

# Actividad antagonista de bacterias lácticas aisladas del medio marino contra cepas de *Listeria*

*Antagonistic activity of lactic bacteria isolated from marine environment against Listeria strains*

*Atividade antagonista de bactérias lácticas isoladas do meio marinho contra cepas de Listeria*

► Emilio Rogelio Marguet<sup>1a</sup>, Marisol Vallejo<sup>2a</sup>, Verónica Sierralta Chichisola<sup>3b</sup>, Jorge León Quispe<sup>4c</sup>

---

<sup>1</sup> Doctor en Bioquímica

<sup>2</sup> Doctora en Biología

<sup>3</sup> Médica Veterinaria

<sup>4</sup> Magister en Ciencias Microbiológicas

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew), Universidad Nacional de la Patagonia. Roca 115, (9100) Trelew, Argentina.

<sup>b</sup> Instituto del Mar del Perú, Lima, Perú.

<sup>c</sup> Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

## Resumen

En el presente trabajo se estudiaron 74 bacterias lácticas para determinar su capacidad de inhibir el desarrollo de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 o *L. innocua* ATCC 33090. Dentro de las 7 que exhibieron actividad, 2 se seleccionaron para estudios complementarios y se identificaron por métodos fenotípicos y genotípicos como *Enterococcus mundtii* Tw 56 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Tw 34. Después de la neutralización con NaOH y tratamiento térmico (100 °C y 121 °C durante 5 min) la actividad antagonista del sobrenadante libre de células se mantuvo activa. El tratamiento con lisozima, lipasa y catalasa no afectó la actividad antimicrobiana. Sin embargo, la actividad enzimática de la tripsina suprimió la acción inhibitoria del sobrenadante, confirmando la naturaleza proteica del compuesto activo. En ambos casos, el título de la actividad antilisteria no se vio afectado luego de la inducción mediada por nisina o galactosa. La combinación de los sobrenadantes libres de células no exhibió antagonismo o sinergia. Las características bioquímicas y fisicoquímicas de los agentes antilisteria producidos por las cepas seleccionadas sugieren que pueden ser clasificadas como bacteriocinas tipo I o II. Se deben realizar estudios complementarios para determinar el uso potencial de las cepas seleccionadas como cultivos bioprotectores en el control de la seguridad alimentaria.

**Palabras clave:** bacterias lácticas \* *Listeria monocytogenes* \* bacteriocinas \* ambiente marino

## Summary

*In the present work, 74 strains of lactic bacteria isolated from the marine environment were studied in order to determinate their ability to inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 or *L. innocua* ATCC 33090.*

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Among the 7 strains that exhibited some activity, 2 were selected for further studies and identified by phenotypic and genotypic methods as *Enterococcus mundtii* Tw 56 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Tw 34. After neutralization with NaOH and heat treatment (100 °C and 121 °C for 5 min) the antagonistic activity of cell-free supernatants of the two strains studied remained active. Treatment with lysozyme, lipase and catalase did not affect the antimicrobial activity; however enzymatic activity of trypsin abolished the inhibitory action of the supernatant, confirming the proteinaceous nature of the active compound. In both cases, the titre of antilisterial activity was not affected after nisin or galactose-mediated induction. The combination of cell-free supernatants of both strains did not display antagonism or synergy. The biochemical and physicochemical characteristics of antilisterial agents produced by the selected strains suggest that they can be classified as type I or II bacteriocins. Further studies will be addressed to determine the potential use of the selected strains as bioprotective cultures in food safety control.

**Key words:** lactic bacteria \* *Listeria monocytogenes* \* bacteriocins \* marine environment

## Resumo

No presente trabalho foram estudadas 74 bactérias lácticas para determinar sua capacidade de inibir o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ou *L. innocua* ATCC 33090. Dentro das 7 que exibiram atividade, 2 foram selecionadas para estudos complementares e se identificaram por métodos fenotípicos e genotípicos como *Enterococcus mundtii* Tw 56 e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Tw 34. Depois da neutralização com NaOH e tratamento térmico (100 °C e 121 °C durante 5 min) a atividade antagonista do sobrenadante livre de células se manteve ativa. O tratamento com lisozima, lipase e catalase não afetou a atividade antimicrobiana. Entretanto, a atividade enzimática da tripsina suprimiu a ação inibidora do sobrenadante, confirmando a natureza proteica do composto ativo. Em ambos os casos, o título da atividade antilisteria não se viu afetado depois da indução mediada por nisina ou galactose. A combinação dos sobrenadantes livres de células não exibiu antagonismo ou sinergia. As características bioquímicas e fisiológicas dos agentes antilisteria produzidos pelas cepas selecionadas sugerem que podem ser classificadas como bacteriocinas tipo I ou II. Devem ser realizados estudos complementares para determinar o uso potencial das cepas selecionadas como culturas bioprotetoras no controle da segurança alimentar.

**Palavras chave:** bactérias lácticas \* *Listeria monocytogenes* \* bacteriocinas \* ambiente marinho

## Introducción

*Listeria monocytogenes* es un microorganismo ubicuo de amplia distribución en la naturaleza y es un frecuente contaminante de alimentos (1) (2). Tiene la capacidad de infectar y reproducirse en el citoplasma de diversos tipos de células lo que le permite atravesar las barreras intestinal, meníngea y placentaria (1). Su capacidad para tolerar amplios rangos de pH, temperatura y concentración de sales constituye una propiedad que facilita la colonización de una gran variedad de alimentos como carnes, leche, vegetales, pescados y sus respectivos derivados (3) (4). En definitiva, estas características convierten en muy dificultosas las estrategias encaminadas a conseguir su ausencia total en los alimentos destinados al consumo humano, independientemente del origen (vegetal o animal) de los mismos.

Esta bacteria es la única especie del género *Listeria* que produce infección en humanos y ha sido la causa del aumento de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), especialmente en niños, ancianos y pacientes inmunocomprometidos. La listeriosis humana puede presentarse como epidemias o en forma de casos esporádicos de baja frecuencia. Sin embargo, su tasa de mortalidad es alta, ya que es responsable de aproxi-

madamente la tercera parte de las muertes atribuidas a patógenos de origen alimentario (5).

La aparición y propagación de cepas de bacterias patógenas transmitidas por alimentos ha inducido el desarrollo de nuevas estrategias de control que incluyen la búsqueda de nuevos compuestos de probada eficacia. Sin embargo, dentro del público consumidor, existe una alta demanda de alimentos que contengan concentraciones mínimas o nulas de conservantes químicos. Por ello la industria alimenticia ha desarrollado un gran esfuerzo en la búsqueda de antimicrobianos naturales que pueden ser empleados para controlar o eliminar el desarrollo de patógenos responsables de ETA (6) (7).

En los últimos años los organismos marinos han emergido como una fuente potencial de nuevos compuestos activos y de amplio uso en la industria farmacéutica y alimenticia (8) (9). Las condiciones especiales del ámbito marino: bajas temperaturas, alta concentración de sales, escasez de nutrientes y competencia por nichos específicos, comprenden factores fisicoquímicos y biológicos que ejercen una presión selectiva que sólo permite el desarrollo de microorganismos con un alto grado de especialización metabólica.

Dentro de las bacterias de origen marino (9), se ha intensificado el estudio de bacterias lácticas (BAL), y se

puso especial interés en la búsqueda de cepas productoras de metabolitos con capacidad antibiótica (10) (11). Las BAL se utilizan como fermentos en la industria láctea y es posible aislarlas de diversos nichos ecológicos y en una gran variedad de alimentos, donde desarrollan un importante papel al contener o limitar la presencia de *L. monocytogenes* y otros patógenos. La capacidad inhibitoria de las BAL se basa en la generación de productos metabólicos que exhiben mecanismos inespecíficos (ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo) o específicos como es el caso de las bacteriocinas (12) (13). Estos pequeños péptidos de síntesis ribosomal (11) actúan sobre la membrana de las células blanco alterando su permeabilidad. Se han identificado más de 50 bacteriocinas producidas por BAL dentro de las cuales, la nisina y la lactocina son producidas en forma industrial y hasta nuestros días las únicas admitidas para ser utilizadas como aditivos en alimentos (11). Un grupo especial de bacteriocinas producidas por BAL son las tipo pediocinas que pertenecen a la Clase IIa y son reconocidas por ser efectivos agentes antilisteria (13) (14).

En el presente trabajo se describe la capacidad inhibitoria contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 y *L. innocua* ATCC 33090 de dos cepas de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas aisladas de ambientes marinos. También se describen las principales características físico-químicas de los agentes antagonistas.

## Materiales y Métodos

### AISLAMIENTO DE BACTERIAS LÁCTICAS

Se tomaron muestras del tracto digestivo, tegumento y branquias de peces, sedimentos marinos y agua de mar. Las muestras se trasladaron a 4° C hasta el laboratorio y se procesaron dentro de las 6 horas. El enriquecimiento primario se realizó en caldo de Mann, Rogosa & Sharp (MRS), MRS ajustado a pH 4,6 y 5,4; MRS sin acetato a pH 8, MRS con NaCl al 6,5% y caldo M17. Los enriquecimientos se incubaron a 25 y 30 °C durante 24 y 48 h respectivamente. Luego del período de incubación los cultivos líquidos se repicaron a agar MRS suplementado con ácido nalidíxico (40 µg/mL) y cicloheximida (10 µg/mL) y se incubaron durante 24 h (30 °C) y 48 h (25 °C).

### IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA

Las colonias sospechosas se sometieron a las siguientes pruebas bioquímicas: coloración de Gram, catalasa, oxidasa, fermentación de azúcares y producción de gas (CO<sub>2</sub>) a partir de glucosa.

### IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

Luego de una incubación a 32 °C durante 12 h en caldo MRS, las cepas de BAL seleccionadas sobre la base

de su actividad antagonista, se centrifugaron a 12.000 g durante 5 min y el ADN se extrajo utilizando un equipo comercial de purificación Wizard Genomics (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.).

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó el gen que codifica ARNr 16S con un termociclador Multigene Gradient (Labnet International Inc., Woodbridge, NJ, EE.UU.), usando los cebadores universales para procariotas 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' y 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3', según lo descrito por DeLong (15). Ambas hebras de los productos de PCR se secuenciaron utilizando los servicios comerciales de Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (16).

### ENSAYOS ANTIMICROBIANOS DE LOS SOBRENADANTES

Las cepas de BAL se cultivaron en caldo MRS a 32 °C hasta alcanzar la fase estacionaria (12-16 h). Luego del período de incubación los medios se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 min. Los sobrenadantes libres de células se emplearon en el ensayo antimicrobiano que se realizó por el método de difusión en placa (14). Se colocaron 50 µL de los sobrenadantes en pocillos practicados en placas de agar BHI sembrados previamente con 50 µL de un cultivo de una noche (0,5 de la escala Mc Farland) de las cepas *L. monocytogenes* ATCC 7644 o *L. innocua* ATCC 33090. Las placas se mantuvieron a 4-8 °C durante 2 h y luego se incubaron a 35 °C durante 18-24 h.

### INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, pH Y TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS SOBRE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA

Los sobrenadantes crudos se trataron con NaOH 0,5 N hasta alcanzar la neutralidad. Los sobrenadantes neutralizados se sometieron posteriormente a una temperatura de 100 °C durante 5 min y 121 °C durante 5 min. En ambos casos la actividad residual se determinó por el procedimiento previamente descrito. La sensibilidad a enzimas se llevó a cabo determinando la actividad residual luego de tratar los sobrenadantes durante 1 h con tripsina, lipasa, lisozima y catalasa (5 mg/mL) en las condiciones óptimas para cada enzima.

### TITULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA

El título de la actividad antagonista de las cepas seleccionadas se realizó con una modificación de la técnica sugerida por Yaakoubi *et al.* (17). Diluciones sucesivas al medio de los sobrenadantes neutralizados y calentados durante 5 min a 100 °C se enfrentaron a una dilución (10<sup>-4</sup>) en caldo cerebro corazón de un cultivo de una noche de

*L. monocytogenes* ATCC 7644 o *L. innocua* ATCC 33090. Luego de una incubación a 35 °C durante 24 h se observó la inhibición del crecimiento producida por la mayor dilución de sobrenadante. El título en unidades arbitrarias (UA) se definió como la inversa de esta dilución.

#### INDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NISINA

Las cepas de BAL seleccionadas se incubaron en caldo MRS galactosa (20 g/L) o en caldo MRS suplementado con nisina (10 µg/mL) (2) y se incubaron a 32 °C hasta alcanzar la fase estacionaria. Luego del período de incubación se realizaron los ensayos de actividad antagonista según el método descrito anteriormente (18).

#### ENSAYO DE SINERGIA

El efecto antagónico de la combinación de los sobrenadantes se llevó a cabo utilizando volúmenes iguales de los máximos títulos y posteriores diluciones al medio para determinar el título de la combinación. Para establecer la existencia de sinergia, indiferencia o antagonismo se utilizó el método propuesto por Stratton y Cooksey (19), denominado Concentración Inhibitoria Fraccional (CFI).

## Resultados

Se aislaron 74 BAL de las cuales 7 exhibieron actividad antagonista contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 y *L. innocua* ATCC 33090. De las 7 cepas activas se seleccionaron dos que posteriormente se identificaron por medios fenotípicos y genotípicos como *Enterococcus mundtii* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Ambas cepas ingresaron a la colección de la Cátedra de Biología Celular y Molecular (Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia) bajo la denominación de *E. mundtii* Tw 56 y *L. lactis* subsp. *lactis* Tw 34. En la Figura 1 se observan los halos de inhibición producidos por la acción antagonista de las cepas estudiadas contra *L. monocytogenes* ATCC 7644.

Luego de tratar los sobrenadantes obtenidos a 32 °C con NaOH hasta alcanzar la neutralidad, el efecto inhibitorio no exhibió modificaciones. Los mismos resultados se obtuvieron cuando los sobrenadantes neutralizados se sometieron al calentamiento de 100 °C ó 121 °C durante 5 min.

El tratamiento enzimático llevado a cabo con lipasa, catalasa y lisozima no alteró la actividad antagonista ejercida por los sobrenadantes de las 2 cepas seleccionadas, en cambio el tratamiento con tripsina abolió por completo la capacidad de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 o *L. innocua* ATCC 33090.

Los títulos de actividad antagonista contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 y *L. innocua* ATCC 33090 de *E. mundtii* Tw 56 fueron de 1600 UA/mL y 6400 UA /mL respectivamente, mientras que *L. lactis* subsp. *lactis* Tw 34

exhibió actividades de 256 UA/mL y 8 UA/mL, respectivamente. No hubo aumento de la actividad antilisteria en ninguno de los dos casos luego de someter a las cepas a la inducción con nisina o galactosa.

La combinación de sobrenadantes de ambas cepas en estudio no produjo sinergismo ni antagonismo contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 o *L. innocua* ATCC 33090.

## Discusión y Conclusiones

El alto número de aislamientos de cepas de BAL del medio marino indica que, no obstante los altos requerimientos nutricionales exigidos por estos microorganismos, constituyen un grupo con una gran capacidad de adaptación a medios adversos.

La búsqueda de BAL en medios terrestres con propiedades biotecnológicas es una práctica difundida, en cambio las investigaciones destinadas a ese objetivo en el medio marino constituyen una tendencia reciente (8) (9). También se puede considerar alto el número de cepas (7/74) con capacidad antilisteria, por lo que el ámbito marino donde se realizó el trabajo constituiría un ambiente propicio para este tipo de búsqueda.

La actividad antagonista contra las cepas de *Listeria* de los sobrenadantes de las 2 bacterias seleccionadas no sufrió alteraciones cuando se neutralizaron con NaOH, fenómeno que demuestra que la inhibición de crecimiento no era producida por efecto de los ácidos orgánicos generados por el metabolismo de las BAL. Tampoco el efecto antimicrobiano se vio afectado cuando los sobrenadantes se sometieron, luego de la neutralización, a una

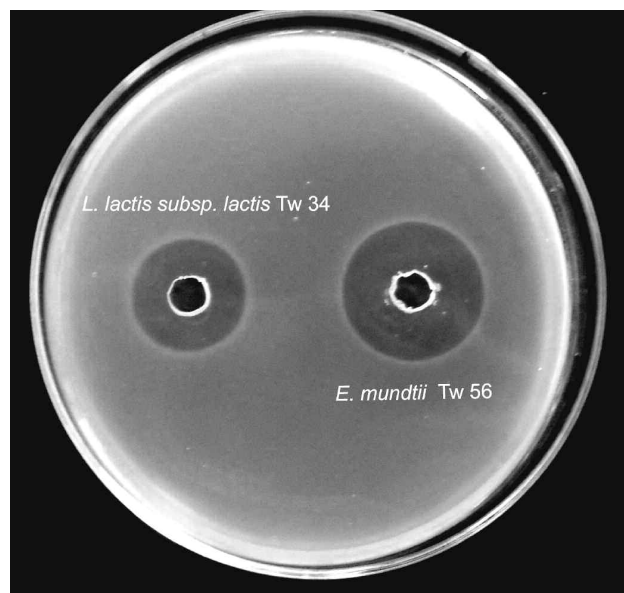


Figura 1. Actividad antagonista de *Enterococcus mundtii* Tw 56 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Tw 34 contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 por el método de difusión en placa.



temperatura de 100 °C ó 121 °C durante 5 minutos, demostrándose la estabilidad del principio activo en las condiciones impuestas.

Algunas cepas de BAL tienen la capacidad de producir peróxido de hidrógeno, molécula con gran capacidad antagonista que puede ejercer su acción sobre una gran variedad de microorganismos. Sin embargo, la capacidad inhibitoria de los sobrenadantes ensayados no se vio afectada luego del tratamiento enzimático con catalasa y en consecuencia es posible afirmar que no existe una relación entre ese fenómeno y la presencia del metabolito.

La actividad enzimática de lipasa y lisozima no alteró la actividad antilisteria de los sobrenadantes lo que permite descartar la existencia de lípidos o azúcares involucrados con la actividad del principio activo. Luego de 1 hora de incubación, la actividad proteolítica de la tripsina inactivó por completo la capacidad inhibitoria de los sobrenadantes, demostrándose de esta manera que el principio activo era de naturaleza proteica.

Las características determinadas en las pruebas descritas permiten afirmar que las 2 cepas estudiadas ejercen su actividad antagonista gracias a la síntesis de sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas (SITB). En ambos casos la estabilidad térmica de estas moléculas indicaría que se trata de péptidos de bajo peso molecular con actividad específica contra cepas del género *Listeria*, propiedades que permitirían incluirlas dentro del grupo de bacteriocinas clase I o II (11) (13) (14).

Dentro del grupo de bacterias activas, *E. mundtii* Tw 56 fue seleccionada sobre la base de su alta actividad antagónica contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 (1600 UA/mL) y *L. innocua* ATCC 33090 (6400 UA/mL). *L. lactis* subsp. *lactis* Tw 34, exhibió una actividad más baja (256 UA/mL contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 y 8 UA/mL contra *L. innocua* ATCC 33090), sin embargo, fue seleccionada por constituir una bacteria generalmente reconocida como segura (GRAS), potencialmente útil para ser empleada en la industria alimenticia como biopreservante con capacidad antibiótica (20).

En el caso particular de estas 2 cepas la actividad antagónica no aumentó luego de la inducción con nisina y galactosa por lo que se desestima a la nisina como bacteriocina implicada en la acción inhibitoria (18). Algunas cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* son productoras de esta bacteriocina, una de las pocas admitidas para su uso como aditivo en alimentos y en consecuencia de alto valor comercial (11). Los enterococos son raros productores de nisina y lo hacen sólo cuando luego de una transferencia genética horizontal, expresan el transposón Tn5307 (21), razón por la que se sometió a *E. mundtii* Tw 56 a las pruebas de inducción.

Muchas bacteriocinas con potencial comercial son producidas por cepas del género *Enterococcus*, sin embargo la inclusión de este género de BAL en alimentos es ampliamente discutida por sus implicaciones en la

salud humana (22) (23). En consecuencia, numerosas investigaciones han enfocado sus esfuerzos en la producción heteróloga de bacteriocinas (5). Los miembros del género *Lactococcus* se presentan como una buena opción por su inocuidad y porque desde el punto de vista filogenético son cercanos al género *Enterococcus*, facilitando de esta manera los procesos de recombinación genética.

En el caso particular de este trabajo, *L. lactis* subsp. *lactis* Tw 34 se presenta como un buen candidato para expresar en forma heteróloga los genes implicados en la síntesis de la bacteriocina del *E. mundtii* Tw 56. La combinación de ambas bacteriocinas no produjo sinergismo ni antagonismo en la actividad antibiótica por lo que la expresión de ambas en un organismo recombinante no aumentaría su capacidad de inhibición pero podría ampliar el espectro de microorganismos blanco.

#### CORRESPONDENCIA

EMILIO R. MARGUET

Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew),  
Universidad Nacional de la Patagonia. Roca 115,  
9100 TRELEW

Dirección electrónica: emarguet@yahoo.com.ar

#### Referencias bibliográficas

1. Jianshun C, Xiaokai L, Lingli J, Peijie J, Wei W, Dongyou L, *et al.* Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. *Food Microbiol* 2009; 26: 103-11.
2. Byelashov OA, Carlson BA, Geornaras I, Kendall PA, Scanga JA, Sofos JN. Fate of post-processing inoculated *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged pepperoni stored at 4, 12 or 25 °C. *Food Microbiol* 2009; 26: 77-81.
3. Privat K, Ghalfi H, Dortu C, Evrard P, Thonart P. Combined use of bacteriocin-producing strains to control *Listeria monocytogenes* regrowth in raw pork meat. *Int J Food Sci Technol* 2010; 45 (5): 937-43
4. Privat K, Dortu C, Dubois-Dauphin R, Vandenbol M, Thonart P. Plasmid-associated bacteriocin production by *Lactobacillus* LMG21688 suppresses *Listeria monocytogenes* growth rebound in a food system. *FEMS Microbiol Lett* 2010; 306: 37-44.
5. Liu L, O'Conner P, Hill C, Ross R. Controlling *Listeria monocytogenes* in cottage cheese through heterologous production of enterocin A by *Lactococcus lactis*. *J Appl Microbiol* 2008; 104: 1059-66.
6. Twomey D, Ross RP, Ryan MP, Meaney B, Hill, C. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek* 2002; 82, 165-85.
7. Cotter PD, Hill C, Ross, P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 777-88.

8. Longeon A, Peduzzi J, Barthe'lemy M, Corre S, Nicolas JL, Guyot M. Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. *Mar Biol* 2004; 6: 633-41.
9. Desriac F, Defer D, Bourgougnon N, Brillet B, Le Chevallier P, Fleury Y. Review: bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Mar Drugs* 2010; 8 (4): 1153-77.
10. Jones RJ, Hussein HM, Zagorec M, Brightwell G, Tagg JR. Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiol* 2008; 25 (2): 228-34.
11. Papagianni M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol Adv* 2003; 21: 465-99.
12. Izquierdo E, Marchioni E, Aoude-Werner D, Hasselmann C, Ennahar S. Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol* 2009; 26: 16-20.
13. Eijsink VG, Skeie M, Middelhoven PH, Brurberg MB, Nes IF. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 3275-81.
14. Floriano B, Ruiz-Barba JL, Jiménez-Díaz R. Purification and genetic characterization of Enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 4883-90.
15. De Long EF. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 5685-9.
16. Altschul SF, Gish W, Miller M, Myers EW Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-10.
17. Yaakoubi K, Benkerroum N, Wiorowski F, Sanson F, Haydersah J, Chevallier I. Development of a multiwell antagonistic activity assay for the detection of bacteriocin production by lactic acid bacteria. *J Rapid Meth Autom Microbiol* 2009; 17: 32-45.
18. Chandrapati S, O'Sullivan DJ. Characterization of the promoter regions involved in galactose and nisin-mediated induction of the *nisA* gene in *Lactococcus lactis* ATCC 11454. *Mol Microbiol* 2002; 46: 467-77.
19. Stratton CW, Cooksey RC. Susceptibility test: special test. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th edition. Ed. by Ballows A, Hausler Jr WJ, Herrmann KL, Isenberg HD and Shadomy HJ. Washington DC: American Society for Microbiology; 1991. p. 1153-200.
20. Gálvez A, Abriouel H, Lucas Lopéz R, Ben Omar N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol* 2007; 120: 51-70.
21. Broadbent JR, Sandine WE, Kondo JK. Characteristics of *Tn5307* exchange and intergeneric transfer of genes associated with nisin production. *Appl Microbiol Biotechnol* 1995; 44: 139-46.
22. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 1628-35.
23. Marguet ER, Vallejo M, Olivera NL. Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos ovinos. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2008; 42 (4): 543-8.

**Aceptado para su publicación el 9 de diciembre de 2010**