



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**Aislamiento de bacterias
lácticas de alimentos
vegetales no fermentados:
producción de sustancias
antimicrobianas**

Alumno: Lourdes López Ruiz

Junio, 2015



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN BIOLOGÍA
Trabajo Fin de Grado

Aislamiento de bacterias lácticas de alimentos vegetales no fermentados: producción de sustancias antimicrobianas

Lourdes López Ruiz

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'L. López', enclosed within a circular blue ink stamp.

Jaén. Junio, 2015

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. Hierbas aromáticas.....	5
2.2. Bacterias lácticas.....	9
2.3. Sustancias antimicrobianas producidas por las BAL.....	11
2.4. Bacteriocinas.....	12
2.5. Efectividad de las bacteriocinas en los sistemas alimentarios.....	14
3. OBJETIVOS.....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4.1. Material biológico.....	18
4.2. Material de laboratorio.....	18
4.3. Medios de cultivo.....	19
4.4. Procesado de los alimentos.....	22
4.5. Recuentos bacterianos.....	22
4.6. Aislamiento y selección de bacterias lácticas de hierbas aromáticas....	22
4.7. Tinción de Gram.....	23
4.8. Producción de bacteriocinas.....	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
5.1. Recuento y selección de bacterias lácticas.....	25
5.2. Identificación de las bacterias lácticas seleccionadas.....	27
5.3. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas.....	32
6. CONCLUSIONES.....	40
7. BIBLIOGRAFIA.....	41

1. RESUMEN

La capacidad de las bacterias ácido lácticas (BAL) para producir sustancias antimicrobianas ha sido utilizada históricamente para conservar los alimentos, y debido a varias de sus propiedades metabólicas, han despertado gran atención al ser empleadas en la industria farmacéutica y alimentaria, especialmente para la obtención de ácido láctico y bacteriocinas. Actualmente, las bacteriocinas son utilizadas en una amplia categoría de alimentos, incluyendo cárnicos, lácteos, productos enlatados, vegetales y bebidas como cerveza y vino. Sus características de compatibilidad en dichos productos, así como su modo de acción, hacen atractivo su uso en los alimentos.

En este proyecto se han aislado un número de presuntas bacterias lácticas presentes en diferentes muestras de hierbas aromáticas y posteriormente, se ha ensayado la producción de sustancias antimicrobianas por dichas cepas, para comprobar si esas sustancias son o no de tipo bacteriocina.

Abstract

The ability of lactic acid bacteria (LAB) to produce antimicrobial substances has historically long been used to preserve foods, and due to several of its metabolic properties, they have aroused great attention to be employed in the pharmaceutical and food industries, especially for getting of lactic acid and bacteriocins. At present, bacteriocins are used in different foods, including meat, dairy products, canned foods, vegetables and beverages such as beer and wine. Their characteristics of compatibility in these products and their mode of action make them attractive to be used in foods.

In this project, a number of presumed lactic bacteria have been isolated in different samples of aromatic herbs, and subsequently, the antimicrobial substances production by these strains has been tested, to confirm if these substances are bacteriocin-type or not.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Hierbas aromáticas

Las plantas han sido utilizadas durante miles de años en muchas partes del mundo por sus propiedades nutritivas y medicinales (Simental y Avila, 1999). Existe información sobre las propiedades funcionales, medicinales y/o toxicológicas de las plantas, pues en los últimos años se ha estudiado el efecto en la salud de los posibles compuestos bioactivos presentes en ellas (Shahidi *et al.* 1992). La velocidad de deterioro microbiano en alimentos no solo depende de los microorganismos presentes, sino también de la composición química del producto y de la carga microbiana inicial. Los antimicrobianos son compuestos químicos añadidos o presentes en los alimentos que retardan el crecimiento microbiano o inactivan a los microorganismos y por lo tanto detienen el deterioro de la calidad y mantienen la seguridad del alimento (Baltazar, 2003). Generalmente los aceites esenciales poseen notables propiedades antimicrobianas. En la actualidad, la mayoría de los estudios realizados sobre las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales se ha centrado en microorganismos patógenos para el hombre, así como en aquellos presentes en los alimentos, ya sea por su implicancia en toxiinfecciones alimenticias o por su capacidad para alterar las propiedades organolépticas y de conservación de los alimentos.

2.1.1. Tipos de hierbas aromáticas

En este trabajo se han empleado un total de 8 tipos de hierbas aromáticas, las cuales poseen unas características especiales gracias a los aceites esenciales que contienen como antimicrobianos naturales.

2.1.1.1. Tomillo

El tomillo (*Thymus vulgaris*) es una especie aromática perteneciente a la familia *Lamiaceae* y conocido desde hace siglos por su excelente aroma, convirtiéndose en uno de las principales especies aromáticas naturales de la cocina mediterránea. El aceite esencial de tomillo está compuesto por carvacrol y timol, además posee p–

cimeno, p–terpineno, linalol, borneol, geraniol y cariofileno (Baranauskiene *et al.*, 2003; Naghdi *et al.*, 2004), que le confieren olores, sabores y propiedades químicas que sitúan al tomillo como una planta muy cotizada en la industria alimenticia, farmacéutica, perfumería y cosmética (Muñoz, 2000). El tomillo además destaca por su acción antiespasmódica, antimicrobiana, antifúngica y propiedades antioxidantes (Van Den Broucke y Lemli, 1981; Paster *et al.*, 1995; Hammer *et al.*, 1999) gracias a su aceite esencial. Numerosos estudios demostraron que el aceite esencial de tomillo es uno de los aceites esenciales más potente en relación con propiedades antimicrobianas (Manou *et al.*, 1998). El timol y el carvacrol fueron algunos de los componentes más activos contra múltiples patógenos transmitidos por los alimentos. Lambert *et al.*, (2001), observaron que el carvacrol y el timol actuaban de forma diferente frente a microorganismos Gram positivos y negativos. El carvacrol y el timol aumentan la permeabilidad de la membrana celular desintegrando la membrana externa de las bacterias Gram negativas, liberando lipopolisacáridos (LPS) y aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática a ATP.

2.1.1.2. Romero

El romero (*Rosmarinus officinalis*) perteneciente a la familia *Lamiaceae*, ha sido utilizado desde la antigüedad como planta medicinal y para la obtención de aceites esenciales (Albandar y Rams, 2000). El aceite esencial de romero es el componente más estudiado y en cuya composición química se ha identificado la presencia de α -pineno, β -pineno, canfeno, ésteres terpénicos como el linalol, carnosol, rosmanol; los ácidos vanílico, caféico, clorogénico, rosmarínico, carnósico, oleanólico, butilínico, entre otros (Ruiz 2000, Almela 2006, Montes de Oca 2010, Tschinggeri y Bucar 2010). El aceite esencial del romero presentó actividad en bacterias de la cavidad oral (Takarada *et al.*, 2004) y en bacterias del tracto gastrointestinal (Volcão *et al.*, 2011). El extracto de hoja de *R. officinalis* afecta a la membrana celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp* y *S. aureus* (Miresmailli 2006) destacan por ser susceptibles a los componentes del extracto de romero, en cuyo extracto prevalecen el ácido caféico, ácido rosmarínico, carnosol, ácido carnosólico y flavonoides (Centeno y Calva 2010). Rozman y Jersek (2009) estudiaron la actividad

antimicrobiana del extracto del romero con una concentración variable de ácido carnósico en diferentes cepas de *L. monocytogenes*, dicho experimento demostró la eficacia del extracto de romero al inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*.

2.1.1.3. Hierbabuena

La hierbabuena (*Mentha spicata* L.) es una hierba aromática muy empleada en gastronomía y perfume por su aroma intenso y fresco. Su aceite esencial contiene mentol (50-86 %), mentona, felandreno y limoneno, y es un principio activo fundamental de la planta. Así, la hierbabuena posee propiedades antiespasmódicas y carminativas sobre el sistema digestivo, antiséptico y antiinflamatorio sobre el sistema respiratorio, y antisépticas sobre la piel y mucosas. Otras propiedades que se le atribuyen son: estimulante, cardiovascular, antidismenorreica y antihipocondríaca.

2.1.1.4. Hinojo

El hinojo (*Foeniculum vulgare*) es una planta aromática perteneciente a la familia de las Apiáceas; es usado para aromatizar salsas, ensaladas, pescados y carnes, además de en cosméticos. También posee propiedades para la salud, como antiespasmódicas, emenagogas y antisépticas del aparato génitourinario (Fitomed, 1991). Las semillas contienen un 8% de aceite volátil (anetol y fenchona), flavonoides, cumarinas y esteroides. Entre los flavonoides presentes en el hinojo, los más representados son la queratina 3-glucurónido, la isoquercitrina, el kempferol 3-glucurónido y la isoramnetina glucósido (Kunzemann y Herrmann, 1977). El aceite de hinojo inhibe el crecimiento de microorganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Candida albicans* (Hammer et al., 1999).

2.1.1.5. Cardillo

El cardillo (*Scolymus hispanicus*) es una planta herbácea anual de la familia de las Asteraceae, de hojas comestibles, que crece en estado silvestre. Gracias al uso de las plantas silvestres comestibles, muchos habitantes no pasaron hambre durante

los largos períodos de sequía de alimentos (Grivetti, 2006) o periodos de hambruna. El uso de plantas silvestres tiene una influencia positiva para la salud, tanto por las propiedades medicinales como por sus cualidades nutritivas.

2.1.1.6. Laurel

El laurel (*Laurus nobilis*) es un árbol de hoja perenne perteneciente a la familia de las lauráceas. Ejerce acción bacteriostática y regeneradora de la piel (Plantas medicinales, 2010). Además es usado como estimulante del aparato digestivo, expectorante bronquial, antirreumático y diurético, y su uso externo se emplea en afecciones de la piel causadas por hongos. Las hojas secas y su aceite esencial son usados extensivamente en la alimentación como conservante debido a sus propiedades antimicrobianas e insecticidas (Hammer *et al.*, 1999 y Saim y Meloan, 1986). El aceite del laurel tiene un amplio espectro antimicrobiano y es útil en la industria cosmética. El compuesto más abundante en el laurel es cineol, también llamado eucaliptol. Las hojas contienen alrededor de 1,3% de aceites esenciales que consiste en 45% de eucaliptol, 12% de otros terpenos, sesquiterpenos 3-4%, 3% metileugenol y otros α -y β -pinenos, felandreno, linalol, geraniol y terpineol. El cineol se conoce por su efecto frente a una gran variedad de microorganismos y hongos (Olivera *et al.*, 2007).

2.1.1.7. Perejil

El perejil (*Petroselinum crispum*) es una hierba aromática perteneciente a la familia *Apiaceae*. Las hierbas aromáticas, entre ellas el perejil, tienen gran cantidad de compuestos fitoquímicos que impiden que las células sanas se vuelvan cancerosas (Muñiz *et al.*, 2010). Se usa con fines terapéuticos y además por su contenido de aceite esencial, el cual le da un aroma característico. Los componentes característicos del perejil son flavonoides (apíina, luteolina, apigenina y algunos glucósidos), aceite esencial (apiol y miristicina), cumarinas (bergapteno, imperatorina, xantotoxina, trioxaleno y angelicina), así como vitaminas A, C y E, (Moazedi *et al.*, 2007 y Fonnegra y Jiménez, 2007). Actualmente es utilizado como condimento en diversos tipos de alimentos y como ingrediente activo en farmacología (Grüner *et al.*, 2008).

2.1.1.8. *Lavanda*

La lavanda, perteneciente a la familia *Lamiaceae*, es una planta aromática que se cultiva principalmente por su aceite esencial, el cual es demandado en mayor medida por la industria del perfume y cosmética, y en menor por la alimenticia, farmacéutica y aromaterapia (Kubota *et al.*, 2010). El aceite esencial de lavanda es uno de los más recomendados para tratar un amplio número de dolencias, incluyendo estrés, ansiedad, depresión fatiga e hipertensión (Curtis, 2006). Se ha demostrado la actividad biológica de lavanda frente a *Esclerichia coli*, *Salmonella*, *Estafilococos*, *Shigella* y *Giardas* (Hüsnü y Buchbauer, 2009).

2.2. Bacterias lácticas

2.2.1. Características generales

El término bacterias lácticas engloba a un grupo heterogéneo de microorganismos procariotas cuya característica definitoria es la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares. Probablemente este grupo de bacterias sea el más abundante y más difundido en la naturaleza, pues se han identificado en diversas fuentes, tales como la leche y productos lácteos, carne, vegetales, tracto gastrointestinal y urinario de mamíferos. Por tanto, las bacterias lácticas tienen diversas aplicaciones, pues participan en la fermentación de alimentos como la leche, carne y vegetales para obtener productos como quesos, yogurt, embutidos, ensilados, encurtidos, etc. Y además son de gran utilidad en la producción de vinos y cerveza. También se encuentran en ambientes de elevadas temperaturas, de altas concentraciones de cloruro sódico, en sustratos de origen animal de un pH neutro, así como en elevada acidez en sustratos de origen vegetal (Carr, 1973).

Estos microorganismos requieren para su multiplicación de azúcares como glucosa y lactosa, aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento. Se sabe que la leche es el medio típico para la proliferación de las BAL, pero también hay otros alimentos que pueden ser excelentes medios de crecimiento y producción de metabolitos de bacterias lácticas, como pueden ser las masas de cereales, los vegetales y la carne (Vázquez *et al.*, 2009). Además de los requerimientos

nutricionales, la temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en el crecimiento de las BAL (Guerra *et al.*, 2001).

En general, las BAL son cocos o bacilos Gram-positivos, no esporulados, anaeróbicos, inmóviles, microaerófilos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y bencidina negativas, carecen de porfirinas y citocromos, no reductores de los nitratos y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Carr *et al.*, 2002; Vázquez *et al.*, 2009). Son de longitud variable y de un grosor de 0.5-0.8 μm . Además, las BAL son ácido tolerantes, pudiendo crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3.2 y otras a valores tan altos como 9.6 (la mayoría crecen a pH entre 4 y 4.5) (Carr *et al.*, 2002). El ácido láctico producido como por las BAL como producto final de su metabolismo, además de no ser tóxico para el hombre y de poseer sabor agradable, influye en el pH del medio, reduciéndolo e impidiendo el desarrollo de microorganismos perjudiciales (Carr, 1973). Además de esto, las BAL mejoran las características sensoriales de los alimentos, como su sabor, olor, textura y aumentan su calidad nutritiva.

2.2.2. Clasificación

La clasificación de las BAL es basada en principio en la morfología, modo de fermentación de la glucosa y el crecimiento a diferentes temperaturas (Axelsson, 1998; Carr *et al.*, 2002). El grupo de bacterias lácticas está formado por bacterias con morfología muy diversa, entre las que se incluyen aquellas con forma de coco, como las especies pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Atopobium*, y aquellas con forma bacilar de los géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium* (Stiles y Holzapfel, 1997).

De acuerdo con los productos finales de la fermentación de la glucosa, las BAL se han dividido en dos grandes grupos:

- El **homofermentativo**, que produce ácido láctico como único producto de fermentación (Michael *et al.*, 2009). El grupo homofermentativo está compuesto

de *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* (Almanza et al., 1991).

- El **heterofermentativo**, genera otros productos además del lactato, principalmente etanol y CO₂. Este grupo está compuesto de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillos*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Almanza et al., 1991).

Las BAL también se clasifican según la temperatura ideal de crecimiento en:

- **Mesófilas:** temperatura ideal de incubación: 20-25 °C, tiempo de incubación: 18-20 horas, acidez final 0.8% de ácido láctico. Utilización: kumis, quesos semi-madurados (Blanco et al., 2006).
- **Termófilas:** temperatura ideal de incubación: 40-45 °C, tiempo de incubación: 2-4 horas, acidez final 0.9% de ácido láctico. Utilizaciones: yogurt y quesos madurados (Blanco et al., 2006).

2.3. Sustancias antimicrobianas producidas por las BAL.

Las BAL son capaces de liberar al medio diversos tipos de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano. Esto incluye muchos ácidos orgánicos tales como el láctico, el acético y el propiónico, que provocan un ambiente desfavorable para el crecimiento de muchos microorganismos patógenos o implicados en la putrefacción de los alimentos. Los ácidos tienen un modo de acción muy variado, inhiben tanto a bacterias Gram-positivas como a Gram-negativas, así como a levaduras y mohos. Además de los ácidos, se pueden producir otros metabolitos antimicrobianos tales como etanol, de la ruta heterofermentativa, H₂O₂ producida durante el crecimiento aerobio y diacetilo que es generado a partir del exceso del piruvato (Ray y Daeschel, 1992). La acumulación de H₂O₂ en los medios de cultivo se debe a que las BAL no poseen catalasa (Kandler y Weiss, 1986) y puede reaccionar con otros componentes para formar sustancias inhibidoras. El diacetilo es bacteriostático frente a las bacterias Gram-positivas y bactericida frente a las Gram-negativas, sin embargo la pequeña cantidad de este compuesto producido por las BAL, y su potencial mutagénico, dificultan su utilización en la industria alimentaria (Jay, 1982; Piard y Desmazeaud, 1991). Además de lo mencionado, existen otros agentes inespecíficos

como el amoníaco, resultantes también del metabolismo microbiano, y aquellos otros más específicos como toxinas, enzimas líticas, bacteriófagos, antibióticos y bacteriocinas. El estudio de estas últimas ha despertado gran interés en la comunidad científica en los últimos años debido a su amplia distribución entre las bacterias, a su diversidad y a su empleo como conservantes en la industria de alimentos (Delves-Broughton, 1990).

2.4. Bacteriocinas

Las bacteriocinas se definen como sustancias proteicas antimicrobianas producidas por un gran número de especies bacterianas (Tagg *et al.*, 1975). La capacidad para producir bacteriocinas está ampliamente extendida, tanto entre las bacterias Gram-positivas como en las Gram-negativas (Gálvez *et al.*, 1991a). En bacterias Gram-positivas se han realizado numerosos estudios sobre este tipo de sustancias (Jack *et al.*, 1995), aunque quizás las mejor conocidas sean las producidas por las BAL por su prometedor uso como bioconservantes de alimentos (Stiles y Hasting, 1991; Ray y Daeschel, 1992; Hernández *et al.*, 1993; Jack *et al.*, 1995; Cleveland *et al.*, 2001). Las bacteriocinas, al ser producidas por microorganismos considerados beneficiosos para la salud, han despertado la atención como sustituto potencial de compuestos preservantes. Estos compuestos pueden ser utilizados como biopreservantes en alimentos para la reducción o eliminación de ciertos microorganismos de deterioro y algunos patógenos como *Listeria monocytogenes* (Joerger, 2003; Ogunbanwo *et al.*, 2003).

Generalmente las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son termorresistentes, lo que les permite mantener su actividad antimicrobiana a temperaturas similares a las de pasteurización y esterilización de la leche (Piard *et al.*, 1992).

2.4.1. Clasificación de las bacteriocinas

Las bacteriocinas se clasifican en tres grupos, según sus características estructurales (Klaenhammer, 1993; Nes *et al.*, 1996; Van Belkum y Stiles, 2000; Nes y Holo, 2001; McAuliffe *et al.*, 2001):

Clase I.- Lantibióticos. Incluye moléculas de naturaleza peptídica de pequeño tamaño (<5 kDa), termoestables, que contienen aminoácidos modificados (Sahl *et al.*, 1995). La más conocida es la nisina, producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Rogers, 1928).

Clase II.- Pequeños péptidos no-lantibióticos (<10 kDa). Termoestables. Esta clase de bacteriocinas ha sido encontrada tanto en bacterias Gram-positivas como en *E. coli* (Håvarstein *et al.*, 1994).

Clase III.- Grandes proteínas (>30 kDa) termolábiles. Se trata de bacteriocinas complejas en cuanto a su actividad bactericida y/o su estructura proteica. Como ejemplo citaremos la helveticina J producida por una cepa de *Lactobacillus helveticus*, la enterolisina A y la bacteriocina Bc-48, producidas ambas por cepas de *E. faecalis*.

2.4.2. Modo de acción de las bacteriocinas

Las bacteriocinas son moléculas cargadas positivamente, con algunas regiones hidrofóbicas. Para la unión inicial son importantes las interacciones electroestáticas con los grupos fosfato de las membranas de las células diana, que están cargados negativamente (Chen *et al.*, 1997a, b). Tagg y col, (1976) señalan que la acción de las bacteriocinas sobre las células sensibles ocurre en dos etapas. En la primera fase, la bacteriocina se adsorbe en receptores específicos y no específicos de la célula hospedadora. En una segunda fase, ésta ya irreversible, la bacteriocina origina alteraciones en las células sensibles.

En lugar de que la formación de los poros ocurra indiscriminadamente, parece ser que existen moléculas receptoras que actúan como puntos de ataque, facilitando la concentración localizada de la bacteriocina e incrementando de esta forma la efectividad de la misma. Este mecanismo ha sido claramente demostrado para la nisina y la mersacidina, que usan ambas el lípido II, un precursor del peptidoglicano, como molécula de ataque (Breukin *et al.*, 1999; Brotz *et al.*, 1998 a, b). La mersacidina inhibe la síntesis del peptidoglicano, mientras que el modo de acción primario de la nisina es la formación de poros dando lugar a la pérdida de material celular.

De las dos bacteriocinas mejor conocidas, la nisina se sabe que actúa como despolarizante de las membranas bacterianas energizadas, produciendo poros en la

membrana lipídica (Sahl *et al.*, 1987). La lactocina A actúa como la nisina al aumentar la permeabilidad de la membrana citoplasmática y disipar el potencial de membrana de las células sensibles (Van Belkum *et al.*, 1991).

2.4.3. Mecanismos de resistencia

Aunque las bacteriocinas no son antibióticos, preocupa el hecho de que la exposición a las bacteriocinas dé lugar a células con una mayor resistencia a los antibióticos. Puesto que los antibióticos y las bacteriocinas tienen diferentes modos de acción, se ha demostrado que la exposición a la nisina no tiene ningún efecto en la frecuencia de aparición de resistencias de *L. monocytogenes* Scott A a ampicilina y a cloranfenicol (Tchikindas *et al.*, 2000). En otro estudio, varias bacterias resistentes a múltiples drogas fueron tratadas con hasta 400 IU/ml de nisina, manteniéndose todos estos organismos sensibles a la nisina (Severina *et al.*, 1998). La resistencia a antibióticos se asocia usualmente con un determinante genético que facilita la transferencia de esta resistencia entre células, cepas y especies. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre con la mayoría de las resistencias a antibióticos, la resistencia a bacteriocinas proviene de un cambio fisiológico en la membrana de la célula diana (Crandall y Montville, 1998; Mazzotta *et al.*, 1997; Ming y Daeschel, 1993). En el caso de *L. monocytogenes*, una membrana más rígida, da lugar a una mayor tolerancia a la nisina (Mazzotta *et al.*, 1997). Según Ming y Daeschel (1993) una cepa de *L. monocytogenes* resistente a la nisina tiene cantidades reducidas de fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol y bisfosfatidilglicerolfosfato. La modificación de los componentes lipídicos de la membrana celular debe ser, sin duda, una de las formas más eficaces de desarrollar resistencia a las bacteriocinas.

2.5. Efectividad de las bacteriocinas en los sistemas alimentarios.

Investigadores han explorado el uso de razas productoras de bacteriocinas como cultivos iniciadores, tales como *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* y *Enterococcus faecalis* (Campanini *et al.*, 1993; Nuñez *et al.*, 1997). Nuñez *et al.* (1997) encontraron que los recuentos de *L. monocytogenes* Ohio en queso manchego inoculado con una cepa de *E. faecalis* productora de bacteriocinas

disminuyeron seis órdenes de magnitud en siete días, mientras que la supervivencia del organismo en queso hecho con el cultivo iniciador comercial no se vio afectada. Similarmente, la supervivencia de *L. monocytogenes* en un salami contaminado disminuyó cuando el producto fue inoculado con *Lactobacillus plantarum* MCS1 (Campanini *et al.*, 1993).

La bacteriocina más conocida del grupo I es la nisina, producida por especies de *Lactococcus lactis lactis*. Su aplicación ha sido muy estudiada y ya ha sido aceptada como preservante ante FDA-Codex Alimentarius. En productos lácteos como el queso Gouda y el Emmenthal, la nisina inhibe el crecimiento de esporas de *C. botulinum* (Wesselset *et al.*, 1998) por lo que fue aprobada como un aditivo alimentario en los Estados Unidos (US Food and Drug Administration 1988). En el queso tipo Cottage de larga duración inoculado con 10^4 ufc/g con *L. monocytogenes*, la adición de 2000 IU/g de nisina produjo una disminución de tres órdenes de magnitud en los recuentos de *L. monocytogenes* después de 7 días de almacenamiento a 20°C, (Ferreira y Lund, 1996).

La pediocina PA-1 también ha sido expresada en *Streptococcus thermophilus*, un organismo importante en fermentaciones lácteas (Coderre y Somkuti, 1999) y en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para mejorar la conservación del vino, pan y otros productos en los que se usan las levaduras (Schoeman *et al.*, 1999). El efecto de la pediocina PA-1 en el crecimiento de *L. monocytogenes* ha sido también estudiado en el queso tipo Cottage, en la nata líquida y en salsa hecha con queso (Pucci *et al.*, 1988). En este estudio, el recuento control de *L. monocytogenes* en la nata y en la salsa de queso aumentó casi cuatro órdenes de magnitud después de 7 días a 4°C (5.4×10^6 ufc/ml y 1.7×10^7 ufc/g respectivamente). Cuando se añadieron 100 AU/ml de pediocina, el recuento bajó hasta casi los límites de detección en la nata (10^2 ufc/ml) y fue cinco órdenes de magnitud más bajo que en el control en la salsa de queso.

Uno de los mejores ejemplos estudiados en carne es el uso de la nisina. Tradicionalmente, los nitratos se han usado para prevenir el crecimiento de *Clostridium botulinum* en carne; sin embargo, cuestiones de seguridad han impulsado a la industria alimentaria a buscar métodos alternativos de conservación. La nisina o su combinación con niveles menores de nitratos pueden prevenir el crecimiento de *Clostridium* (Rayman *et al.*, 1981, 1983) Los resultados más prometedores en carnes se obtuvieron usando pediocina PA-1, producida por *P.*

acidilactici, que reduce inmediatamente el número de organismos sensibles (Nielsen *et al.*, 1990).

En productos marítimos hay un alto riesgo de botulinum, por lo que el uso de bacteriocinas ha demostrado ser efectivo en productos como langosta en el control de *Listeria monocytogenes* (Delves-Broughton, 2006). En alimentos producidos a base de arroz es importante controlar la presencia de *Bacillus cereus*, bacteria capaz de producir desórdenes gastrointestinales.

3. OBJETIVOS

La capacidad para producir bacteriocinas está ampliamente extendida, tanto entre las bacterias Gram-positivas, como en Gram-negativas. Dentro de las bacterias Gram-positivas, las BAL son capaces de liberar al medio diversos tipos de sustancias capaces de inhibir el crecimiento microbiano. Por otro lado las plantas han sido utilizadas durante miles de años en muchas partes del mundo por sus propiedades nutritivas y medicinales, así como por poseer características especiales gracias a los aceites esenciales que contienen como antimicrobianos naturales.

Los objetivos principales planteados en este trabajo fueron los siguientes:

- 1º Obtener una colección representativa de diferentes hierbas aromáticas.
- 2º Aislar una colección de bacterias lácticas presentes en las diferentes muestras de hierbas aromáticas, haciendo uso de los diferentes métodos clásicos de detección y cuantificación de microorganismos en este tipo de muestras.
- 3º Realizar una identificación de la morfología de dichos microorganismos aislados.
- 4º Ensayar la capacidad de producción de sustancias antimicrobianas por dichas cepas frente a diferentes microorganismos.
- 5º Comprobar la capacidad de actividad antibacteriana de las diferentes hierbas aromáticas y comparar entre ellas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material biológico

Las bacterias lácticas utilizadas en la realización de este trabajo se aislaron de hierbas aromáticas de varios tipos: tomillo, romero, hierbabuena, hinojo, cardillo, laurel, perejil y lavanda. Algunas de estas hierbas fueron compradas en establecimientos al azar y otras procedían de cultivos caseros privados.

Los microorganismos indicadores empleados para evaluar la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas aisladas en hierbas aromáticas han sido *Listeria innocua* 4030 y *Enterococcus faecalis* S-47.

4.2. Material de laboratorio

- Placas de Petri.
- Bolsas de plástico estériles para pesar los alimentos
- Balanza electrónica
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Solución salina estéril al 0.9%
- Agua destilada
- Homogeneizador (Stomacher® 80 Biomaster, Seward Ltd.)
- Estufa de incubación a 37°C
- Centrífuga
- Tubos Eppendorf
- Tubos de ensayo de mayor y menor tamaño
- Gradillas
- Pinzas
- Torres de acero inoxidable
- Bastoncillos de algodón
- Mechero Bunsen
- Pinzas para tinciones
- Portaobjetos

- Asa de siembra
- Microscopio óptico
- Aceite de inmersión
- Baño termostático
- Agitador/mezclador (vortex)
- Pipeta de vidrio y pipeteador
- Asas acodadas o Asas de Digrafsky
- Matraces
- Autoclave
- Para tinción de Gram: cristal violeta, lugol, safranina, alcohol al 96%

4.3. Medios de cultivo

El medio de cultivo selectivo utilizado para la obtención de bacterias lácticas es el medio MRS (Fig.1), preparado según las instrucciones del fabricante. Las placas se preparan pesando y disolviendo en agua destilada, los medios se esterilizan por autoclavado a 115°C, se atemperan a 50°C y se vierten en placas Petri a razón de 15 ml por placa.

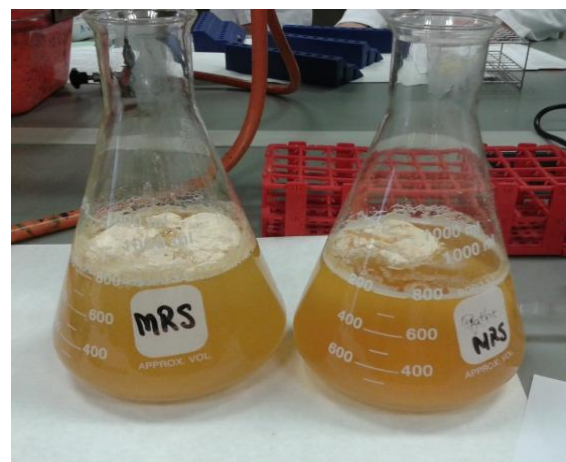
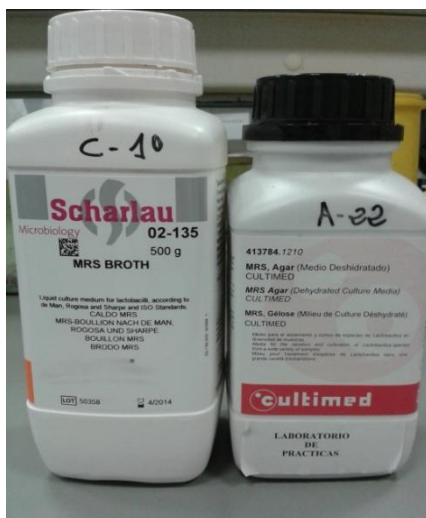


Figura 1. Medio de cultivo selectivo MRS.

4.3.1. MRS Agar

El Agar M.R.S. fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe para proveer un medio que pudiera evidenciar un buen crecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas.

Composición	g/l	Preparación
di-Amonio Hidrógeno Citrato	2.0	Suspender 62 g en 1000 mL de agua destilada y disolver. Calentar y agitar hasta ebullición. Esterilizar a 115°C durante 12 minutos. Dejar enfriar a 45-50°C y distribuir en placas de Petri estériles.
Extracto de carne	8.0	
Extracto de levadura	4.0	
D(+)-Glucosa	2.0	
Magnesio Sulfato	0.2	
Manganeso (II) Sulfato	0.05	
Peptona Bacteriológica	10.0	
di-Potasio Hidrógeno Fosfato	2.0	
Sodio Acetato	5.0	
Polisorbato 80	1.0	
Agar	10.0	
pH: 6.2±0.2		

Una vez autoclavado, con mucho cuidado y al lado del mechero Bunsen para evitar contaminación, se coge el matraz y se va echando como unos 10-15 ml por placa Petri (Fig.2), se cierra la tapa de ésta y movemos con cuidado para que el medio quede bien distribuido por toda la placa. Repetir este proceso con cada una de las placas.

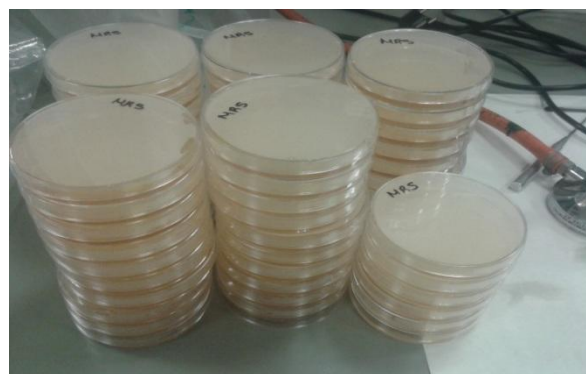


Figura 2. Placas de Petri preparadas con medio MRS.

4.3.2. MRS BROTH (para MRS líquido)

Composición	g/l	Preparación
Proteosa peptona	10.00	Disolver 52 g del polvo en
Extracto de carne	8.00	1 litro de agua destilada,
Extracto de levadura	4.00	hirviendo hasta su total
D(+)-Glucosa	20.00	disolución. Distribuir en
Acetato de sodio	5.00	recipientes adecuados.
Citrato de triamonio	2.00	Esterilizar al autoclave
Sulfato de magnesio	0.20	durante 15 minutos a
Sulfato de manganeso	0.05	115°C.
Fosfato dipotásico	2.00	NOTA: no recalentar.
Polisorbato 80		
pH final: 6.2 ± 0.2 a 25°C		

4.3.3. Medios empleados para el ensayo de bacteriocinas

Medio BHA tamponado (BHA-T)

Se utilizó como capa base de las placas para los ensayos de actividad antibacteriana. El preparado comercial (BHI) se reconstituyó en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2.

Su composición en g/l es la siguiente:

BHI	35 g
Fosfato monosódico	4,3 g
Fosfato disódico	10 g
Agar	17 g

Medio BHA-T blando

Fue empleado como sobrecapa para cubrir la capa base una vez inoculado con la bacteria indicadora.

El medio se fundirá en el microondas y se repartirá a 6 ml por tubo antes del autoclavado. Se prepara igual que el BHA-T pero con menos cantidad de agar para obtener un medio blando

4.4. Procesado de los alimentos

De cada alimento se pesaron 5 gramos iniciales que fueron guardados cada uno en su bolsita estéril correspondiente, y se añadió 45 ml de solución salina estéril al 0.9%, para ser posteriormente procesados en un homogeneizador (Stomacher® 80 Biomaster, Seward Ltd).

Se prepararon diluciones seriadas de cada alimento, añadiendo 100 µl de esta suspensión madre sobre los eppendorf con 0.9 ml de solución salina estéril.

4.5. Recuentos bacterianos

Se sembraron 100 µl de cada dilución, de la 0 hasta la -2, en placas de los medios generales y 100 µl de las dos primeras diluciones (0 y -1) en las placas de los medios selectivos descritos.

Los recuentos se realizaron tras 24 y 48 horas de incubación a 30°C, contando las colonias obtenidas en ambos tiempos para obtener los resultados finales. Las colonias se sembraron de nuevo en medio MRS para el ensayo de bacteriocinas.

4.6. Aislamiento y selección de bacterias lácticas de las hierbas aromáticas

Tras 48 horas de incubación se procede a picar colonias con la ayuda de la micropipeta, usando una punta para cada cepa para evitar contaminación, y se re-suspenden en tubos con MRS líquido. Dejar en la estufa a 30°C.

Al día siguiente se puede observar cómo los tubos con MRS líquido están más turbios, lo que quiere decir que ha habido crecimiento bacteriano. Se procede a pasarlo a semilla (MRS sólido), para ello impregnamos bien un bastoncillo o hisopo en cada tubo de MRS líquido y seguidamente sembramos en el medio inclinado MRS sólido (Fig.3). Todo este proceso siempre se debe realizar delante del mechero Bunsen, para mantener la esterilidad en todo momento.



Figura 3. Tubos de MRS líquido preparados para ser sembrados en los tubos de MRS inclinado.

Una vez esté todo sembrado, se incuban los tubos en la estufa a 30°C durante 24h. Pasadas las 24 horas, se procede a realizar la tinción de Gram para ver la morfología bacteriana.

4.7. Tinción de Gram

- Echar en el portaobjetos una gota de agua. Con el asa de siembra cogemos un poco de masa bacteriana de cada tubo de MRS inclinado y la mezclamos con la gota de agua.
- Fijar dicha gota con calor, sosteniendo el portaobjetos sobre la llama del mechero Bunsen con la ayuda de una pinza.
- Depositar sobre la muestra unas gotas de cristal violeta y dejar actuar durante 2 minutos.
- Volcar el cristal violeta y añadir lugol durante 2 minutos.
- Decolorar con alcohol al 96% durante 30 segundos. A continuación, lavar abundantemente con agua destilada.
- Añadir safranina y dejar actuar durante 3 minutos. Pasado este tiempo, volver a la lavar la muestra y dejar secar.
- Observar las muestras al microscopio para determinar su morfología a 100x, para ello siempre usando el aceite de inmersión.

4.8. Producción de bacteriocinas

Para realizar el ensayo de producción de bacteriocinas se utilizó un cultivo overnight de las bacterias a analizar en medio MRS líquido. A la hora de realizar el ensayo se toman 800 µl de cada uno los diferentes cultivos overnight de las distintas cepas y se centrifugan a 13000 rpm, durante 5 minutos, con el fin de separar el sobrenadante de los restos de células y medio de cultivo. A continuación, se funden las sobrecapas y se mantienen en el baño atemperadas.

En el medio sólido BHA-T (10 ml) con la superficie bien seca, se depositan torres de acero inoxidable (8 mm de diámetro x 1 cm de altura), bien separadas entre ellas y de los bordes de las placas (Fig.4). Seguidamente, se vierten sobre las placas 6 ml del medio BHA blando, mantenido en sobrefusión (50°C) e inoculado con 60 µl de la bacteria indicadora (aproximadamente 3×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)). Como microorganismos indicadores se utilizaron *Listeria innocua* y *Enterococcus faecalis*. Se dejan solidificar, y una vez solidificada la sobrecapa, con las pinzas estériles se retiran las torres, con cuidado de no contaminar. En los distintos huecos (pocillos) se depositan 85 µl de cada una de las cepas a ensayar la actividad antimicrobiana.

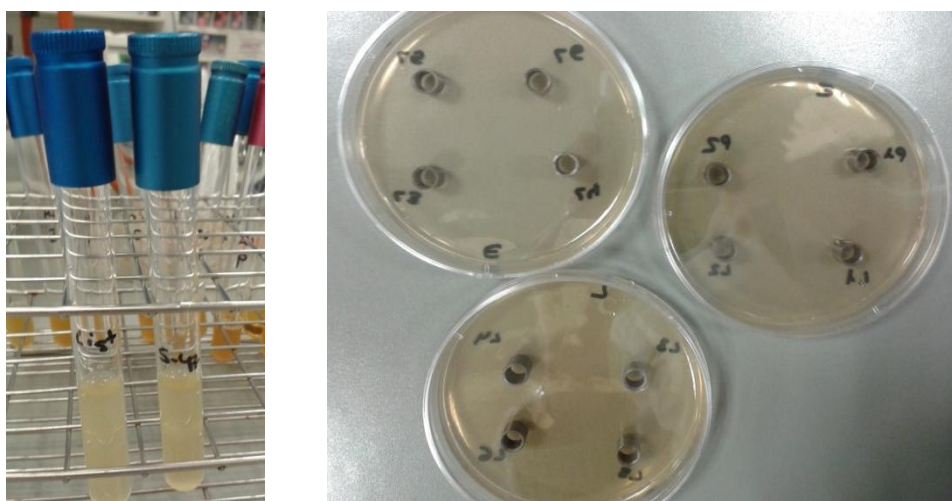


Figura 4. Microorganismos indicadores y placas preparadas con torres de acero.

Se incuban las placas a 37°C de 18-24 horas, con cuidado de no mover el contenido de los pocillos. A las 24 horas se observa la aparición de actividad antimicrobiana por la formación de halos de inhibición alrededor de la cepa productora y frente a la cepa indicadora.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez realizado todo el trabajo en el laboratorio, los resultados observados se muestran en las siguientes tablas y figuras.

5.1. Recuento y selección de bacterias lácticas

Se hicieron diluciones seriadas, de la 0 hasta la -2, en placas de medio MRS- agar. El recuento de colonias bacterianas se realizó tras 24 y 48 horas de incubación a 30°C, ya que las BAL tardan un poco en crecer, y a las 24 horas de incubación las colonias son muy pequeñas, con lo cual es bueno hacer el recuento también pasadas las 48 horas.

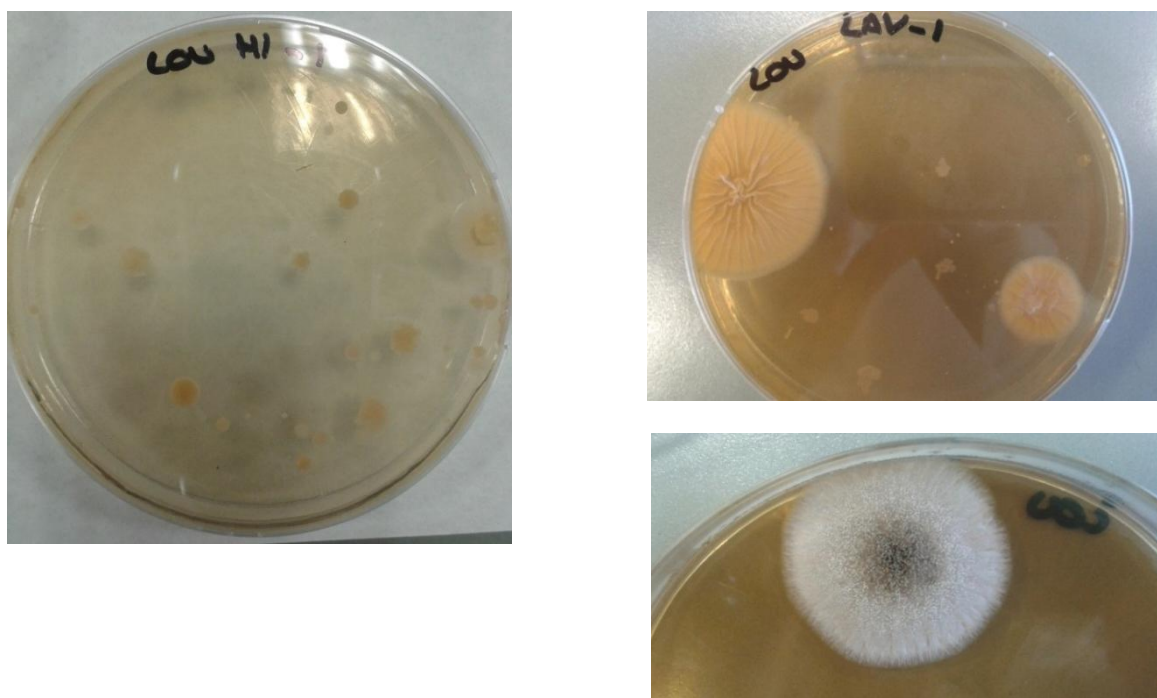


Figura 5. Levaduras y hongos obtenidos en distintas placas.

Los resultados obtenidos se expresan en Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de muestra UFC/ml. Teniendo en cuenta las colonias obtenidas en la dilución menor o en la que haya entre 50 y 300 colonias. Además de bacterias lácticas, se obtuvieron otros microorganismos (Fig.5), tales como levaduras, hongos y bacilos Gram negativos que según las indicaciones del medio MRS pueden corresponder a *Escherichia coli*.

Tabla 1. N° de colonias obtenidas en dichas diluciones en ambos tiempos:

Alimentos	24 horas			48 horas			
	0	-1	-2	0	-1	-2	UFC/ml
Tomillo	13	2	0	53	4	2	$5.3 \cdot 10^2$
Romero	1	0	0	2	0	1	$2 \cdot 10^1$
Hinojo	9	0	0	15	16	1	$1.5 \cdot 10^2$
Cardillo	0	0	0	3	0	1	$3 \cdot 10^1$
Hierbabuena	2	2	0	16	2	1	$1.6 \cdot 10^2$
Lavanda	3	0	0	13	0	0	$1.3 \cdot 10^2$
Laurel	0	0	0	12	0	0	$1.2 \cdot 10^2$
Perejil	0	0	0	2	0	0	$2 \cdot 10^1$

Como se puede observar en la tabla 1 se pudieron aislar presuntas bacterias lácticas de todas las hierbas ensayadas, siendo la menos cantidad del romero, cardillo, y perejil. El mayor número de colonias se obtuvo del tomillo. Los resultados obtenidos concuerdan con los reflejados por otros autores donde la tasa de bacterias lácticas en las diferentes hierbas aromáticas es baja.

Una vez seleccionadas las colonias se picaron de las placas y se sembraron de nuevo en una placa de MRS-agar para purificarlas y asegurarnos que llevamos una sola colonia.

Una vez obtenida una colección representativa de las diferentes hierbas aromáticas para identificar las BAL se realizó la tinción de Gram y se observó la morfología. La mayoría de las cepas tenían morfología de cocos o bacilos y eran Gram +, en las placas se podían observar blanquecinas y pequeñas.

En algunos casos se observó la presencia de cocobacilos Gram negativos, que en la mayoría de los casos en las placas correspondían a colonias algo mayores. Decidimos mantener estas colonias en los diferentes ensayos con el fin de detectar la presencia de actividad antimicrobiana en estas hierbas.

5.2. Identificación de las bacterias lácticas seleccionadas.

Tabla 2. Morfología bacteriana observada en las cepas de tomillo.

TINCIÓN DE GRAM			
Alimento	Cepa	Morfología	Tipo
Tomillo	T1	Bacilo	Gram -
	T2	Coco	Gram +
	T3	Bacilo	Gram -
	T4	Bacilo	Gram -
	T5	Coco	Gram +
	T6	Coco	Gram +
	T7	Coco	Gram +
	T8	Coco	Gram +
	T9	Coco	Gram +
	T10	Coco	Gram +

De las muestras de tomillo utilizadas (Tabla 2), se obtuvo una colección de 10 cepas diferentes de las cuales 7 corresponden a las características de BAL, bacterias Gram positivas.

Tabla 3. Morfología bacteriana observada en las cepas de hinojo.

TINCIÓN DE GRAM			
Alimento	Cepa	Morfología	Tipo
Hinojo	HI1	Coco	Gram +
	HI2	Bacilo	Gram +
	HI3	Coco	Gram +
	HI4	Bacilo	Gram +
	HI5	Bacilo	Gram -
	HI6	Bacilo	Gram +
	HI7	Bacilo	Gram +
	HI8	Coco	Gram +
	HI9	Coco	Gram +
	HI10	Coco	Gram +

Con respecto a las muestras de hinojo (Tabla 3) se aislaron también 10 cepas de las cuales una de ella mostraba morfología de bacilo Gram negativo.

Tabla 4. Morfología bacteriana observada en las cepas de hierbabuena.

TINCIÓN DE GRAM			
Alimento	Cepa	Morfología	Tipo
Hierbabuena	HB1	Coco	Gram +
	HB2	Bacilo	Gram +
	HB3	Coco	Gram +
	HB4	Coco	Gram +
	HB5	Bacilo	Gram +
	HB6	Bacilo	Gram -
	HB7	Coco	Gram +
	HB8	Coco	Gram +
	HB9	Coco	Gram +
	HB10	Coco	Gram +

En las muestras de hierbabuena (Tabla 4) se aislaron también 10 colonias y una de ella no correspondía a la morfología típica de las BAL.

Tabla 5. Morfología bacteriana observada en las cepas de cardillo.

TINCIÓN DE GRAM			
Alimento	Cepa	Morfología	Tipo
Cardillo	C1	Coco	Gram +
	C2	Bacilo	Gram -
	C3	Coco	Gram +
	C4	Coco	Gram +

En cuanto al cardillo (Tabla 5) fue más difícil obtener microorganismos, tan solo se aislaron 4 colonias y una de ella era un bacilo Gram-.

Tabla 6. Morfología bacteriana observada en las cepas de romero.

TINCIÓN DE GRAM			
Alimento	Cepa	Morfología	Tipo
Romero	R1	Bacilo	Gram +
	R2	Bacilo	Gram +
	R3	Bacilo	Gram +

Al igual que en el cardillo, del romero (Tabla 6) también fue difícil obtener colonias, aunque las 3 aisladas en principio si corresponden a las características de bacterias lácticas

Tabla 7. Morfología bacteriana observada en las cepas de laurel.

TINCIÓN DE GRAM			
Alimento	Cepa	Morfología	Tipo
Laurel	L1	Coco	Gram +
	L2	Coco	Gram +
	L3	Bacilo	Gram +
	L4	Bacilo	Gram +
	L5	Bacilo	Gram +
	L6	Bacilo	Gram +
	L7	Bacilo	Gram +
	L8	Bacilo	Gram +
	L9	Bacilo	Gram +
	L10	Bacilo	Gram +

En cuanto al laurel (Tabla 7), se obtuvieron el mayor número de cepas lácticas incluyendo cocos y bacilos.

Tabla 8. Morfología bacteriana observada en las cepas de perejil.

TINCIÓN DE GRAM			
Alimento	Cepa	Morfología	Tipo
Perejil	P1	Coco	Gram +
	P2	Coco	Gram +

Del perejil (Tabla 8) se han obtenidos dos colonias que al estudiarla morfológicamente eran cocos y Gram positivos.

Tabla 9. Morfología bacteriana observada en las cepas de lavanda.

TINCIÓN DE GRAM			
Alimento	Cepa	Morfología	Tipo
Lavanda	LAV1	Bacilo	Gram -
	LAV2	Bacilo	Gram -
	LAV3	Bacilo	Gram -
	LAV4	Bacilo	Gram -
	LAV5	Coco	Gram +
	LAV6	Bacilo	Gram -
	LAV7	Bacilo	Gram -
	LAV8	Bacilo	Gram -
	LAV9	Bacilo	Gram -
	LAV10	Coco	Gram +

De las muestras de lavanda, (Tabla 9) en principio se aislaron diez colonias con apariencia de bacteria láctica, pero a la hora de realizar la tinción, eran la gran mayoría gran negativas, como se ha comentado anteriormente decidimos seguir con dichas cepas para los ensayos.

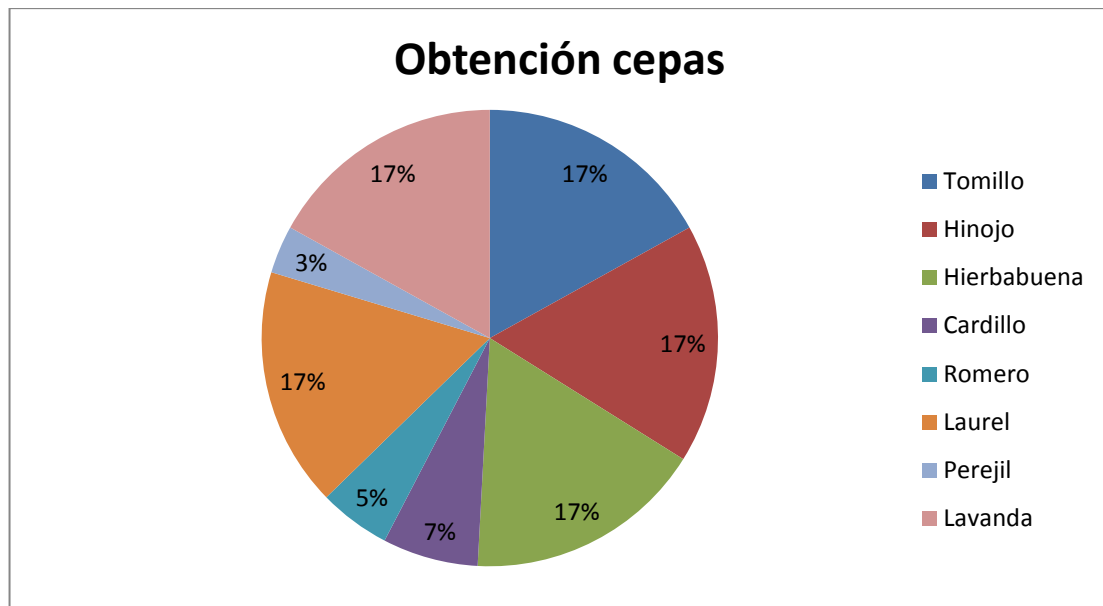
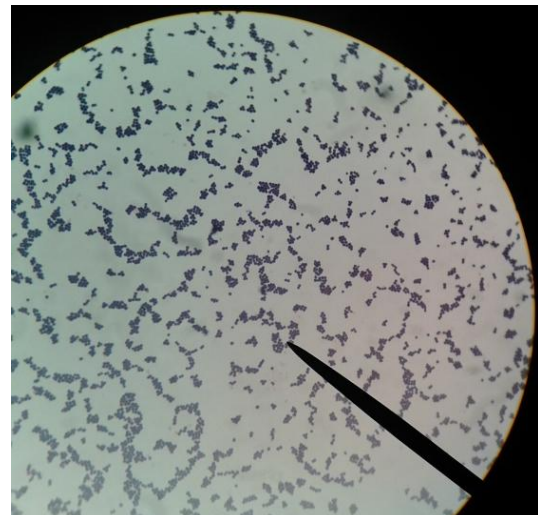
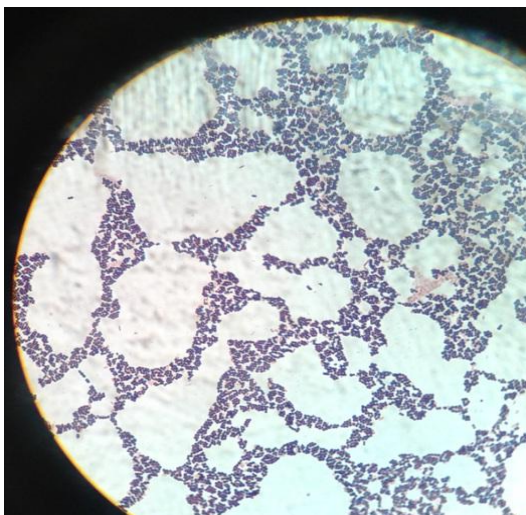


Figura 6. Porcentaje de cepas obtenidas de cada hierba aromática.

A parte de estas colonias, en las placas de MRS también aparecieron hongos y levaduras, identificados por su característica típica de crecimiento en placas, y que no se escogieron para el estudio.

Como resumen, podemos observar en la figura 6, que de las hierbas ensayadas de las que se obtuvo mayor número de colonias fue del tomillo, hinojo, hierbabuena, laurel y lavanda, independientemente de si las muestras fueron compradas o de cultivo propio.

En la figura 7, podemos ver una representación de la morfología típica de las BAL aisladas.



5.3. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas.

Los ensayos de bacteriocinas se hicieron en varias semanas. Tras 18-24 horas de incubación, se procedió a observar la aparición de actividad antimicrobiana mediante la presencia de halos de inhibición alrededor de la cepa productora y frente a la cepa indicadora. Los ensayos fueron realizados a todas las cepas obtenidas independientemente de que fueran bacterias lácticas o no.

- **Primer grupo: Tomillo**

En las placas inoculadas con *Listeria innocua* hubo un sobrecrecimiento bacteriano en prácticamente todas las cepas. No se observaron ningún halo transparente ni turbio, por lo que todas las cepas se consideraron negativas (Fig.8).

Para confirmar el ensayo se volvió a repetir centrifugando más tiempo las muestras (10 minutos) con idea de eliminar los restos de medio de cultivo y células. Al centrifugarlo más tiempo el crecimiento en los pocillos desapareció, y se confirmó que estas cepas no mostraban actividad antimicrobiana frente a *Listeria innocua*.

Las placas inoculadas con *Enterococcus faecalis* S-47 también fueron todas negativas, pues no se observaron ni halos turbios ni transparentes.

Cepa	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
<i>Listeria innocua</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> S-47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

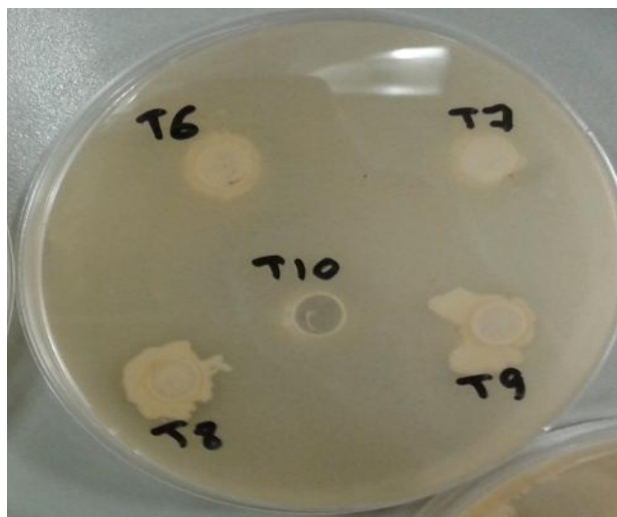


Figura 8. Sobrecrecimiento bacteriano en las cepas de tomillo inoculadas con *Listeria inocua*.

- **Segundo grupo: Hinojo**

En cuanto al Hinojo, se observó un halo transparente de 9 mm en la cepa **HI 1** y un halo transparente de 25 mm en la cepa **HI 2**, ambas frente a *Listeria inocua* (Fig. 9). Además en la cepa HI 2 hubo un sobrecrecimiento bacteriano. No se observó inhibición en ninguna de las demás cepas frente a *Listeria*. En cuanto a las cepas inoculadas con S-47 fueron todas negativas.

Las cepas en las que se observó crecimiento bacteriano en los pocillos se volvieron a centrifugar para eliminar los posibles restos de células o medio de cultivo, y en todas ellas la producción de bacteriocina fue negativa, pero desapareció el crecimiento bacteriano, salvo en la cepa HI2 con halo positivo.

Cepa	HI 1	HI 2	HI 3	HI 4	HI 5	HI 6	HI 7	HI 8	HI 9	HI 10
<i>Listeria inocua</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> S-47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



Figura 9. Sobrecrecimiento bacteriano en las cepas de hinojo inoculadas con *Listeria inocua* y halos de inhibición en las cepas HI 1 y HI 2.

- **Tercer grupo: Hierbabuena**

En los ensayos de las cepas procedentes de hierbabuena en las placas inoculadas con *Listeria inocua* no apareció actividad antimicrobiana en ninguna cepa, por lo que se consideraron todas negativas, con un crecimiento bacteriano en la cepa HB7.

La cepa **HB7** se determinó como positiva, pues se observó un halo de 10 mm frente a *Enterococcus faecalis* S-47. Todas las demás cepas fueron negativas (Fig. 10).

Cepa	HB1	HB2	HB3	HB4	HB5	HB6	HB7	HB8	HB9	HB10
<i>Listeria inocua</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> S-47	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-



Figura 10. Halo de inhibición en la cepa HB7 frente a *Enterococcus faecalis*.

- **Cuarto grupo: Cardillo**

A las 18 horas se observa un halo transparente de inhibición de 16 mm frente a *Enterococcus faecalis* S-47 en la cepa **C2** (Fig.11). Las demás cepas fueron negativas, tanto frente a *Listeria inocua* como a *Enterococcus faecalis* S-47.

Cepa	C1	C2	C3	C4
<i>Listeria inocua</i>	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> S-47	-	+	-	-

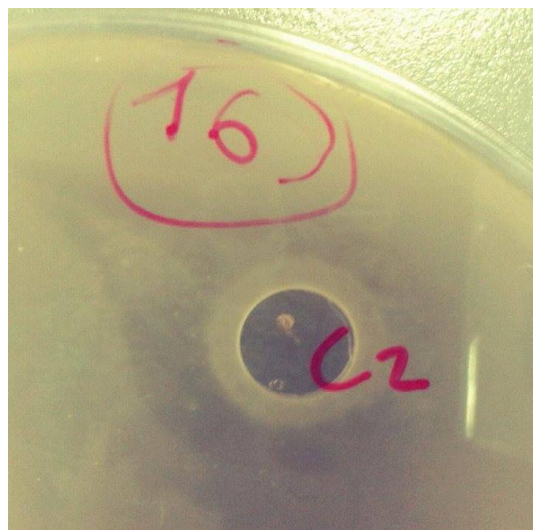


Figura 11. Halo de inhibición en la cepa C2 frente a *Enterococcus faecalis*.

- **Quinto grupo: Romero**

Ninguna de las cepas mostraron actividad antimicrobiana, pues no se han observado halos ni en las placas inoculadas con *Listeria* ni en las de S-47.

Cepa	R1	R2	R3
<i>Listeria inocua</i>	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> S-47	-	-	-

- **Sexto grupo: Laurel**

Frente a *Listeria* todas las cepas aisladas del laurel fueron negativas, no hubo halos transparentes ni turbios. En las placas frente a S-47 se observaron halos algo turbios de 10 mm en las cepas **L1, L2, L5, L6 y L10** (Fig.12).

Cepa	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
<i>Listeria inocua</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> S-47	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+

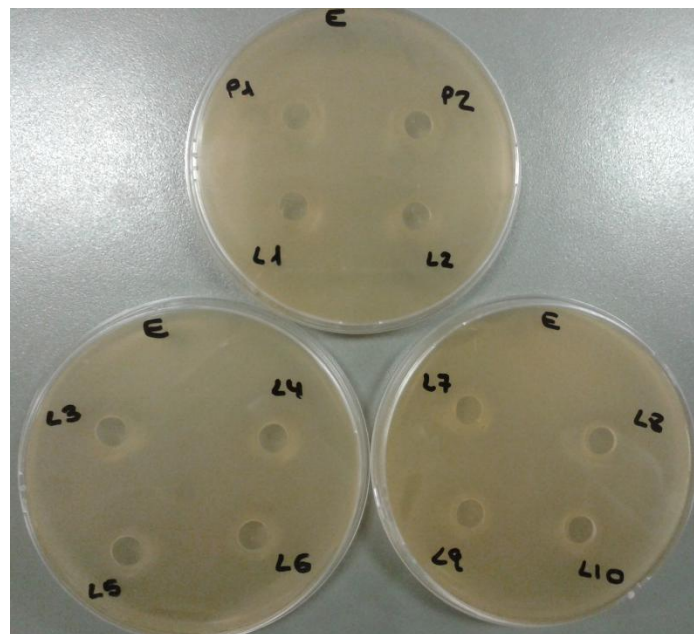


Figura 12. Halos de inhibición en cepas de laurel inoculadas con *Enterococcus faecalis* S-47.

- **Octavo grupo: Perejil**

Frente a *Listeria inocua* todas fueron negativas, no hubo ni halos turbios ni transparentes. Sin embargo, frente a *Enterococcus* se observó un halo de 10 mm en la cepa **P2** (Fig.13).

Cepa	P1	P2
<i>Listeria inocua</i>	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> S-47	-	+

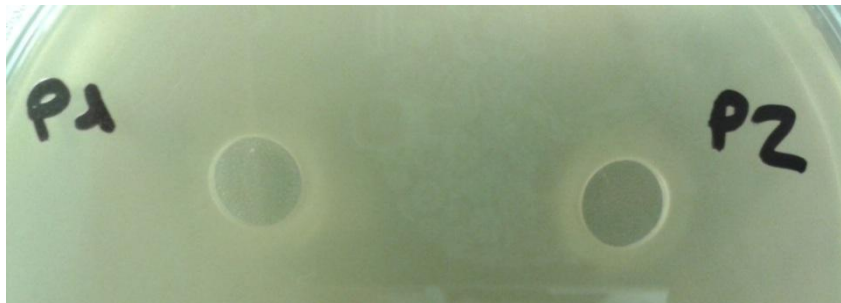


Figura 13. Halo de inhibición en la cepa P2 frente a *Enterococcus faecalis* S-47.

- Séptimo grupo: Lavanda

En las cepas aisladas de lavanda, las cepas **LAV1**, **LAV2**, **LAV3**, **LAV4** y **LAV5** mostraron actividad antimicrobiana, todas con un halo de 10 mm frente a S-47. Las cepas **LAV8** y **LAV9** mostraron actividad con halo de 11 mm frente a S-47 (Fig.14). Las placas inoculadas con *Listeria inocua* fueron todas negativas.

Cepa	LAV 1	LAV 2	LAV 3	LAV 4	LAV 5	LAV 6	LAV 7	LAV 8	LAV 9	LAV 10
<i>Listeria inocua</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> S-47	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-

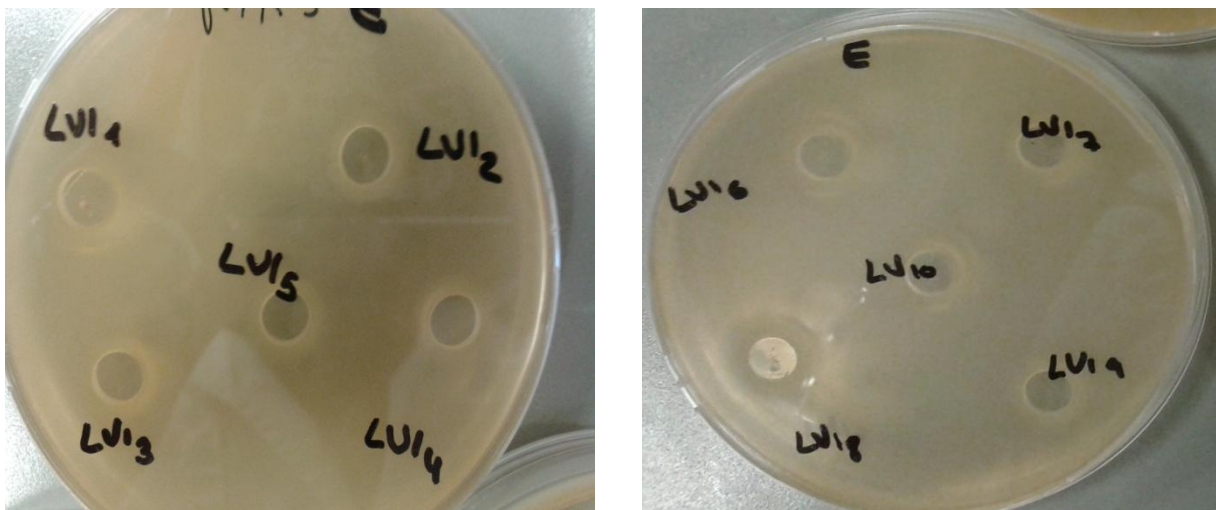


Figura 14. Halos de inhibición en cepas de lavanda frente a *enterococcus faecalis* S-47.

En resumen podemos decir que de las hierbas aromáticas hinojo, hierbabuena, cardillo, laurel, lavanda y perejil se pueden aislar bacterias lácticas y algunas de ellas con actividad antimicrobiana, destacando el laurel y la lavanda (Fig.15). Como ya he comentado ha sido descrito por varios autores la actividad biológica de lavanda frente a *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Estafilococos*, *Shigella* o *Giardas* (Hüsnü y Buchbauer, 2009). En el caso del Laurel, las hojas secas y su aceite esencial son usados extensivamente en la alimentación como conservante debido a sus propiedades antimicrobianas e insecticidas y el aceite del laurel tiene un amplio espectro antimicrobiano y es útil en la industria cosmética.

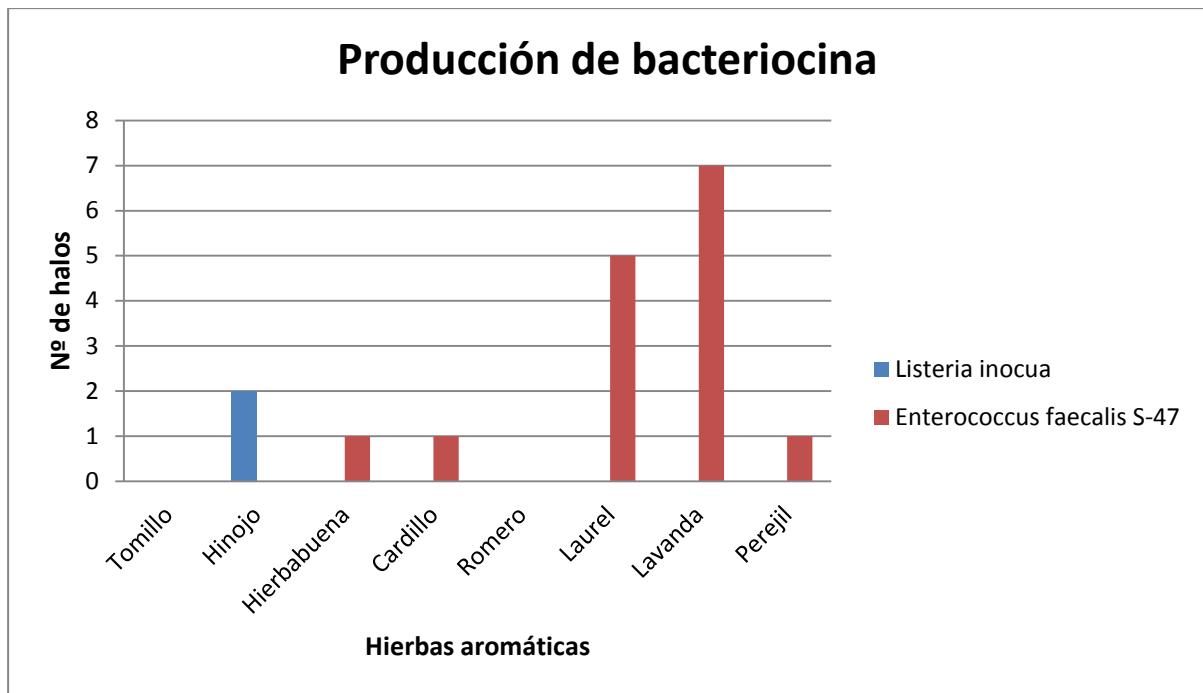


Figura 15. Número cepas obtenidas con actividad antimicrobiana frente a las cepas indicadoras.

Una vez detectada la presencia de cepas con actividad antimicrobiana, para confirmar y obtener una producción mayor se debería optimizar el medio de cultivo y el tiempo de crecimiento empleado, ya que como se ha descrito en otras investigaciones la composición del medio de cultivo, el pH y el tiempo de incubación puede favorecer la producción de bacteriocina según las cepas.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. Se ha comprobado la presencia de distintos grupos bacterianos, bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos y levaduras en los distintos tipos de hierbas aromáticas.
2. De las hierbas aromáticas utilizadas, tomillo, hinojo, lavanda, hierbabuena y laurel, son de las que se ha obtenido un mayor número de aislados.
3. De las hierbas ensayadas, en el Laurel es en el que se han aislado mayor número de colonias correspondientes por morfología a bacterias lácticas.
4. De las cepas con morfología de bacterias lácticas, el número mayor de actividad antimicrobiana se ha encontrado en el laurel, con 5 cepas con actividad antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis* S-47.
5. Se ha observado también actividad antimicrobiana frente a S-47 en una de las cepas aisladas de hierbabuena, cardillo, perejil y lavanda.
6. Frente a *Listeria innocua* 4030 solo se observó actividad con dos de las cepas aisladas de hinojo, la cepa 1 y la cepa 2.
7. Como conclusión final podemos decir que en las hierbas aromáticas podemos encontrar Bacterias lácticas con propiedad antimicrobiana frente a algunos microorganismos patógenos de alimentos como listeria, lo cual sería interesante en un futuro a la hora de poderlas utilizar como conservantes alimentarios.

7. BIBLIOGRAFÍA

Albandar, J. M., Rams, T. E. 2002. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontology*. 29:7-10.

Almanza, F., Barrera, E. 1991. Tecnología de leche y derivados, Bogotá Unisur. P. 61-66.

Almela, L., B. Sánchez-Muñoz, J. A., Fernández-López, M. J., Roca & V. Rabe. 2006. Liquid chromatographic mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography*, 1120(2): 221-229.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. En: *Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects*. (salminen, S. y Wright, A. von, eds.), 2nd edition. Pp. 1-72. Marcel Dekker Inc. New York, USA.

Baltazar, F. E. 2003. "Mezclas de antimicrobianos naturales y sintéticos para inhibir el crecimiento bacteriano". Tesis de Maestría. Universidad de las Américas, Puebla, México.

Baranauskiene, R., Venskutonis, R., Viskelis, P., Dam–Brauskiene, E. 2003. Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.* 51: 7751–7758.

Blanco, S., Delahaye, P., Fragenas, N. 2006. "Evaluación física y nutricional de un yogurt con frutas tropicales bajo en calorías," *Revista Facultad de Agronomía (Maracay) Venezuela*. 2006. Vol. 32, p. 131-144.

Breukink, E., Wiedemann, I., Van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Sahl, H., de Kruijff, B. 1999. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286, 2361-2364.

Brotz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, P. E., Sahl, H. G. 1998b. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 154-160.

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

Campanini, M., Pedrazzoni, I., Barbuti, S., Baldini, P. 1993. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the maturation of naturally and artificially contaminated salami: effect of lactic-acid bacteria starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 20, 169-175.

Carr, F. J., Chill, D., Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: A literatura survey. *Critical Reviews in Microbiology.* 28(4):281-370.

Carr, J. G. 1973. Lacties of the word unite. *Proc. 4th Long Ashton Symposium Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food.* Bristol Inglaterra pp. 369-390

Centeno, S., M. A. Calva. 2010. Antifungal activity of extract of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* on *Aspergillus flavus* and *A. ochraeus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13(9): 452-455.

Chen, Y., Ludescher, R. D., Montville, T. J. 1997a. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4770-4777.

Chen, Y., Shapira, R., Eisenstein, M., Montville, T. J. 1997b. 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, 524-531.

Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journald of Food Microbiology* 71, 1-20.

Coderre, P. E., Somkuti, G. A., 1999. Cloning and expression of the pediocin operon in *Streptococcus thermophilus* and other lactic fermentation bacteria. *Curr. Microbiol.* 39, 295-301.

Crandall, A. D., Montville, T. J., 1998. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 231-237.

Curtis, B. 2006. Growing and Marketing Lavender. *Farming the Northwest Series* EB2005. Washington State University Extension. 28 p.

Delves-Broughton, J. 1991. Nisin and its use as a food preservative. *Food Technlogy.* 44: 110-117.

Ferreira, M. A., Lund, B. M. 1996. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 22, 433-438.

- Fitomed. Plantas Medicinales. 1991. La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
- Fonnegra, G. R.; Jiménez, R. S. L. 2007. Plantas Medicinales Aprobadas en Colombia. Universidad de Antioquía. Medellín, Colombia. 371 p.
- Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., 1991 a. Las Bacteriocinas. ¿Supervivencia del individuo frente a la especie? Servicio de publicaciones de la Universidad de Granada.
- Grivetti, L. E., Ogle, B. M. 2000. "Value of traditional foods in meeting macro- and micronutrient needs: the wild plant connection". *Nutr Res Rev* 13: 31-46.
- Grüner, H., Reinhold, M., Gil, A. 2008. "Procesos de Cocina", Traducido al español por González, A. Editorial Akal, S.A. Madrid, España. 288 p.
- Guerra, N., Rua, M., Pastrana, L. 2001 Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey," *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 70, p. 267-28.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 86, 985-990.
- Harvastein, L. S., Holo, H., Nes, I. F. 1994. The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Microbiology* 140 (Pt. 9), 2383-2389.
- Hüsnü, C., Buchbauer, G. 2009. Handbook of essential oils: science, technology and applications. CRC Press. Print ISBN: 978-1-42-00-6315-8
- Jack, R. W., Tagg, J. R., Ray, B. 1995. Bacteriocin of Gram-positive bacteria. *Microbiol Rev*. 59, 171-200.
- Jay, J. M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44:525-531.
- Joerger, R. 2002. Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages. *Poultry Science*. 82: 640-647.
- Kandler, O., Weiss, N. 1986. Genus *Lactobacillus*. En: "Bergery's Manual of Systematic Bacteriology", vol. 2., pp. 1208-1234. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (eds.). Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev*. 12, 39-85.
- Kubota, S., Momose, H., Yoneda, K., Koshioka, M. 2010. *Lavandula x intermedia* is a vernalization type plant. *JARG* 44:67-72.

Kunzemann, J., Herrmann, K. 1977. Isolation and identification of flavon(ol)-O-glycosides in caraway (*Carum carvi* L.), fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.), anise (*Pimpinella anisum* L.), and coriander (*Coriandrum sativum* L.), and of flavon-C-glycosides in anise. I. Phenolics of spices. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung; 164:194-200.

Lambert, R. J., Skandamis, P. N., Coote, P. J., Nychas, G. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 91:453-462.

Manou, I., Bouillard, L., Devleeschouwer, M. J., Barel, A. O. 1998. Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *Journal of Applied Microbiology*. 84:368-376.

Mazzotta, A. S., Crandall, A. D., Montville, T. J. 1997. Nisin resistance in *Clostridium botulinum* spores and vegetative cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2654-2659.

McAuliffe, O., O'Keeffe, T., Hill, C., Ross, R. P. 2001. Regulation of immunity of the two-component lantibiotic, lactacin 3147, by the transcriptional repressor LtnR. *Molecular Microbiology* 39, 982-993.

Michael, T. Madigan., John, M. Martinko., Paul, V. Dunlap., David, P. Clark. 2009. Brock. Biología de los microorganismos. 12ª edición. Edit: Pearson/Addison Wesley.

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

Miresmailli, S. 2006. Comparative toxicity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and blends of its major constituents against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on two different host plants. *Pest Management Science*, 62(6): 366-371.

Moazedi, A. A., Mirzaie, D. N., Seyyednejad, S. M., Zadkarami, M. R., Amirzargar, A. 2007. "Spasmolytic effect of *Petroselinum crispum* (parsley) on rat's ileum at different calcium chloride concentrations". *Pak J Biol Sci.* 10(22): 4036-4042.

Montes de Oca, R. G. 2010. Elaboración y control de comprimidos fitofarmacéuticos de ajeno (*Artemisia absinthium* L), romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) para combatir la menstruación dolorosa. Tesis de Licenciatura. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.

Muñiz, D. B., Valdivia, B., Carrillo, M. L., Nevárez, V. G., Contreras, J. C., Rodríguez, R., Aguilar, C. N. 2010. "Uso alternativo de fitoquímicos de algunas especias para el control de enfermedades transmitidas por alimentos". *Acta química mexicana*, 2(4).

Muñoz, L. 2002. *Plantas Medicinales y Aromáticas: Estudio, Cultivo y Procesado*. Ed. Mundi-Prensa. España. 365p.

Naghdi, B., Yazdani, D., Mohammad, S., Nazari, F. 2004. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products* 19: 231–236.

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.

Nes, I. F., H. Holo. 2001. Unmodified peptide-bacteriocins (class II produced by lactic acid bacteria, pp. 81-115. *In* Peptide antibiotics. Discovery, modes of action, and applications. C.J. Dutton, M.A. Haxell, H.A.I. McArthur, and R.G. Wax (eds). Marcel Dekker, New York.

Nielsen, J. W., Dickson, J. S., Crouse, J. D. 1990. Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2142-2145.

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

Ogunbanwo, S., Sanni, A., Onilude, A. 2003. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocina by *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology*. 2(7): 179-184.

Olivera, P., Mila, J., Mladen, M. 2007. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Free Volatile Aglycones from Laurel (*Laurus nobilis* L.) Compared to Its Essential Oil. *Teslina 10/V, 21000 Split, Croatia*.

Paster, N., Menasherow, M., Ravid, U., Juven, B. 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *J. Food Prot.* 58:81–85.

Piard, J. C., Desmazeaud, M. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substance. *Lait* 72: 113-142.

Piard, J. C., Muriana, P. M., Desmazeaud, M., Klaenhammer, T. R. 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. CNRZ481. Appl. Environm. Microbiol., 54: 2349-2353.

Plantas Medicinales, *Enciclopedia de plantas medicinales historia y efectos*.

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

Ray, B., Daeschel, M. A. 1992. Food Biopreservatives of Microbial Origin. CRC Press, Florida, USA.

Rayman, K., Aris, B., Hurst, A. 1983. Failure of *nisin* to inhibit outgrowth of *Clostridium botulinum* in a model cured meat system. Appl. Environ. Microbiol. 46, 1450-1452.

Rayman, M. K., Aris, B., Hurst, A. 1981. Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. Appl. Environ. Microbiol. 41, 375-380.

Rogers, L. A., Whittier, E. D. 1928. Limiting factors in lactic fermentation. Journal of Bacteriology 16, 211-229.

Rozman, T., B. Jersek. 2009. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. Acta Agrícola Slovenia, 93(1): 51-58.

Ruiz, O. M. 2000. Tratado de Botánica, 3a. ed., Porrúa, México D.F., 1256 pp.

Sahl, H. G., Kordel, M., Benz, R. (1987). Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. Arch. Microbiol., 149: 120-124.

Sahl, H. G., Jack, R. W., Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. Eur. J. Biochem. 230, 827-853.

Saim, N., Meloan, C. E. 1986. Compounds from leaves of bay (*Laurus nobilis* L.) as repellents for *Tribolium castaneum* (Herbst) when added to wheat flour. J. Stored Products Res. 22, 141-144.

Schoeman, H., Vivier, M. A., Du, T. M., Dicks, L. M., Pretorius, I. S. 1999. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (pedA) in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 15, 647-656.

Severina, E., Severin, A., Tomasz, A. 1998. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. J. Antimicrob. Chemother. 41, 341-347.

Shahidi, F., P. K., Janitha, & P.D. Wanasundara. 1992. Phenolic antioxidants. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 32(1): 67-103.

Simental, J., & O.I. Avila. 1999. Characterization of the rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) obtained with supercritical CO₂, starting with the theoretically staged determination of the extraction. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(2): 103-113.

Stiles, M. E., Hasting, J. W. 1991. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. Trends food Sci. Technol 2, 247-251.

Stiles, M. E., Holzapfel, W. H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol. 36, 1-29.

Tagg, J. R., Dajani, A. S., Wannamaker, L. W. 1975. Bacteriocin of a group B *streptococcus*: partial purification and characterization. Antimicrob. Agents Chemother., 7: 764-772.

Tagg, J. R., Dajani, A. S., Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev., 40: 722-756.

Takarada, K., Kimizuka, R., Takahashi, N., Honma, K., Okuda, K., Kato, T. 2004. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. Oral Microbiol Immunol; 19: 61-64.

Tchikindas, M., Cleveland, J., Li, J., Montville, T. 2000. Unrelatedness of nisin resistance and antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. Program and abstract Book. IAFP, p.55.

Tschinggerl, C. & F. Bucar. 2010. Investigation of the volatile fraction of rosemary infusion extracts. Scientia Pharmaceutica, 1(4): 483-492.

U. S. Food and Drug Administration, 1988. Nisin Preparation: Affirmation of GRAS status as direct human food ingredient. Federal Register. 53, April 6.

Van Belkum, M. J., Hayema, B. J., Jeeninga, R. E., Kok, J., Venema, G. 1991. Organization and nucleotide sequences of two lactococcal bacteriocin operons. Appl. Environ. Microbiol., 57: 492-498.

Van Belkum, M. J., Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I. F., Konings, W. N., Abee, T. 1991. The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of

lactococcal cytoplasmic membranas in a voltaje-independent, protein-mediated manner. *J. Bacteriol.* 173, 7934-7941.

Van den Broucke, C., Lemli, J. 1981. Pharmacological and chemical investigation of thyme liquid extracts. *Planta Med* 41: 129–135.

Vázquez, S. M., Suárez, H., Zapata, S. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición.* 36(1):64-71.

Volcão, L. M., Marques, J. L., Ribeiro, G. A. 2011. Evaluación de la actividad antibacterial del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. en patógenos alimentarios. XX Congreso de iniciación científica, II Muestra Científica UFPEL.

Wessels, S., Jelle, B., Nes, I. 1998. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Report of the Danish Toxicology Centre, Denmark.