

Actividad antimicrobiana de *Weissella confusa* y sus metabolitos frente a *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

Antimicrobial activity of *Weissella confusa* and its metabolites against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*

Liliana Serna Cock*, Cruz Elena Enríquez Valencia**

Resumen

Con el fin evaluar el campo de aplicación potencial de una bacteria ácido láctica y de sus metabolitos, se realizó la cinética de la actividad antimicrobiana de *W. confusa* y de sus metabolitos contra *E. coli*, y *K. pneumoniae*, dos patógenos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos. La producción de *W. confusa* se realizó por fermentación discontinua en sustrato comercial MRS. Se realizaron tres fermentaciones durante 6 horas, sin aireación, agitación continúa 33°C y 100 rpm. Cada hora de fermentación se separaron tres sustancias biológicas, *W. confusa* con sus metabolitos (W+W10b), células de *W. confusa* libres de metabolitos (W) y metabolito (W10b) y se midió la actividad antimicrobiana contra los patógenos *E. coli*, y *K. pneumoniae*. Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos y tiempo de fermentación. Para *E. coli* el tratamiento W presentó la mayor actividad antimicrobiana, la cual se obtuvo entre la cuarta y sexta hora de fermentación (2.45 cm de diámetro promedio de inhibición). Para *K. pneumoniae*, los tratamientos W y W+W10b presentaron actividad antimicrobiana entre la cuarta y quinta hora de fermentación, sin diferencia significativa entre ellos. *W. confusa* y el metabolito W10b demostraron poseer capacidad antimicrobiana contra *E. coli* y *K. pneumoniae*, lo cual sugiere que *W. confusa* y W10b podrían utilizarse como alternativa de bioconservación o bioprotección de alimentos frescos y procesados, para alimentación humana y animal; y podría convertirse en una alternativa al uso de antibióticos para enfermedades causadas por *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Palabras clave: bioconservación, alimentos, enfermedades, aplicaciones biotecnológicas.

Summary

The kinetic of antimicrobial activity of *Weissella confusa* and their metabolites against *E. coli*, and *K. pneumoniae*, (two pathogens causing foodborne illness) was evaluated, in order to know the possible use in food processing. *W. confusa* was produced by batch fermentation using MRS commercial substrate. Three fermentations, of 6 hours at 33 °C, without aeration, stirring continuously (100 rpm) were performed. Every hour of fermentation, three biological substances, *W. confusa* with their metabolites (W + W10b), *W. confusa* free cells metabolites (W), and metabolite (W10b) were separated, and subsequently the antimicrobial activity against pathogenic *E. coli* and *K. pneumoniae* was measured. Statistically significant differences between treatments and fermentation time were found. Treatment (W) against *E. coli*, showed the greatest antimicrobial activity, it was obtained between the fourth and sixth hours of fermentation (2.45 cm diameter average inhibition). In treatments W and W + W10b against *K. pneumoniae*, statistically significant differences between them were not found. The antimicrobial activity was shown between the fourth and fifth hour of fermentation. *W. confusa* and W10b have antimicrobial activity against *E. coli* and *K. pneumoniae*, suggesting that W and W10b could be used as an alternative to biopreservation or bioprotection of fresh and proces-

* Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Facultad de Ingeniería y Administración.

** Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

sed food for human and animal consumption, and could become an alternative to antibiotics used for diseases caused by *E. coli* and *K. pneumoniae*.

Key words: bioconservation, food, diseases, biotechnology applications.

Recibido: noviembre 15 de 2012 **Aprobado:** noviembre 7 de 2013

Introducción

Durante las dos últimas décadas, cepas mutantes resistentes a antibióticos que producen β -lactamasas de amplio espectro, han surgido entre las Enterobacteriaceas, principalmente, *E. coli* y *K. pneumoniae* (Wong-Beringer *et al.*, 2002). Tanto *E. coli* como *K. pneumoniae* son patógenos que están presentes en alimentos (Yoder *et al.* 2006; Shahid *et al.*, 2009; Calbo *et al.*, 2011). Cepas patógenas de *E. coli* pueden causar diferentes enfermedades las cuales se transmiten fácilmente a través de los alimentos, siendo la gastroenteritis la enfermedad más común (Acuña *et al.*, 2012); sin embargo, puede producir otros síndromes como el síndrome urémico hemolítico (Gould *et al.*, 2009). Por su parte, *K. pneumoniae*, es un importante patógeno nosocomial que usualmente causa infecciones del tracto urinario, neumonía (Podschun y Ullman, 1998), diarrea con sangre (Guerin *et al.*, 1998) y abscesos purulentos (Casella *et al.*, 2009). En general, la magnitud de los problemas microbiológicos en la seguridad alimentaria han sido claramente reflejados y el surgimiento de patógenos que no había sido asociados a infecciones alimentarias es una preocupación importante (Gálvez *et al.*, 2007).

De otro lado, las bacterias ácido lácticas (BAL) están siendo ampliamente investigadas como agentes biológicos naturales para ser utilizadas en diferentes campos de aplicación. Las bacterias ácido lácticas son capaces de inhibir el crecimiento de varios microorganismos y poseen propiedades antimicrobianas con respecto a la conservación y seguridad de alimentos. (De Vuyst & Leroy, 2007). A partir del potencial antimicrobiano de las bacterias (BAL) y de sus productos metabólicos, se está desarrollando el método de bioconservación, como una alternativa para responder a la demanda de alimentos inocuos, frescos o mínimamente procesados, sin preservantes y con mayor vida útil (Acuña *et al.*, 2012).

Existen reportes científicos de la producción de bacteriocinas por el género *Weissella*, su capacidad antimicrobiana y sus posibles aplicaciones biotecnológicas industriales. (Chavasirikunton *et al.*, 2006; Ayeni *et al.*, 2011) *W. confusa* es una bacteria ácido láctica Gram

positiva, catalasa negativa, no esporulada, la cual ha sido aislada de una gran variedad de nichos naturales (Björkroth *et al.*, 2002) como vegetales frescos, alimentos fermentados, productos cárnicos (Diez *et al.*, 2009) y rumen bovino (Serna *et al.*, 2010). El género *Weissella*, al igual que otros géneros de BAL, poseen actividad antimicrobiana por la producción de compuestos que actúan como bacteriocinas las cuales no han sido aún identificados (Matamoros *et al.*, 2009). Lee, (2005), encontró que una especie de *W. Kimchi* PL 9023, aislada del tracto vaginal de mujeres, presentó actividad antagónica contra patógenos vaginales *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* con la producción de sustancias similares a bacteriocinas. Pal y Ramana (2009), encontraron la producción de compuestos antimicrobianos no asociados a bacteriocinas secretadas por *W. paramesenteroides* DFR-8 aislada a partir de material vegetal, los cuales, tenían amplio espectro de acción sobre patógenos transmitidos por alimentos. Espeche *et al.*, (2009), lograron aislar compuestos antimicrobianos producidos por especies de *W. paramesenteroides* a partir de muestras de leche de bovinos sanos, con efecto antimicrobiano contra *S. agalactiae* ATCC 27957 y *E. coli*. Serna *et al.*, (2010), reportaron actividad antimicrobiana de una cepa de *W. confusa* aislada de líquido ruminal bovino contra cepas de *S. aureus* y *S. agalactiae* principales patógenos causales de mastitis bovina. Recientemente, Ayeni *et al.*, (2011), propusieron a *W. confusa* U17 aislada a partir de queso como candidata para futuros estudios que soporten su uso como probiótico y Lee *et al.*, (2012), demostraron que *W. confusa* 31 y *W. confusa* 20 aisladas de heces de humanos son cepas totalmente calificadas como probióticos y merecen mayores estudios de aplicación.

De acuerdo a lo anterior, con el fin evaluar el campo de aplicación potencial de *W. confusa* y de sus metabolitos, se planteó este trabajo, donde el objetivo fue determinar la cinética de la actividad antimicrobiana de *W. confusa* y sus metabolitos contra *E. coli*, y *K. pneumoniae*.

Materiales y métodos

Microorganismos y condiciones de cultivo iniciales

Se utilizó una cepa de *W. confusa* criopreservada en glicerol (-20°C) a concentración de 10^9 UFC.mL⁻¹, la cual, fue obtenida a partir de un grupo de bacterias ácido-lácticas aisladas de líquido ruminal de hembras bovinas raza Hartón del Valle, en investigaciones de (Serna Cock *et al.*, 2011).

Para la reactivación de la cepa, se tomó y se inoculó 10 % (v/v) de la cepa de *W. confusa* criopreservada en 5 mL de caldo MRS (Scharlau Microbiology, España) suplementado con 40 % (p/v) de glucosa (Merck, Alemania) y se incubó a 33°C por 24 horas.

Se utilizó una cepa de *E.coli* ATCC® 25922, a concentración de 10^8 UFC.mL⁻¹ y una cepa de *K. pneumoniae*, (Bacilo Gram negativo, en agar Mac-Conkey, crecimiento característico de colonias grandes convexas, moradas rojizas, borde ondulado, y mucoides, no móviles. Lactosa positivo, Indol negativo, Lisina positivo); (concentración de 10^7 UFC mL⁻¹) aislada de un paciente con diagnóstico de neumonía. La cepa fue donada por el laboratorio clínico de Imbanaco, Cali Colombia.

Condiciones de fermentación y producción de *W. confusa* y sus metabolitos

El crecimiento de *W. confusa* se realizó en caldo comercial MRS puro, el cual provee las exigencias nutricionales de la bacteria (De Man *et al.*, 1960). Se realizaron tres fermentaciones en discontinuo por 6 horas. Cada fermentación se realizó en erlenmeyer de 1000 mL, (800 mL de volumen efectivo) sin aireación, en agitación continua con agitador orbital (model 5000I, VWR, USA) fijado en 33°C y 100 rpm. Se utilizó inóculo inicial de *W. confusa* del 10% con respecto al volumen de sustrato de fermentación. La fermentación se ajustó a pH 6.0 utilizando NaOH 4M.

Separación de *W. confusa*, *W. confusa* + metabolitos y metabolitos W10b

Durante el proceso de fermentación, cada hora se tomaron 45 mL del fermentado y se obtuvieron 3 tipos de sustancias biológicas, células de *W. confusa* con sus metabolitos (W+W10b), células de *W. confusa* libres de metabolitos (W) y metabolitos (W10b). W+W10b se obtuvo directamente del fermentado. W y W10b se obtuvieron por centrifugación del fermentado durante 30 minutos a 2860g (modelo 5804R Eppendorf CITI, Germany). Transcurrido el tiempo se separaron

el precipitado y el sobrenadante. El precipitado, correspondiente a células de *W. confusa*, se sometió a lavado, se adicionó 1 mL de NaCl al 0,9%, se agitó suavemente, se centrifugó por 5 min a 2860 g y se desechó el sobrenadante. Este proceso se realizó por duplicado. De esta forma se obtuvo la sustancia W. El sobrenadante se adicionó en un tubo estéril de 50 mL y se centrifugó nuevamente por 30 min a 2860 g (Eppendorf Centrifuge-5804R, Germany); posteriormente, una vez finalizado el tiempo de centrifugación, el precipitado se desechó y el sobrenadante se filtró utilizando membranas filtro de 0.45 µm (diámetro 30 mm, polipropileno TITAN2), obteniendo de esta manera la sustancia W10b.

El mismo procedimiento se realizó a las horas 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas de fermentación. A cada una de las sustancias biológicas, en cada uno de los tiempos, se les determinó actividad antimicrobiana.

Evaluación de la cinética antimicrobiana de *Weissella confusa* y sus metabolitos contra *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*

Se determinó la actividad antimicrobiana de *W. confusa* contra cepas comerciales de *E. coli* ATCC® 25922 y *K. pneumoniae*. La actividad antimicrobiana se midió de acuerdo a la metodología de Serna *et al.* (2011). Para el crecimiento de *E. coli* y *K. pneumoniae*, se utilizaron placas de agar Eosin-azul de Metileno (Scharlau Microbiology, España) de 5 mm de espesor. A estas placas se les realizaron orificios utilizando un sacabocado estéril de 17 mm de diámetro. Cada caja se sembró por separado con 100µl de cultivos de *E. coli* y *K. pneumoniae* a concentraciones de 10^8 y 10^7 UFCmL⁻¹, respectivamente. Posteriormente, en forma aséptica, se tomaron círculos de agar MRS estéril de 5 mm de espesor y de 17 mm de diámetro, los cuales se inocularon por separado, con 0.06 mL de W+W10b y con 0.06 mL de W (a concentraciones que dependían del tiempo de fermentación). Los círculos de agar inoculados se depositaron en los orificios realizados en las cajas con agar Eosin-azul de Metileno las cuales contenían el patógeno. Para el caso de W10b, en las placas sembradas con el patógeno, se inocularon dentro del orificio 0.10 mL de ésta sustancia. Finalmente, todas las cajas se incubaron a 33 °C por 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se midieron los halos de inhibición de crecimiento contra los patógenos, utilizando regla milimétrica. Las pruebas de inhibición se realizaron por triplicado en cada uno de los tiempos de fermentación.

Análisis estadístico

Para evaluar las cinéticas de actividad antimicrobiana de *W. confusa* y de sus metabolitos contra *E. coli* y *K. pneumoniae*, se utilizó un diseño con arreglo factorial de 3*6, con dos factores: Factor sustancia biológica antimicrobiana, con tres niveles: W, W+W10b y W10b y factor tiempo de fermentación con 6 niveles: hora 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Los resultados se analizaron a través del programa estadístico SAS versión 9.13. La comparación entre promedios se llevó a cabo a través de la prueba Tukey con una probabilidad de $p < 0.05$.

Resultados

En la figura 1, se muestran las curvas de las cinéticas de capacidad antimicrobiana de *W. confusa* y sus metabolitos frente a *E. coli*. Según los resultados estadísticos se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, y el efecto combinado entre los tratamientos y el tiempo de evaluación.

El mayor diámetro de inhibición contra *E. coli* correspondió al tratamiento W con promedio de 2.45 cm y valor máximo de 3.0 cm a la cuarta hora de fermentación. El menor diámetro de inhibición correspondió al tratamiento W10b, con promedio de 1.66 cm. Para el caso de tiempo de fermentación, la máxima actividad antimicrobiana en los tres tratamientos W, W+M y W10b se presentó entre la cuarta y sexta hora de fermentación. Resultados similares fueron encontrados para cepas Gram positivas en previos estudios de Serna *et al.*, (2010), quienes reportan actividad antimicrobiana de *W. confusa* contra *S. aureus* y *S. agalactiae* con diámetros de inhibición de 2.4 y 3.0 cm a la cuarta hora de fermentación, respectivamente.

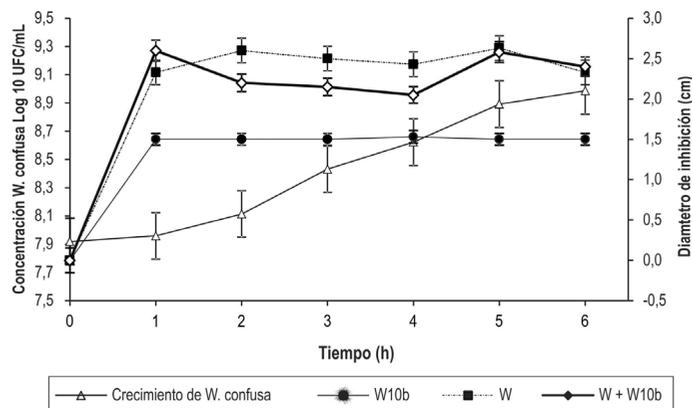


Figura 1. Valores promedio de cinética de crecimiento de *W. confusa* en 6 horas de fermentación y curvas de cinéticas de capacidad antimicrobiana (medida en diámetros de inhibición) de *W. confusa* (W), metabolito (W10b) y *W. confusa* más metabolito (W + W10b) contra *E. Coli*.

En la figura 2, se muestran las curvas de las cinéticas de capacidad antimicrobiana de *W. confusa* y sus metabolitos frente a *K. pneumoniae*. Diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos, y el efecto combinado entre los tratamientos y el tiempo de evaluación

Los mayores diámetros de inhibición contra *K. pneumoniae* correspondieron a los tratamientos W y W+W10b sin diferencia significativa entre ellos.

La mayor actividad antimicrobiana de W y W+W10b contra *K. pneumoniae* se obtuvo entre la cuarta (2.63 y 2.43 cm) y quinta (2.6 y 2.63 cm) hora de fermentación, respectivamente.

En las figuras 1 y 2 se observa la curva semi logarítmica del crecimiento de *W. confusa* y la actividad antimicrobiana (diámetros de inhibición) de cada uno de los tratamientos. Para ambos casos se observa que la acción antimicrobiana de la bacteria, está asociada a su crecimiento.

Discusión

En la literatura se han reportado un conjunto de investigaciones que demuestran el interés en el uso de BAL para el control de enfermedades transmitidas por alimentos que son provocadas por patógenos gram positivos, sin embargo son pocos los trabajos que describen actividad antimicrobiana de BAL y sus bacteriocinas contra bacterias Gram negativas (Zamfir *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2003; De Kwaadsteniet *et al.*, 2005, Sakaridis *et al.*, 2012). La capacidad de inhibición contra bacterias patógenas varía de acuerdo al tipo de cepa de BAL evaluado. En éste trabajo se demostró

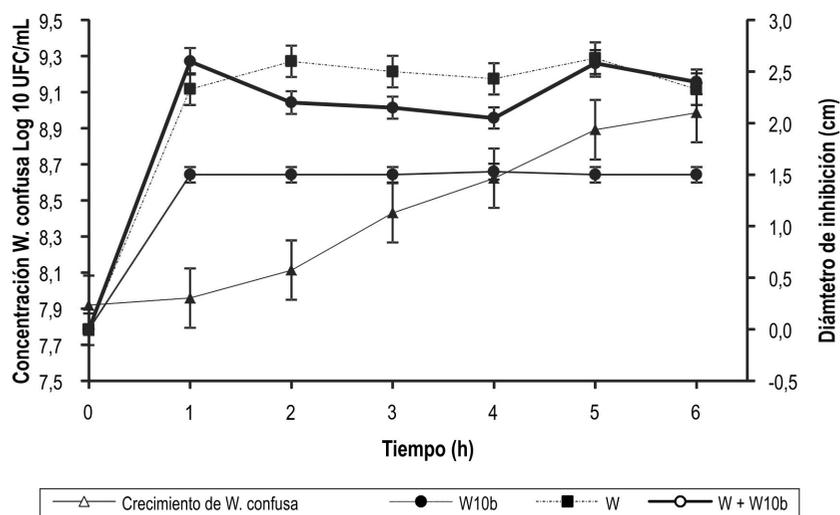


Figura 2. Valores promedio de cinética de crecimiento de *W. confusa* en 6 horas de fermentación y curvas de cinéticas de capacidad antimicrobiana (medida en diámetros de inhibición) de *W. confusa* (W), metabolito (W10b) y *W. confusa* más metabolito (W + W10b) contra *K. pneumoniae*.

que *W. confusa* y el metabolito W10b ejercen efecto antimicrobiano contra *E. coli* y *K. pneumoniae*. Estos resultados son acordes a los encontrados por Trias *et al.* (2008), quienes encontraron que dos cepas de *Weissella spp* aisladas de acelga y tomates, inhibe principalmente bacterias Gram negativas y en menor grado la bacteria Gram positiva *S. aureus*. Sin embargo, en estudios adelantados con W10b, se ha encontrado que ésta sustancia es capaz de inhibir a *S. aureus* bajo un amplio rango de pHs (rango entre 4,5 - 9,0) a temperaturas de 27 y 40 °C (Serna - Cock *et al.*, 2012; Serna *et al.*, 2010), información, que permite sugerir que tanto *W. confusa* como W10b podría ser utilizado como una alternativa de bioconservación de alimentos con destino humano o animal, y podrían contribuir a la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos tanto en patógenos Gram positivos como patógenos Gram negativos.

La actividad antimicrobiana de BAL puede ser debida a la producción de sustancias antimicrobianas, como ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas. (Mallesha *et al.*, 2010). La fermentación de azúcares, seguido de una disminución en el pH debido a la producción de ácidos orgánicos como el ácido láctico, es un factor importante para la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos, debido a que el pH bajo produce que los ácidos orgánicos se vuelvan liposolubles, lo que les permite atravesar la membrana celular y alcanzar el citoplasma. (Parada *et al.*, 2010). Las BAL tienen un espectro de acción muy amplio y pueden inhibir tanto bacterias Gram-positivas como Gram-negativas (Phumkhachorn *et al.*, 2010);

la actividad antimicrobiana de BAL contra bacterias Gram positivas se debe a la acción principalmente de bacteriocinas, mientras que la actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas se debe principalmente a la acción de ácidos orgánicos. Sin embargo, en algunas investigaciones, autores no evidenciaron actividad antagonica de bacteriocinas de BAL contra patógenos Gram negativos (Savadogo *et al.*, 2004; Maragkoudakis *et al.*, 2009; Askari *et al.*, 2012). Autores como Saidi *et al.*, (2011), indican que no obtuvieron acción antimicrobiana contra patógenos Gram negativos cuando utilizaron una cepa de *L. plantarum* y según Mallesha *et al.* (2010), la composición química de la pared celular de los organismos Gram negativos es un factor de protección para los compuestos antimicrobianos. Por su parte, Parada *et al.* (2007) indican que las bacteriocinas son frecuentemente no efectivas contra bacterias Gram-negativas, ya que la membrana externa de esta clase de bacterias actúa como una barrera de permeabilidad para la célula. Sin embargo, el efecto antagonico de BAL contra bacterias Gram negativas, obedece a la acción de ácidos orgánicos y compuestos como el peróxido de hidrogeno. (Kazemi-poor *et al.*, 2012).

Los resultados presentados en esta investigación son novedosos ya que hasta la fecha no se había reportado actividad antimicrobiana de una bacteria ácido láctica contra *K. pneumoniae*; así mismo, la actividad antimicrobiana encontrada contra los dos patógenos Gram negativos podría atribuirse a la producción de compuestos antimicrobianos tipo bacteriocinas y no a la acción de ácidos orgánicos, dado que los sustratos

fueron permanentemente neutralizados. En investigaciones recientes de Askari *et al.*, (2012), donde evaluaron la actividad antimicrobiana contra patógenos Gram negativos y patógenos Gram positivos de un grupo de bacterias ácido lácticas aisladas de frutas secas, no se encontró actividad antimicrobiana contra *K. pneumoniae*.

El género *Weissella*, frecuentemente ha sido aislado de diferentes alimentos fermentados (Lee *et al.*, 2005; Scheirlinck *et al.*, 2007; Thapa *et al.*, 2006) y específicamente la especie *confusa* está presente en vegetales y leches fermentadas (Björkroth *et al.*, 2002). Varios miembros del género *Weissella* provenientes de una variedad de productos fermentados han sido consumidos por los humanos (Björkroth *et al.*, 2002) por lo tanto, de acuerdo con los resultados de éste trabajo, el potencial de *W. confusa* y W10b como un método de bioconservación y prevención de enfermedades adquiridas a través de alimentos demuestra interés y relevancia para futuras investigaciones en su forma de utilización y aplicabilidad en los alimentos.

En este trabajo, no se utilizó un agente permeabilizador de membrana para medir la actividad antimicrobiana de la bacteria ácido láctica contra los patógenos Gram negativos, por lo cual los resultados de esta investigación son de gran relevancia. BAL se catalogan como generalmente seguros (GRAS), y tienen un papel importante en la conservación de los alimentos y los productos fermentados. La producción de un número de sustancias antimicrobianas, tales como ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas, además de la competencia por los nutrientes esenciales, la acumulación de D-amino-ácidos y la disminución del potencial oxirreductor también contribuyen a su efecto bioprotector. (Parada *et al.*, 2007). Estos resultados permiten demostrar y proponer a *Weissella confusa* como una alternativa de biopreservación de alimentos, por lo cual, merece mayores esfuerzos de investigación para ser utilizada en inocuidad y seguridad alimentaria, especialmente en la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos.

Conclusión

W. confusa y el metabolito W10b demostraron poseer capacidad antimicrobiana contra *E. coli* y *K. pneumoniae* lo que permite sugerir que las dos sustancias biológicas podrían ser investigadas en aplicaciones como alternativa de bioconservación o bioprotección de alimentos frescos y procesados, para alimentación humana y animal; y podría convertirse en una alternativa al uso de antibióticos para enfermedades causadas por *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Referencias bibliográficas

- Acuña L., Picariello G., Sesma F., Morero R.D., Bellomio A. 2012. A new hybrid bacteriocin, Ent35-MccV, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Open Bio*. 2: 12-19.
- Askari G.A., Kahouadji A., Khedid K., Charof R., Mennane Z. 2012. Screenings of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dried Fruits and Study of Their Antibacterial Activity. *Middle-East Journal of Scientific Research*. 11 (2) : 209-215.
- Ayeni F.A., Sánchez B., Adeniyi B.A., de los Reyes-Gavilán C.G., Margolles A., Ruas-Madiedo P. 2011. Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine. *International Journal of Food Microbiology*. 147: 97-104.
- Björkroth K., Schillinger U., Geisen R., Weiss N., Hoste B., Holzappel W., Korkeala H., Vandamme P. 2002. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 52: 141-148.
- Calbo E., Freixas N., Xercavins M., Riera M., Nicolás C., Monistrol O., Solé M., Sala M.R., Vila J., Garau J. 2011. Foodborne Nosocomial Outbreak of SHV1 and CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and Control. *Clinical Infectious Diseases*. 52 (6) : 743-749.
- Casella F., Finazzi L., Repetti V., Rubín G., DiMarco M., Mauro T., Furlan R. 2009. Liver abscess caused by *Klebsiella pneumoniae*: two case reports. *Cases Journal*. 2: 1 - 4.
- Chavasiarikunton V., Vatanyoopaisarn S., Phalakornkule. 2006. Bacteriocin - like activity from *Weissella confusa* and *Pediococcus acidilactici* isolated from traditional thai fermented sausages. *Journal of Culture Collections*. 5: 64 - 72.
- De Man J.C., Rogosa M., and Sharpe M.E. 1960. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*. 23(1) : 130-135.
- De Kwaadsteniet M., Todorov S.D., Knoetze H., Dicks L.M.T. 2005. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 15 : 433-444.
- De Vuyst L., Leroy F. 2007. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 13 : 194-199.
- Diez A., Björkroth J., Jaime I., Rovira J. 2009. Microbial, sensory and volatile changes during the anaerobic cold storage of morcilla de burgos previously inoculated with *Weissella viridescens* and *Leuconostoc mesenteroides*. *International Journal of food microbiology*. 131(2,3) : 168-177.
- Espeche M., Otero, M., Sesma, F., Nader-Macias, M. 2009. Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. *Veterinary Microbiology*. 135: 346-357.
- Gálvez A., Abriouel H., Lucas-López R., Ben Omar N. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. 120 : 51-70.
- Gould L.H., Demma L., Jones T.F., Hurd S., Vugia D.J., Smith K., Shiferaw B., Segler S., Palmer A., Zansky S., Griffin P.M., and the Emerging Infections Program FoodNet Working Group. 2009. Hemolytic Uremic Syndrome and Death in Persons with *Escherichia coli* O157:H7 Infection, Foodborne Diseases Active Surveillance Network Sites, 2000-2006. *Clinical Infectious Diseases*. 49 : 1480 - 1495.

- Guerin F., Le Bouguenec C., Gilquin J., Haddad F., Goldstein F.W. 1998. Bloody Diarrhea Caused by *Klebsiella pneumoniae*: A New Mechanism of Bacterial Virulence? *Clinical Infectious Diseases*. 27 : 648-649.
- Kazemipoor M., Jasimah W.M.R., Begum K., Yaze I. 2012. Screening of antibacterial activity of acid lactic bacteria isolated from fermented vegetables against food borne pathogens. *Archives des sciences*. 65(6) : 453 - 466.
- Kim T. S., Hur J. W., Yu M.A., Cheigh C.I., Kim K.N., Hwang J.K., Pyun Y.R. 2003. Antagonism of *Helicobacter pylori* by Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Journal of food protection*. 66 (1) : 3 - 12.
- Lee K.W., Park J.Y., Jeong H.R., Heo H.J., Han N.S., Kim J.H. 2012. Probiotic properties of *Weissella* strains isolated from human faeces. *Anaerobe*. xx: 1-7.
- Lee, Y. 2005. Characterization of *Weissella kimchii* PL9023 as a potential probiotic for women. *FEMS Microbiology Letters*. 250 : 157-162.
- Lee J.S., Heo G.Y., Lee J.W., Oh Y.J., Park J.A., Park Y.H., Pyun Y.R., Ahn J.S., 2005. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*. 102 : 143-150.
- Mallesha, Shylaja R., Selvakumar D. and Jagannath J. H. 2010. Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw and fermented products and their antibacterial activity. *Recent Research in Science and Technology*. 2 (6) : 42-46.
- Matamoros S., Pilet M., Gigout F., Prévost H., Leroi F. 2009. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology*. 26 : 638-644.
- Maragkoudakis P.A., Mountzouris K.C., Psyrras D., Cremonese S., Fischer J., Cantor M.D., Tsakalidou F. 2009. Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*. 130: 219-226.
- Pal A., Ramana K. 2009. Isolation and preliminary characterization of a non bacteriocin antimicrobial compound from *Weissella paramesenteroides* DFR-8 isolated from cucumber (*Cucumis sativus*). *Process Biochemistry*. 44 : 499-503.
- Parada J.L., Caron C. R., Medeiros A.B.P. and Socol C. R. 2010. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *Recent Research in Science and Technology*. 2 (6) : 42-46.
- Podschun R., Ullman U. 1998. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*. 11 (4): 589-603.
- Phumkhachorn P. and Rattanachaiyunsopon, P. 2010. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of Biological Research*. 1 (4) : 218-228.
- Saidi N., Hadadji M. and Guessas B. 2011. Screening of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from West Algerian Goat's Milk. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*. 6 (3) : 154-161.
- Sakaridis I., Soutlos N., Dovas C.I., Papavergou E., Ambrosiadis I., Koidis P. 2012. Lactic acid bacteria from chicken carcasses with inhibitory activity against *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. *Anaerobe*. 18 : 62-66.
- Savadogo A., Ouattara C.A.T., Bassole I.H.N., Traore A.S. 2004. Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Burkina Faso Fermented Milk. *Pakistan Journal of Nutrition*. 3 (3) : 174-179.
- Scheirlinck I., van der Meulen R., van Schoor A., Cancanneyt M., De Vuyst L., Vandamme P., Huys G., 2007. Influence of geographical origin and flour on diversity of lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs. *Applied and Environmental Microbiology*. 73. 6262-6269.
- Serna - Cock L., Enriquez - Valencia C.E., Jimenez - Obando E.M., Campos - Gaona R. 2012. Effects of fermentation substrates and conservation methods on the viability and antimicrobial activity of *Weissella confusa* and its metabolites. *Electron. J. Biotechnol.* 15 (3): In press.
- Serna L., Valencia L., Campos R. 2011. Lactic acid bacteria with antimicrobial activity against pathogenic agent causing of bovine mastitis. *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 9 (1) : 97-104.
- Serna L., Valencia L., Campos R. 2010. Cinética de fermentación y acción antimicrobiana de *Weissella confusa* contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*. 55: 55-65.
- Shahid M., Malik A., Adil M., Jahan N., Malik R. 2009. Comparison of beta-lactamase genes in clinical and food bacterial isolates in India. *J. Infect Dev Ctries*. 3 (8) : 593-598.
- Thapa N., Pal J., Tamang J.P. 2006. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology*. 107: 33-38.
- Trias R., Bañeras L., Badosa E., Montesino E. 2008. Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 123: 50-60.
- Wong-Beringer A., Hindler J., Loeloff M., Queenan A.M., Lee N., Pegues D.A., Quinn J.P., Bush K. 2002. Molecular Correlation for the Treatment Outcomes in Bloodstream Infections Caused by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with Reduced Susceptibility to Ceftazidime. *Clinical Infectious Diseases*. 34:135-46.
- Yoder J.S., Cesario S., Plotkin V., Ma X., Kelly-Shannon K., Dworkin M.S. 2006. Outbreak of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infection with an Unusually Long Duration of Illness. *Clinical Infectious Diseases*. 42 : 1513-1517.
- Zamfir M., Callewaert R., Cornea P.C., Savu L., Vatafu I., De Vuyst L. 1999. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *Journal of Applied Microbiology*. 87 (6) : 923-931.