

# EFECTO ANTAGÓNICO DE *Lactobacillus plantarum* AISLADO DE PASTIZAL DE FINCA LECHERA

Carmen Cecilia Alvarado- Rivas y Cándida Gloria Díaz- Rivero

Laboratorio de Microbiología de Alimentos/ Departamento de Microbiología y Parasitología/ Facultad de Farmacia y Bioanálisis/Universidad de Los Andes/ Mérida–Venezuela

E-mails: [carmenu@ula.ve](mailto:carmenu@ula.ve), [candidad@ula.ve](mailto:candidad@ula.ve)



## Introducción

La capacidad que tienen muchos miembros del género *Lactobacillus* para inhibir bacterias indeseables tiene importantes aplicaciones en la industria alimentaria y en la selección de cultivos con fines probióticos.

La utilidad de especies de *Lactobacillus* en la industria alimentaria es invaluable porque aparte de conferir características organolépticas deseables a los productos fermentados, aseguran la estabilidad y seguridad de estos alimentos debido a la producción de metabolitos como

ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, acetaldehído y bacteriocinas que ejercen efecto antagónico contra bacterias indeseables (1, 2). Este efecto antagónico es también una característica deseable en bacterias de uso probiótico porque uno de los principales beneficios terapéuticos aportados por estos microorganismos al huésped es el equilibrio de la microbiota intestinal y el control de infecciones gastrointestinales (3,4).

*Lactobacillus plantarum* es utilizado en la fermentación de vegetales, derivados cárnicos, ensilaje (5, 6, 7) y también se comercializa como cultivo probiótico en jugo de frutas (8). Esta especie ha sido objeto de interés durante las últimas décadas por producir una amplia gama de compuestos activos contra bacterias patógenas y hongos que pueden ser utilizados como bioconservantes muy efectivos en la industria alimentaria (9, 10, 11) y adicionalmente estas cepas pudieran ejercer antibiosis contra bacterias indeseables en el tracto intestinal del consumidor de estos alimentos.

En esta investigación se realizó un estudio de la actividad antagónica de 6 cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas de pastizal de finca lechera.

## Materiales y Métodos

**Cepas bacterianas:** Se estudiaron seis cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas de pastizal de una finca lechera: *Lactobacillus plantarum* 1, *L. plantarum* 4, *L. plantarum* 20, *L. plantarum* 37, *L. plantarum* 50 y *L. plantarum* 58. Como bacterias indicadoras se utilizaron dos cepas de *Salmonella enteritidis*, la cepa 446 perteneciente al Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM) y una cepa que ocasionó un brote epidémico alimentario en Mérida en abril de 2005; una cepa de *Salmonella typhi* aislada de leche cruda proveniente de una finca del estado Mérida/ Venezuela y *Listeria monocytogenes* CVCM 497.

**Preparación del inóculo de las bacterias indicadoras:** Se utilizó un inóculo de aproximadamente  $10^8$  UFC de cada patógeno; para ello se inocularon las salmonelas en Caldo BHI (Himedia), se incubaron en baño de agua a 37 °C hasta obtener 0,038 de absorbancia a una longitud de onda de 600nm (Espectrofotómetro digital Genesys 20); *Listeria monocytogenes* se cultivó en Caldo Tripticasa de Soya (Himedia) a 37°C hasta obtener 0,050 de densidad óptica a 600nm.

**Obtención del sobrenadante de los lactobacilos:** Cada lactobacilo ensayado, se inoculó en tubos de Caldo MRS (Himedia), con 1% de un cultivo de toda la noche y se incubaron por 24 horas a 30 °C. Cada cultivo se centrifugó a 4000 r.p.m. por 15 minutos (Centrífuga marca Digisystem Laboratory Instruments, Inc); el sobrenadante obtenido fue pasado a través de un filtro de membrana de 0,45 micras, dispensado en alícuotas de 1ml y almacenado en refrigeración (8 °C) para su uso posterior.

**Ensayo de actividad antagónica:** Se utilizó la Técnica de Difusión en pocillos (12) con algunas modificaciones. Sobre una capa base de 10 ml de Agar Müeller Hinton (Himedia) se colocó un cilindro de acero inoxidable de 8 mm de diámetro; se vertió 7 ml de Agar BHI (Himedia) blando (0,85% de agar) inoculado con 1 ml del inóculo de cada patógeno a ensayar; para *L. monocytogenes*, se utilizó Agar Tripticasa de Soya (Himedia) blando. Una vez solidificada la sobrecapa se retiraron los cilindros y en los pocillos formados se depositó 80 µl de sobrenadante de la cepa antagonista, las placas fueron incubadas a 37 °C por 12-16 horas. El efecto antagónico se determinó midiendo los diámetros de los halos de inhibición alrededor del pocillo, expresados en mm.

**Indicios de la naturaleza química del (los) compuesto (s) antagónico (s):** Los sobrenadantes que exhibieron actividad antagónica con alguno de los patógenos ensayados fueron seleccionados para realizarles una investigación preliminar de la naturaleza química de los compuestos que produjeron esa inhibición. Estos ensayos fueron realizados por duplicado, con la técnica de los pocillos explicada y comprendió: Inhibición por ácidos orgánicos, inhibición por peróxido de hidrógeno e inhibición por compuestos de naturaleza proteica.

a) **Inhibición por ácidos orgánicos:** Una alícuota de cada sobrenadante antagonista fue neutralizada a pH 6,5-7,0 utilizando NaOH 1 N (13) y se ensayó la actividad antagónica residual.

b) **Inhibición por peróxido de hidrógeno:** A los sobrenadantes que mostraron actividad antagónica luego de ser neutralizados se les ajustó el pH a 6,5 y luego fueron tratados con 32 µg/ml de Peroxidasa (Sigma), se incubaron por 2 horas a 37 °C, posteriormente se sometieron a 65 °C por 30 minutos para eliminar la actividad de la enzima (14); finalmente se detectó la actividad antagónica residual del sobrenadante.

c) **Inhibición por compuesto de naturaleza proteica:** Se tomaron dos alícuotas de los sobrenadantes que mostraron actividad antagónica luego de ser neutralizados; a una alícuota, se le ajustó el pH a 7,5 y se trató con 2 mg/ml de Tripsina (Merck) (disuelta en Buffer fosfato de sodio 0,01 M a pH 7,2), se incubó por 2 horas a 37 °C (15) y se llevó a 65 °C por 30 minutos. La otra alícuota de sobrenadante, fue sometida a 120 °C por 20 minutos (16).

## Resultados

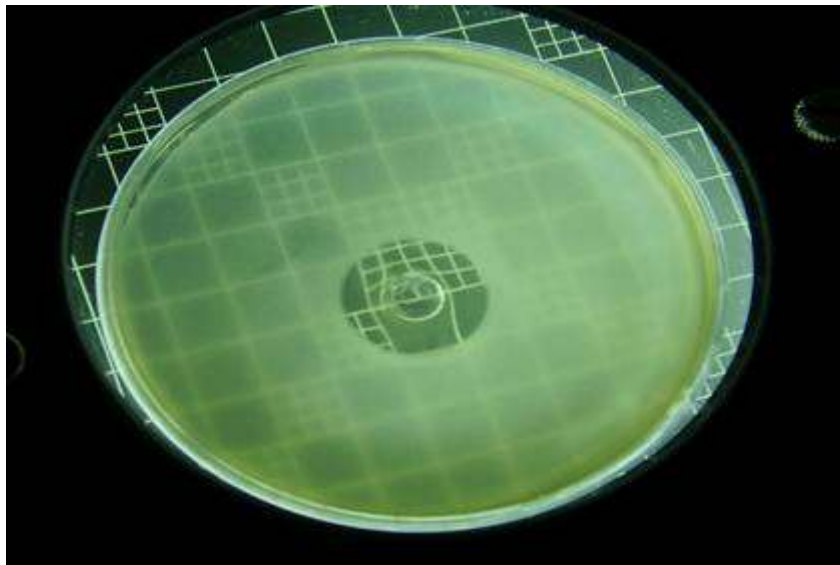
El efecto antagónico de los lactobacilos estudiados contra los patógenos ensayados, se puso de manifiesto para *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes*, sin inhibir ninguna de las cepas de *Salmonella enteritidis* (ver Tabla 1). La inhibición se relaciona principalmente con la presencia de ácidos orgánicos, pues la mayoría de los sobrenadantes neutralizados perdieron la actividad antagónica, excepto los correspondientes a las cepas de lactobacilos 37 y 58, contra *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes* respectivamente, que tuvieron un comportamiento diferente con los tratamientos físicos y químicos realizados; destaca, el antagonismo de *L. plantarum* 58 sobre *Listeria monocytogenes*, con halos de inhibición de 18 mm que desaparecieron con el tratamiento con tripsina y se mantuvieron con el calor ( ver Tabla 2 y Figura 1)

**Tabla 1. Efecto antagónico de sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* sobre bacterias patógenas**

Cepas antagónicas	Salmonella enteritidis 1 <sup>a</sup>	Salmonella enteritidis 2 <sup>b</sup>	Salmonella typhi	Listeria monocytogenes
	Diámetro de halo de inhibición (mm)			
<i>L. plantarum</i> 1	0	0	9	10
<i>L. plantarum</i> 4	0	0	0	10
<i>L. plantarum</i> 20	0	0	9	10
<i>L. plantarum</i> 37	0	0	17	10
<i>L. plantarum</i> 50	0	0	0	0
<i>L. plantarum</i> 58	0	0	0	17

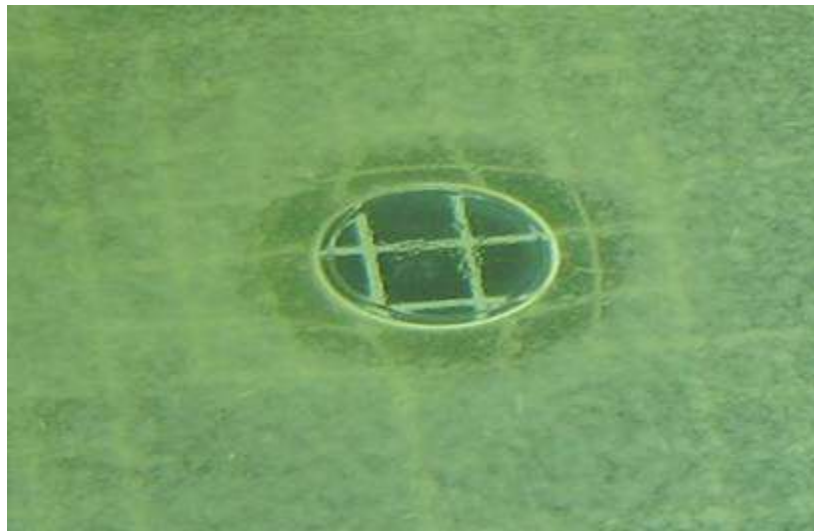
<sup>a</sup>: *Salmonella enteritidis* CVM 446; <sup>b</sup>: *Salmonella enteritidis* de brote epidémico alimentario

**Figura 1. Inhibición de *L. monocytogenes* producida por sobrenadante de *L. plantarum* 58**



Las dos cepas de *Salmonella enteritidis* estudiadas, no fueron afectadas por ninguno de lactobacilos (Tabla 1); sin embargo, al ser expuestas al sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* 37, desarrollaron halos de inhibición de 12 mm con colonias “intrahalo” (Figura 2) razón por la cual se consideró como antagonismo negativo.

**Figura 2. Detalle de halo de inhibición atípico desarrollado por *Salmonella enteritidis* con sobrenadante de la cepa *L. plantarum* 37. La flecha indica colonias “intrahalo”**



**Tabla 2. Efecto antagonístico de sobrenadantes de *Lactobacillus plantarum* con diferentes tratamientos contra *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes***

Cepas antagonicas	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
-------------------	-------------------------	-------------------------------

	Diámetro de de inhibición halo (mm)					Diámetro de de inhibición halo (mm)				
	SST	SN	SP	ST	SC	SST	SN	SP	ST	SC
<i>L. plantarum</i> 1	9	0	-	-	-	10	0	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 4	0	-	-	-	-	10	0	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 20	9	0	-	-	-	10	0	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 37	17	17	17	14	13	11	0			
<i>L. plantarum</i> 50	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 58	0	-	-	-	-	18	18	19	0	18

**SST:**Sobrenadante sin tratamiento; **SN:** Sobrenadante neutralizado; **SP:** Sobrenadante tratado con 32 µg/ml Peroxidasa; **ST:** Sobrenadante tratado con 2 mg/ml de Tripsina; **SC:** sobrenadante tratado con calor; -: ensayo no realizado considerando los resultados previos.

Aparentemente, la presencia de peróxidos en los sobrenadantes quedó descartada por los resultados obtenidos (ver Tabla 2). La cepa indicadora más sensible fue *L. monocytogenes* al ser inhibida por cinco de los lactobacilos ensayados.

### Discusión

De las seis cepas de *L. plantarum* estudiadas, solo una (la 50) no ejerció ningún efecto antagónico contra los patógenos ensayados, expresando el resto, alguna manifestación de inhibición; las cepas 1,20 y 37 inhibieron tanto a *Salmonella typhi* como a *Listeria monocytogenes*, mientras que la 4 y 58, lo hicieron exclusivamente con *Listeria* (ver Tabla 1).

Diversas especies del genero *Lactobacillus* y otros géneros bacterianos pertenecientes a las bacterias ácido lácticas (bal) tienen la capacidad de producir metabolitos antimicrobianos tales como ácidos orgánicos, CO<sub>2</sub>, acetaldehído, diacetilo, peróxido de hidrógeno, moléculas de bajo peso molecular como la reuterina y bacteriocinas (17, 18, 19). Acido benzoico, metilhidiatonina, mevalonolactona y ácidos grasos son otras moléculas de bajo peso molecular producidas por *L. plantarum* que están siendo investigadas activamente debido a su acción antagónica contra hongos (20).

La acción inhibitoria predominante, se relacionó con la presencia de ácidos orgánicos (Tabla 2), pues de las cinco cepas con actividad antagónica, cuatro perdieron esta capacidad al ser neutralizados los sobrenadantes : las cepas 1 y 20 tanto con *Salmonella typhi* como con *Listeria monocytogenes* , en tanto que las cepas 4 y 37 solamente con *Listeria*.

Los ácidos orgánicos, principalmente el ácido láctico constituyen el principal producto del catabolismo de los carbohidratos (21) y contribuyen al descenso de pH creando un ambiente hostil para la mayoría de los microorganismos. Los efectos perjudiciales de estas moléculas en los microorganismos sensibles se resumen en alteración de la permeabilidad celular, alteración del potencial de membrana y subsiguiente alteración de la Fuerza Proton Motriz, así como, descenso del pH intracelular que ocasiona la alteración de funciones celulares importantes (22). Se considera que los principales metabolitos producidos por las bal con efecto antagónico contra *Listeria monocytogenes* son el ácido láctico y las bacteriocinas, de hecho se han estudiado cepas de *L. plantarum* que producen inhibición del patógeno por acidez y son candidatas apropiadas para utilizarlas como bioconservantes de vegetales (23).

La naturaleza de la(s) molécula(s) presentes en el sobrenadante de *L. plantarum* 37 que causaron inhibición en *S. typhi* no pudo ser determinada claramente con los tratamientos aplicados, aunque se observó una disminución en el efecto cuando el sobrenadante fue tratado con tripsina y calor , lo que pareciera ser compatible con la presencia de molécula(s) de naturaleza proteica, estables al calor.

Las BAL producen péptidos de síntesis ribosomal llamados bacteriocinas; estas biomoléculas tienen un peso molecular entre 3-10 KDa, exhiben un punto isoelectrico alto y contienen un dominio hidrofobo y uno hidrofílico, adicionalmente, son muy diversos en relación a su espectro de actividad, propiedades bioquímicas y determinantes genéticos (24). Estos péptidos ejercen su actividad antimicrobiana por diferentes mecanismos que incluyen desestabilización de membrana, lisis celular, degradación de macromoléculas como ácidos nucleicos e inhibición de procesos biológicos como síntesis de proteínas, ADN, ARN y peptidoglicano (25, 26, 27). Las bacteriocinas producidas por muchas especies de las bal de origen alimentario están siendo objeto de intenso estudio debido a su potencial uso como bioconservantes. En primer son consideradas seguras e inocuas para la salud humana porque son degradadas en el tracto digestivo y aunque algunas tienen un espectro de acción limitado, pueden actuar sinérgicamente con otros sistemas de conservación (28).

Especies de *L. plantarum* pueden producir un considerable número de bacteriocinas tales como Plantaricinas A, B, D, S, T y W (29, 30, 31, 32, 33). *L. plantarum* 58 produjo una inhibición importante en *L. monocytogenes* debido a la producción de molécula(s) de naturaleza proteica estable al calor, esto se evidenció cuando el sobrenadante perdió actividad al ser tratado con tripsina y la mantuvo después del tratamiento con calor. Se conoce que la estabilidad al calor y la sensibilidad a tripsina son características de muchas bacteriocinas de bacterias grampositivas, de hecho, estas características se han observado en péptidos producidos por cepas de *L. plantarum* aisladas de derivados cárnicos y *L. sake* Lb 706 aislado de carne; en ambos casos también se detectó actividad contra *L. monocytogenes* (34).

El comportamiento de las cepas de *Salmonella enteritidis* con el sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* 37 fue inusual debido al desarrollo de halos de inhibición de 12 mm difusos caracterizados por el desarrollo de colonias dentro del halo. En este sentido, Ahn y Stiles (1990) describen también halos difusos donde no existe clara línea de demarcación del crecimiento de las bacterias indicadoras cuando ensayaron antagonismo de bacterias lácticas aisladas de carne utilizando el método de la gota (35). En todo caso estos resultados se consideraron como antagonismo negativo, pero sería interesante evaluar a futuro si se trata de un efecto bacteriostático o si ese efecto puede potenciarse.

## **Conclusiones**

Cinco de las seis cepas de *Lactobacillus plantarum* estudiadas mostraron capacidad antagónica, de las cuales, cuatro fueron por la producción de ácidos orgánicos. El comportamiento de *L. plantarum* 37 contra *Salmonella typhi* permite inferir sobre la presencia de una sustancia de naturaleza proteica estable al calor, pero frente a *Listeria*, sobre la existencia de un ácido orgánico, convirtiéndose en una cepa interesante, que debe seguir estudiándose con el objeto de establecer con mayor claridad los componentes de su sobrenadante. La cepa *L. plantarum* 58 fue la única que manifestó claramente la presencia de una sustancia de naturaleza proteica estable al calor contra *Listeria monocytogenes*, por lo que es recomendable realizar ensayos con otras cepas de la misma especie, otras especies relacionadas, además de la caracterización fisicoquímica de dicha sustancia. Y la posterior evaluación de las cualidades tecnológicas y/o probióticas de las cepas que manifestaron actividad antagónica, definirá su utilización a futuro como bioconservantes de alimentos y/o cultivo probiótico terapéutico.

## **Resumen**

El antagonismo de *Lactobacillus plantarum* contra bacterias indeseables tiene aplicaciones importantes en la bioconservación de los alimentos y en la terapia probiótica. Con el propósito de estudiar la capacidad antagónica de 6 cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas de pastizal de una finca lechera e identificadas con los números 1, 4, 20, 37, 50, y 58, se evaluó el antagonismo de cada cepa contra *Salmonella enteritidis* CVCN 446, *Salmonella enteritidis* aislada de un brote de ETA en Mérida-Venezuela, *Salmonella typhi* aislada de leche cruda de una finca local y *Listeria monocytogenes* CVCN 497. Con la técnica de difusión en pocillos se probaron sobrenadantes de las cepas sometidos a neutralización con NaOH 1N, exposición a 32 µg/ml de peroxidasa, tratamiento con 2 mg/ml de tripsina y calentamiento a 120 °C por 20 minutos, con respectivos controles posteriores de actividad antagónica residual. *L. plantarum* 1, 4, 20, 37 exhibieron actividad antagónica (AA) contra *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes* con halos de inhibición de 9-11 mm debido a la presencia de ácidos orgánicos. No pudo determinarse la naturaleza de los compuestos del sobrenadante de *L. plantarum* 37 activos contra *Salmonella typhi*; mientras que la AA de *L. plantarum* 58 contra *Listeria monocytogenes* evidenciada por halos de 18 mm se perdió con el tratamiento de tripsina, pero no fue afectada por el calor, lo que parece indicar la presencia de molécula(s) de naturaleza proteica estable(s) al calor. Las cepas ensayadas poseen capacidad antagónica que debe seguir estudiándose, particularmente, *Lactobacillus*

*plantarum* 58 por su interesante acción contra *Listeria monocytogenes* la cepa 37 por su antagonismo a *S. typhi*.

**Palabras claves:** Efecto antagónico, *Lactobacillus plantarum*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*

### **Abstract**

The antagonism of *Lactobacillus plantarum* against undesirable bacteria has important applications in food biopreservation and in probiotic therapy. The antagonistic capacity of six strains of *L. plantarum* isolated from grass of milking farm which were labeled *L. plantarum* 1, 4, 20, 37, 50, 58 and tested against *Salmonella enteritidis* CVCM 446, *Salmonella enteritidis* isolated from a food outbreak in Mérida- Venezuela, *Salmonella typhi* isolated from raw milk collected in a local farm and *Listeria monocytogenes* CVCM 497. The well-agar diffusion method was used with the supernatant of each lactobacilli strain neutralized with NaOH 1N, treatments with peroxidase (32 µg/ml) and with trypsin (2 mg/ml) and heating at 120°C for 20 minutes, with their respective subsequent controls of residual antagonistic activity. *L. plantarum* 1, 4, 20, 37, 50 and 58 showed antagonistic activity (AA) against *S. typhi* and *L. monocytogenes* with inhibition zone of 9-11 mm due to the presence of organic acids. The chemical nature of the supernatant of *L. plantarum* 37 active against *Salmonella typhi* could not be established, whereas the AA of *L. plantarum* 58 against *L. monocytogenes* which showed inhibition zone of 18 mm was lost with the trypsin treatment but was not affected by heat treatment indicating the presence of heat stable molecule (s) of protein nature.

The strains tested showed antagonistic activity that may require further studies, particularly *L. plantarum* 58 for its interesting action against *Listeria monocytogenes* and strain 37 for its antagonism against *S. typhi*.

**Keys words:** Antagonist effect, *Lactobacillus plantarum*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*

### **Agradecimientos**

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico ( CDCHT) de la Universidad de los Andes por el financiamiento otorgado bajo el código FA-385-06-03-EM y al FONACIT por el fortalecimiento al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis bajo el código F-2000001633.

### **Referencias**

1. Durlu-Ozcaya, F., V. Xanthopoulos, N. Tunail and E. Litopoulou-Tzanetaki. 2001. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewe`s milk. J. Appl. Microbiol. 91 (5): 861-870.
2. Van de Guchte, M., S. Ehrlich, and E. Maguin. 2001. Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. J. Appl. Microbiol. 91(1): 147-153
3. Amores, R., A. Calvo, J. Maestre y D. Martínez-Hernández. 2004. Probióticos. Rev. Esp. Quimioterap. 17(2): 131-139
4. Dunne,C., L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G. O'Sullivan, F. Shanahan, and K. Collins. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. Am. J. Clin Nutr. 73 (suppl): 386S-9S.
5. Schillinger, U. and F. Lücke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 55 (8): 1901-1906.
6. Cabeci, A., and C. Gükaran. 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. Food Microbiology. 20 (5): 511-518
7. Cintas-Izarra, L. y P. Casaus-Lara. 1998. La necesidad de conservar los alimentos. Alimentación, Equipos y Tecnología. Diciembre (10): 89-93.

8. Molin, G. 2001. Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v.. Am. J. Clin Nutr. 73 (suppl): 380S–5S.

9. Holo H, Z. Jemiknic, M. Daeschel, S. Stevanovic and I. Nes. 2001. Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology*. **147 (12)**: 643-651

10. Sjögren, J., J. Magnusson, A. Broberg, J. Schnürer and L. Kenne. 2003. Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. Appl. Environ. Microbiol. 69 (12): 7554-7557.

11. Ennahar, S., D. Aoude-Werner, O. Sorokine, A. Dorsselaer, F. Bringel, J. Hubert and C. Hasselmann. 2003. Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. Appl. Environ. Microbiol. 62 (12): 4381-4387.

12. Tagg, J. and R. Mc Given. 1971. Assay System for bacteriocins. Appl. Environ. Microbiol. 21 (5): 34.

13. Ahn, C. and A. Stiles 1990. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed meats. J. Appl. Bacteriol. 69: 302-310.

14. Oh, S., H. Kim and W. Worobo. 2000. Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. J. Dairy Sci. 83 (12): 2747-2752.

15. Bacteriocinas: caracterización biológica, genética y bioquímica preliminar. Metodología utilizada en investigaciones de la Universidad de Granada.

<http://www.ugr.es/~anpenet/metodologia.html>

16. Oh, S., *et al*, *Op. cit*.

17. Cintas, L., P. Casaus, y P.E. Hernández. (2000). Actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas (II). Alimentación, Equipos y Tecnología. Septiembre (7): 109-119

18. Piard, J. and M. Desmazeaud 1991. Inhibiting factors produced by Lactic Acid Bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. Lait. 71: 525-541

19. Piard, J. and M. Desmazeaud. 1991. Inhibiting factors produced by Lactic Acid Bacteria. 2. Bacteriocins and others antibacterial substances. Lait. 72: 113-142.

20. Sjögren, J., *et al*, *Op cit*.

21. González de Llano, D., A. Rodríguez and P. Cuesta. 1996. Effect of lactic starter cultures on the organic acid composition of milk and cheese during ripening-analysis by HPLC. J. Appl. Bacteriol. 80 (5): 570-576.

22. Cintas, L., P. Casaus y P. E. Hernández. 2000. Actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas (I). Alimentación, Equipos y Tecnología. Julio-Agosto (6): 83-90.

23. Wilson, A., D. Sigee and H. Epton. 2005. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. J. Appl. Microbiol. 99 (6): 1516-1522.

24. De Martinis, E., V. Alves y B. Franco. 2002. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by Lactic Acid Bacteria in the meat products. Food Rev. Internacional. 18 (2): 191-208.

25. *Idem*.

26. Cintas, L., *et al*, *Op. cit*.

27. Piard, J. and M. Desmazeaud. *Op. cit.*
28. Martínez-Magro, M., J. Martínez-Gorbacho, C. Herranz-Sombes, A. Suárez-Gea y J. Rodríguez-Gómez. 2000. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas. 2. Modo de acción, biosíntesis, aplicaciones y tendencias futuras. *Alimentaria*. 37: 67-74.
39. Lash, B., T. Mysliwiec y H. Gourama. 2005. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC8014). *Food Microbiol.* 22 (2/3): 199-204
30. Maldonado A, J. Ruiz-Baraba and R. Jiménez-Díaz. 2003. Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC88. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (1): 383-389
31. Holo H., *et al*, *Op. cit.*
32. Schillinger, U. and F. Lücke, 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (8): 1901-1906.
33. Nowroozi, J., M. Mirzaii and M. Morouzi. 2004. Study of *Lactobacillus* as probiotic bacteria. *Iranian J. Publ. Health.* 33 (2):1-7.
34. Schillinger, U. and F. Lücke. *Op. cit.*
35. Ahn, C. and A. Stiles. *Op. cit.*