo, coinciden con los autores mencionados, de las 25 cepas aisladas que

presentaron actividad antagonica, sólo ocho mostraron un efecto diferente, después de ajustar el pH en 6.5 para todos los tratamientos.

La Inhibición de microorganismos ha sido atribuida; además, a la acumulación de los productos finales de la fermentación, como son: el ácido láctico, el dióxido de carbono, el peróxido de hidrógeno y a la producción de bacteriocinas de acuerdo a lo señalado por Lindgren y Dobrogoy (1990) (3) op. cit. Los resultados de este trabajo muestran que después de exponer los sobrenadantes a la enzima catalasa para inhibir el peróxido de hidrógeno, permitió su identificación como la causa de inhibición de los microorganismos indicadores, encontrando sólo tres de los sobrenadantes de las cepas de BAL que continuaron mostrando actividad antagonica después de ajustar el pH y exponer los sobrenadantes a la acción de la catalasa, sugiriendo ampliamente la presencia de otras sustancias responsables de la inhibición, posiblemente bacteriocinas, las cuales fueron identificadas posteriormente al exponer los sobrenadantes a la acción de enzimas proteolíticas.

De acuerdo a los resultados observados, la actividad antagonica de las BAL, se manifestó en contra de las bacterias Gram+ *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* grupo beta hemolítico, el microorganismo Gram- fue *Salmonella agona*, no se observó inhibición en su desarrollo, en donde se pudo corroborar que las BAL actúan preferentemente en contra de bacterias Gram+, como afirma Klaenhamer (1998) (13) op. cit.

También se encontró, que la presencia de las BAL es necesaria para inhibir a los patógenos indicadores en este estudio, al probar los sobrenadantes libres de BAL, el efecto antagonico no se manifestó, este efecto se puede atribuir a la capacidad de las BAL para adaptarse al medio y/o a la presencia de dióxido de carbono, no permitiendo el desarrollo de otros microorganismos, como lo señalan Lindgren y Dobrogoy (1990) (3) op. cit.

Las perspectivas para la aplicación de las BAL o de la producción de bacteriocinas en la industria de los alimentos son prometedoras, debido al interés de utilizar conservadores biológicos como lo demandan los consumidores y por el interés de los industriales de emplear estas sustancias como una biotecnología relativamente económica, factible de aplicarse a diversos alimentos que requieren de procesos de fermentación, al reconocer que es necesario apoyar más investigaciones para superar los problemas de tipo legal, para su aplicación.

Ennar y col. (1996), (24) op. cit. aislaron 1962 cepas de BAL a partir de 362 muestras de queso tipo "Munster", El sobrenadante se probó en contra de diferentes bacterias Gram+ (*Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus sp*, *Enterococcus sp*, *Micrococcus sp*, *Staphylococcus sp* y *Bacillus sp*) y Gram- (*Salmonella sp*, *Pseudomona sp*, y *E. coli*), inhibiendo el crecimiento de las Gram+ y no a las Gram-.

Observando que los efectos antagonicos en contra de *L. monocytogenes*, en la mayoría de los casos fue debido a la disminución en el pH, por la producción de ácidos orgánicos. Sólo seis de los sobrenadantes de cultivos, (tres *Lactobacillus*, dos *Enterococcus* y un *Lactobacillus*) presentaron actividad en contra de *L. monocytogenes* por la acción de sustancias antibacterianas diferentes a los ácidos orgánicos.

La capacidad antagonica del extracto no fue inactivado en presencia de catalasa, excluyendo que la inhibición fuera producida por la presencia de peróxido de hidrógeno; sin embargo, el extracto fue

inactivado por las enzimas proteolíticas pepsina, tripsina, alfa quimiotripsina, determinando que la sustancia inhibidora es de naturaleza proteica y no fue inactivada en presencia de alfa amilasa y lipasa, determinando que la inhibición no se debe a la acción de carbohidratos o lípidos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, son similares a los señalamientos de los obtenidos por Ennhar y col. (1996), (24) op. cit. de las 25 cepas aisladas que mostraron actividad antagónica en contra de los microorganismos patógenos indicadores, sólo ocho mostraron inhibición diferente al pH y a la acumulación de peróxido de hidrógeno. También en el presente estudio los sobrenadantes de las BAL, fueron inactivados por la acción de enzimas proteolíticas, lo que permite considerar que el factor inhibidor, es de naturaleza proteica.

Referencias

- 1.- Mateos, J.A. (2002). Aspectos Básicos de la Tecnología de las Leches Fermentadas. En Alimentos Funcionales. Probióticos. [R.M. Ortega, A. Marcos, J. Aranceta, J.A. Mateos, A.M. Requejo, L. Serra.] Ed. Médica Panamericana. Cap. 6.
- 2.- Torres, V.R. (1999). Flora Intestinal, Probióticos y Salud. Ed. Gráfica Nueva. México.
- 3.- Lindgren, S.E. and Dobrogoz, W.J. (1990). Antagonic activities of Lactic Acid Bacteria in Food and Feed Fermentation. FEMS. Microbiol. Rev. 87, 149-164.
- 4.- Carrasco, M.S., Scarincini, H.E. and Simonetta, A.C. (2002). Antibacterial Activity of Lactic Acid bacteria Isolated from Argentinian Dairy Products. The Australian Journal of Dairy Technology. Vol. 57. No. 1, 15-19.
- 5.- Campos, J.A. (2002). Cultivos Probióticos y Protectores, Propiedades Funcionales (Nutraceuticas) de Valor Agregado en los Derivados Lácteos. Lácteos y Cárnicos Mexicanos. Jun/Jul 26-37.
- 6.- Nes, I.F. and Jhonsborg, O. (2004). Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. Curr. Opin. Biotechnol. 15, 100-104.
- 7.- Vanderbergh, P.A. (1993). BAL Their Metabolic Products and Interference with Microbial Growth. FEMS. Microbiol. Rev. 12: 221-237.
- 8.- Stiles, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. 70: 331-345.
- 9.- Hoover, D.G. and Stenson, L.R. (1993). Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Academic Press Inc. USA.
- 10.- Cleveland, J. Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation. International Journal of Food Microbiology. 71: 1-20
- 11.- Luders, T., Birkemo, G.A., Fimland, G., Nissen-Meyer, J. and Nes, I.F. (2003). Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 69, 1797-1799.
- 12.- Masschalck, B., Deckers, D. and Michiels, C.W. (2003). Sensitization of outer- membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Pseudomona aeruginosa* to antimicrobial peptides under high pressure. J. Food Prot. 66, 1360-1367.
- 13.- Klenhamer, T.R. (1988). Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Biochimic. 70: 337-349.
- 14.- Sablon, E.B., Contreras and Vandame, E. (2000). Antimicrobial peptides of Lactic Acid Bacteria: mode of action, Genetic and Biosynthesis. In advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. [Th. Scheper] Springer-Verlag.
- 15.- Klenhamer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. FEMS. Microbiol. Rev, 12: 39-86.
- 16.- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.I., Eijsink, V. and Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. 70 (2) 113-128.
- 17.- Xie, L. and van der Donk, W. A. (2004). Post-translational modifications during lantibiotic biosynthesis. Curr. Opin. Chem. Biol. 8, 498-507.
- 18.- Pag, U. and Sahl, H.G. (2002). Multiple activities in lantibiotics – models for design of novel antibiotics? Curr. Pharm. Des. 8, 815-833.
- 19.- Diep, D.B. and Nes, I.F. (2002). Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. Curr. Drug Target. 3, 107-122.
- 20.- van Belkum, M.J. and Stiles, M.E. (2000). Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. Nat. Prod. Rep. 17, 323-335.

- [21.](#)- Cox, C.R., Coburn, P.S. and Gilmore, M.S. (2005). Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. *Curr. Protein Pept. Sci.* 6, 77-84.
- [22.](#)- Ramnath, M., Arous, S., Gravesen, A., Hastings, J.W. and Hechard, Y. (2004). Expression of *mptC* of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Microbiology.* 150, 2663-2668.
- [23.](#)- Kawai, Y., Kemperman, R., Kok, J. and Saito, T. (2004). Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2906-2911.
- [24.](#)- Ennahar, S., Aoude-Wermer, D., Sorokine, O., Van Dorseelaer, A., Bringel, F., Hubert, J.C. and Haseselman, C. (1996). Production of Pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 Isolated From Cheese. *Applied and Environmental Microbiology.* Dec. P4381-4387. American Society for Microbiology.
- [25.](#)- Ennahar, S., Assobhel, S. and Hasselmann, C. (1998). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a Smear-Surface Soft Cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 a Pediocin AcH producer. *Journal of Food Protection.* 61: 186-191.
- [26.](#)- Wan, J., Harkmark, K., Davidson, B.E., Hillier, A.J., Gordon, J.B., Wilcock, A., Hickey, M.W., Coventry, M. J. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by piscicolin 126 in milk and Camembert cheese manufactured with a thermophilic starter. *Journal of Applied Microbiology.* 82 (3) 273-280.
- [27.](#)- Mcauliffe, O., Hill, C., Ross, R.P. (1999). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cotage cheese manufactured with a lactacin 3147- producing starter culture. *Journal of Applied Microbiology.* 86 (2) pp 251-256.
- [28.](#)- Lauková, A., Czikková, S. (1999). The use of enterocin CCM4231 in soy milk to control the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology.* 87 (1) pp 182-186.
- [29.](#)- Davidson, CH.M. and Cronin, F. (1973). Medium for the Selective Enumeration of Lactic Acid Bacteria from Foods. *Applied Microbiology.* American Society for Microbiology. Sept 1973. 439-440.
- [30.](#)- Galliano, V.J. and Hinsdill. (1970). Characterization of a *Staphylococcus aureus* bacteriocin. *J. Bacteriol.* 104: 17-125.
- [31.](#)- Gratia, A. (1946). Techniques Selectives Pour la Recherche Systematique des Germes Antibiotiques. *C.R. Seances Soc. Biol. Paris.* 140: 1053-1055.