

## CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE ADITIVOS ALIMENTARIOS DE ORIGEN NATURAL FRENTE A MICROORGANISMO AISLADO DE LECHE CRUDA

V. Gonzalez Estevez<sup>1</sup>; M. L. Boiero<sup>1,3</sup>; R. A. Bachetti<sup>2</sup>; A. A. Chesta<sup>1</sup>; C. Morgante<sup>2</sup>; M. A. Montenegro<sup>1,3</sup>

1 Dpto. de Química. UTN-Facultad Regional Villa María. Av. Universidad 450 (5900), Villa María, Córdoba, Argentina.

2 Instituto A.P. de Ciencias Básicas y Aplicadas. Universidad Nacional de Villa María. Campus Universitario, Arturo Jauretche 1555 (5900), Villa María, Cba., Argentina.

3 Centro de Investigaciones y Transferencia de Villa María (CIT VM-CONICET). Universidad Nacional de VM, Av. Arturo Jauretche 1555, Villa María, Cba., Argentina.

E-mail: [mamontenegro03@yahoo.com.ar](mailto:mamontenegro03@yahoo.com.ar)

### RESUMEN

Los alimentos, previo a su procesamiento, pueden sufrir un deterioro por la acción de microorganismos (MO) presentes en su matriz, cuyo desarrollo provoca alteraciones organolépticas y degradación de nutrientes valiosos. La leche, rica en sustancias nutritivas y con una elevada  $a_w$ , resulta un medio susceptible al ataque microbiano. En la industria láctea se emplean compuestos naturales (CN) con un rol tecnológico definido aprobado por el Código Alimentario Argentino (CAA), como Goma Arábica (GA) y Pectina (P), cuyo uso está previsto como espesantes/estabilizantes, y Bixina (B) permitida como colorante. El objetivo del presente trabajo consiste en evaluar una funcionalidad adicional de estos CN, su actividad antimicrobiana (AAM). Las tendencias mundiales hacia el reemplazo de los aditivos artificiales por los de origen natural, potencian el desarrollo de esta investigación.

Debido a que, previamente al tratamiento térmico, la leche se almacena a bajas temperaturas, el efecto de los compuestos antes mencionados se evalúa frente a un MO psicrótrofo aislado de leche cruda e identificado genotípicamente como *Enterobacter* sp., mediante amplificación y secuenciación del gen marcador molecular 16S ARNr. En particular, se determinó la capacidad de los CN para reducir la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) de este MO. Para ello, se inoculó el MO en muestras de leche en polvo (reconstituida en agua estéril), con y sin adición de cada uno de los CN a estudiar. Las muestras se incubaron a 4° C durante 10 días. Cada 24 h, se realizó el recuento a través de siembra en profundidad. Las placas se incubaron durante 48 h a 37° C y, posteriormente, se realizó el recuento microbiano, expresando los resultados como unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) y graficándolos en función del tiempo. La  $\mu$ , ( $h^{-1}$ ) de cada cultivo microbiano en leche, se determinó a partir de la porción lineal de la pendiente (crecimiento exponencial) de las curvas de crecimiento del MO, con y sin agregado de CN y, a partir de ellas se calculó el porcentaje de reducción de la velocidad de crecimiento microbiano (%R) ejercido por los compuestos estudiados.

Los resultados indican que todos los compuestos estudiados ejercen AAM frente al MO estudiado, siendo la B, el más efectivo (%R = 23), aunque los polímeros se comportaron de manera similar: %R = 19% y 18% para P y GA, respectivamente.

**Palabras claves:** leche, microorganismos psicrótrofos, actividad antimicrobiana, goma arábica, pectina, bixina.

## 1. Introducción

La gran mayoría de los alimentos durante su procesamiento, almacenamiento y/o transporte pueden sufrir deterioro por la acción de MO presentes en su matriz. Su desarrollo provoca alteraciones organolépticas (off-flavour) debido a la generación de compuestos volátiles (Karatapanis et. al., 2006; Kilcast y Subramaniam, 2000) y degradación de nutrientes (utilizados como sustratos) valiosos para la alimentación humana y necesarios para obtener buenos resultados en la elaboración de productos derivados del alimento afectado. La leche es una matriz compleja, rica en sustancias nutritivas, con una elevada actividad de agua, factores que la convierten en un medio sumamente susceptible al ataque microbiano.

En la industria de alimentos en general y, en la industria láctea en particular, se emplean CN con un rol tecnológico definido aprobado por el CAA, como GA y P, cuyo uso está permitido como espesantes/estabilizantes y B, permitida como colorante.

El objetivo del presente trabajo consiste en evaluar una funcionalidad adicional de estos compuestos, su capacidad antimicrobiana. Las tendencias mundiales hacia el reemplazo de los aditivos artificiales por los de origen natural, potencian el desarrollo de esta investigación.

Debido a que, previo al procesamiento de la leche, es decir, durante su transporte desde el tambo a la fábrica y una vez en ella, se almacena a bajas temperaturas, el efecto de los compuestos antes mencionados se evalúa frente a un MO psicrótrofo aislado de leche cruda, *Enterobacter* sp. (Eb). La elección del MO a estudiar se llevó a cabo teniendo en cuenta que se ha informado que Eb puede desarrollarse en alimentos refrigerados como la leche, incluso llegando a recuentos superiores a  $10^7$  UFC/ml y causando deterioro en ellos (Lund et al., 1992; O'Brien y Marshall, 1996; Ternström y Molin, 1987). Incluso se ha demostrado que la familia *Enterobacteriaceae* se encuentra en grandes cantidades después del almacenamiento a 7 °C en el 6% de muestras de leche en caja pasteurizada (Lindberg et al., 1998). Estos MO, más allá de las alteraciones que puedan causar al alimento, representan un potencial peligro para la salud de los consumidores debido a la posible producción y liberación de potentes toxinas entéricas (Kratz et al., 2003; Aguado García y Lumbreras Bermejo, 1998) que podrían resistir tratamientos térmicos como la pasteurización.

En base a lo anteriormente expuesto, se propuso la determinación de la capacidad de los compuestos antes mencionados para reducir la  $\mu$  de estos MO, empleando la técnica de recuento en placa, a través de siembra en profundidad.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1. Compuestos naturales**

Se estudiaron Goma Arábica Samspray 1 LQ, Pectina MRS-351 y Bixina (*Bixa Orellana*) Extracto Seco PDD, todos ellos grado alimentario, de manera de evaluar el efecto de los compuestos que efectivamente se emplean en la industria de los alimentos.

### **2.2. Aislamiento y caracterización de MO de leche**

El aislamiento de los MO a partir de leche cruda (almacenada a 4 °C inmediatamente concluido el ordeño), se realizó a través de siembra en profundidad de una dilución  $10^{-2}$  de la muestra, empleando Plate Count Agar (PCA). Las placas fueron incubadas a 4 °C durante 10 días. Cultivos puros fueron obtenidos tras sucesivos repiques en PCA. Se realizó además la caracterización morfológica y bioquímica preliminar de los aislamientos obtenidos mediante tinción de Gram, pruebas de la catalasa y oxidasa, etc. Ciertas cepas de interés fueron seleccionadas, para continuar con su caracterización genotípica.

### **2.3. Caracterización genotípica de los aislamientos**

La extracción de ADN genómico de los aislamientos seleccionados se llevó a cabo a partir de cultivos en fase exponencial tardía, crecidos en caldo nutritivo, empleando el kit comercial Wizard Genomic DNA-Purification Kit (Promega, USA) según las especificaciones del fabricante. El ADN obtenido se empleó como templado para la realización de los ensayos de biología molecular llevados a cabo en este estudio.

### **2.4. Amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr**

Se realizó la identificación genotípica mediante amplificación y secuenciación del gen marcador molecular 16S ARNr. La región de interés se amplificó, a partir del ADN templado, empleando los cebadores universales 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-TACGGYTACCTTGT TACGACTT-3') (Weisburg et al., 1991). Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron precipitados y purificados (DNA Clean and Concentrator-5, Zymo Research, USA) y posteriormente, fueron enviados para su secuenciación, en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina). Los

electroferogramas obtenidos se analizaron y editaron manualmente (BioEdit Sequence Alignment Editor) para obtener las secuencias completas (1300-1500 pb) del gen 16S ARNr. Se analizaron las secuencias del gen 16S ARNr, con el objetivo de determinar el género y la especie más relacionada, empleando la base de datos del Ribosomal Data Project (RDP), disponible en <http://rdp.cme.msu.edu/>, utilidad SeqMatch, y también, Basic Local Alignment Search tool (BLAST), disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Los análisis fueron además, respaldados con el sitio List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN), disponible en <http://www.bacterio.net/>.

## **2.5. Determinación de actividad antimicrobiana**

Para determinar la curva de crecimiento de Eb con y sin la adición de los antimicrobianos GA, P y B, se empleó la técnica de recuento microbiano con cada uno de ellos. A partir de un inóculo overnight (12 h) en caldo nutritivo, de cada microorganismo estudiado, se preparó un inóculo general, en un frasco con leche en polvo reconstituida en agua estéril, ajustando la concentración a una absorbancia de 0,002, a 600 nm, que equivale a  $10^6$  UFC/ml. Posteriormente, cada muestra se dividió en porciones iguales, a una de ellas se la reservó y, a las restantes, se les adicionaron los compuestos a estudiar. La proporción en las que fueron adicionados, corresponde a cinco veces las concentraciones permitidas por el CAA, con el objetivo de evaluar la efectividad en una concentración algo más elevada y, posteriormente, diluir la leche adicionada, con leche fresca para alcanzar la cantidad permitida (5 g/l de GA o P y 11,252 mg/l de B). De esta manera, se logra que el inóculo inicial sea exactamente el mismo en la muestra con y sin antimicrobianos (AM). Las muestras se incubaron a 4° C durante 10 días. Cada 24 h, se realizó el recuento a través de siembra en profundidad (ICMSF, 2000). Para ello, se toma una alícuota de cada muestra a diferentes intervalos de tiempo y, tras diluciones seriadas en agua peptonada estéril (0,1%), se siembra 1 ml en una placa estéril, a la que luego se adicionan 12 ml de PCA. Las placas se incubaron durante 48 h a 37° C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el recuento microbiano de las placas que presentaron entre 30 y 300 colonias, expresando los resultados como unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) y graficándolos en función del tiempo. La  $\mu$ , ( $h^{-1}$ ) de cada cultivo microbiano en leche, se determinó a partir de la porción lineal de la pendiente (crecimiento exponencial) de las curvas de crecimiento del MO, con y sin agregado de AM.

El porcentaje de reducción de la velocidad de crecimiento microbiano (%R) ejercido por los compuestos estudiados, fue calculado a través de la Ecuación 1.

$$\%R = \frac{\mu - \mu'}{\mu} \cdot 100 \quad (1)$$

Donde  $\mu$  y  $\mu'$ , son las velocidades de crecimiento bacteriano en ausencia y presencia del compuesto estudiado, respectivamente.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado en Cabina de Seguridad Microbiológica Biohazard Clase II (BIO-II-A) bajo flujo laminar. Además todos los materiales usados en los experimentos fueron previamente esterilizados.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Aislamiento e identificación de MO de leche

De los MO que se desarrollaron en medios ricos a 4 °C (psicrótrofos), fueron aisladas y purificadas 13 cepas, siguiendo la metodología descrita. A partir de los cultivos puros, las cepas fueron caracterizadas en base a la morfología de colonia, tinción de Gram, filancia y pruebas bioquímicas. De ellos, fue seleccionado un bacilo corto Gram negativo, catalasa positivo y oxidasa negativo.

Como se indicó inicialmente, para determinar la identificación de género se empleó la utilidad Classifier de RDP (a través de sus aplicaciones Classifier y Seqmatch) y para la identificación de la especie más probable se empleó la base de datos RDP. Los principales resultados del análisis bio-informático y filogenético como también el porcentaje de similitud con la especie más cercana se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Identificación de aislamiento de leche cruda

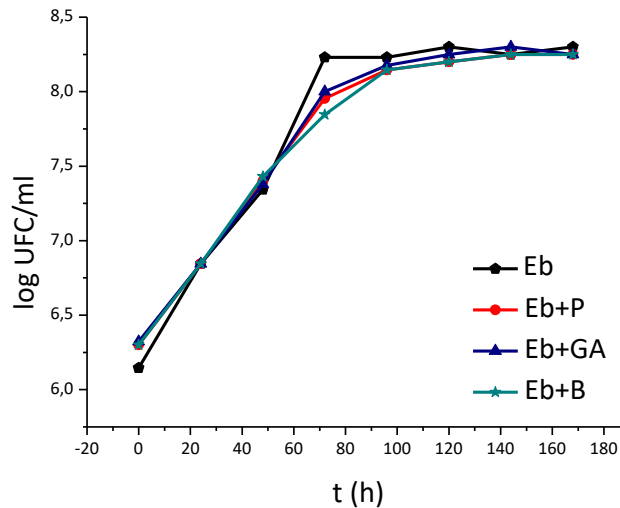
Longitud secuencia (pb)	Identificación	Especie más relacionada (N° de acceso)	Identidad (%)
1312	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Pantoea agglomerance</i> (WAB 1870, AM184212)	98,5

Según la utilidad Classifier de la base de datos RDP, la cepa aislada seleccionada pertenece al dominio Bacteria, phylum Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, orden Enterobacteriales, familia Enterobacteriaceae, género *Enterobacter* y fue específicamente identificado como *Enterobacter* sp., con una alta probabilidad de

corresponder a la especie *Pantoea agglomerans* (N° de acceso: WAB 1870, AM184212), con un 98,5% de similitud, según RPD.

### 3.2. Determinación de actividad antimicrobiana

La Figura 1 muestra las curvas de crecimiento de Eb a 4° C en leche, con y sin la adición de GA, P y B, mientras que en la Tabla 1, se muestran la  $\mu$  y el %R calculados a partir de las curvas anteriores.



**Figura 1.** Curva de crecimiento de Eb en leche, a 4 °C con y sin adición de P, GA y B.

**Tabla 1.**  $\mu$  y el %R de Eb en leche con y sin agregado de GA, P y B.

Compuesto/Concentración	Eb	
	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	%R
MO solo	0,065 ± 0,007	-
GA (5g/l)	0,052± 0,003	18
P (5g/l)	0,053± 2E-4	19
B (11,252 mg/l)	0,051 ± 0,004	23

Como puede verse en la Tabla 1, todos los compuestos presentan AAM resultando el carotenoide, el compuesto más efectivo. La unidad de concentración empleada es g/l (o mg/l) debido a que, al tratarse de aditivos grado alimentario, no se conoce el peso molecular de los CN utilizados y, por otro lado, a que esa es la unidad que se utiliza en el CAA para indicar los límites permitidos. Teniendo en cuenta que no se está trabajando con compuestos puros y que estos aditivos se agregan actualmente con un propósito

tecnológico completamente distinto al que se está evaluando, el %R encontrado es importante.

Los resultados de las curvas de crecimiento dejan en evidencia que GA, P y B ejercen un efecto bacteriostático frente tanto a Eb, causando una reducción de la velocidad de crecimiento, sin provocar su inhibición, lo cual concuerda con numerosos estudios sobre la capacidad antimicrobiana de CN (Rodríguez Saucedo, 2011).

Si bien pocos estudios han sido realizados en cuanto a la actividad AM de GA y P, se ha demostrado que resultan efectivos frente a ciertos microorganismos (Clark et al., 1993; Onishi et al., 2008; Saini et al., 2008; Bae et al., 2009). Esta propiedad podría ser ejercida por enzimas como oxidasas, peroxidasas y pectinasas presentes en la fracción proteica de estos polímeros, a las que se les han atribuido propiedades AM (Tyler et al., 1977; Kirtikar et al., 1984).

En concordancia a los resultados obtenidos en el presente estudio, existe evidencia contundente de la actividad antimicrobiana de B (Yolmeh et al., 2014; Fleischer et al., 2003; Ongsakul et al., 2009; Rojas et al., 2006; Castello et al., 2002; Venugopalan et al., 2012). De acuerdo a Subczynski et al. (1991), la actividad AM de B podría atribuirse a su polaridad, que le permite localizarse en los lados opuestos de la membrana, causando importantes cambios en la barrera de difusión, restringiendo el movimiento molecular de los grupos CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> de las cadenas alquílicas de los lípidos de membrana, aumentando la rigidez (Gabrielska et al., 1996), causando una pronunciada modificación de la barrera de difusión de la membrana, disminuyendo la permeabilidad y el paso de oxígeno molecular y otros pequeños iones (Subczynski et al., 1991).

Para que los antimicrobianos alcancen su diana o sitio de acción, deben atravesar la cubierta bacteriana. Las bacterias Gram negativas, como Eb ofrecen mayor resistencia que las Gram positivas a la entrada de antimicrobianos, ya que poseen una membrana celular externa, que rodea la capa de péptidoglucano. Por ello, en las bacterias Gram positivas, el límite de exclusión es mucho mayor que el tamaño de la mayoría de los antimicrobianos (Calvo et al., 2009). Esto indicaría que los CN estudiados tendrían una actividad AM aún mayor a las obtenidas en este estudio frente a bacterias Gram positivas lo que deja planteada una inquietud para futuras investigaciones.

#### **4. Conclusiones**

Se demostró que todos los CN estudiados (GA, P y B) tienen una importante actividad AM frente a Eb si se tiene en cuenta que se adicionan durante el procesamiento

de leche con una funcionalidad tecnológica completamente distinta a la que se investigó en este estudio. Este hecho resulta sumamente relevante desde el punto de vista tecnológico considerando que una sencilla modificación en el momento en el que se adicionan los CN podría traducirse en un beneficio tecnológico adicional. En la actualidad, los aditivos se incorporan a la leche una vez que ha sido tratada térmicamente y que se ha definido el producto a elaborar. Lo que se propone, es adicionarlos inmediatamente después del ordeño, en un múltiplo de las cantidades permitidas (se evaluó una concentración cinco veces mayor) en la leche cruda, cuyo destino sea un producto lácteo definido, de manera de conocer estas cantidades y poder diluirla posteriormente para alcanzar los límites admitidos pero habiendo potenciado su capacidad. Los CN ejercerían su actividad AM en el tambo, el transporte y el almacenamiento refrigerado en la planta procesadora, previamente al tratamiento térmico. La disminución en la  $\mu$  de los microorganismos psicrótrofos reduciría su número lo que se traduciría en un menor número de nutrientes dañados, valiosos tanto para la nutrición humana como para la obtención de mayores rendimientos en la elaboración de productos lácteos derivados.

Los resultados obtenidos, junto a la actitud del consumidor actual frente a los compuestos sintéticos, potencian la aplicación de los aditivos estudiados frente a los artificiales, también permitidos con la misma funcionalidad tecnológica que los evaluados pero que no presentan esta ventaja adicional de proteger la calidad microbiológica del alimento e, indirectamente, su calidad nutricional.

### **Agradecimientos**

Los autores agradecen el apoyo financiero de la Universidad Tecnológica Nacional y la Universidad Nacional de Villa María.

### **Referencias**

- Aguado García, J.M.; Lumbreras Bermejo, C. (1998). Infecciones por enterobacterias. *Medicine*, 7, 3622-3628.
- Bae, I.Y.; Joe, Y.N.; Rha, H.J.; Lee, S.; Yoo, S.H.; Lee, H.G. (2009). Effect of sulfation on the physiochemical and biological properties of citrus pectins. *Food Hydrocolloids*, 23, 1980-1983.
- Calvo, J.; Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27, 1, 44-52.
- Castello, M.C.; Phatak, A.; Chandra, N.; Sharon, M. (2002). Antimicrobial activity of crude extracts from plant parts and corresponding calli of *Bixa orellana* L. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40, 1378-1381.
- Clark, D.T.; Gazi, M.I.; Cox, S.W.; Eley, B.M.; Tinsley, G.F. (1993). The effects of Acacia arabic gum on the in vitro growth and protease activities of periodontopathic bacteria. *Journal of Clinical Periodontology*, 20, 238-243.



- Fleischer, T.C.; Ameade, E.P.K.; Mensah, M.L.K.; Sawyer, I.K. (2003). Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia*, 74, 136-138.
- Gabrielska, J.; Gruszecki, W.I. (1996). Zeaxanthin (dihydroxy-beta-carotene) but not beta-carotene rigidifies lipid membranes: a 1H-NMR study of carotenoid-egg phosphatidylcholine liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1285, 167-174.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, of the International Union of Microbiological Societies). Microorganismos de los Alimentos, Volumen 1. Su significado y métodos de enumeración. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza España. Segunda Edición. ISBN: 84-200-0908-3.
- Karatapanis, A. E.; Badeka, A. V.; Riganakos, K. A.; Savvaidis, I. N.; Kontominas, M. G. (2006). Changes in flavour volatiles of whole pasteurized milk as affected by packaging material and storage time. *International Dairy Journal*, 16, 750–761.
- Kilcast, D.; Subramaniam, P. (2000). Introduction. In D. Kilcast, & P. Subramaniam (Eds.). Cambridge, UK: Woodhead Publishing. *The stability and shelf-life of food*, 1-19.
- Kirtikar, K.R.; Basu, B.D. (1984). Indian medicinal plants. (2<sup>nd</sup> ed.). Delhi, *Periodical Expert Book Agency*, 3, 1596 - 1598.
- Kratz, A.; Greenberg, D.; Barki, Y.; Cohen, E., Lifshitz, M. (2003). *Pantoea agglomerans* as a cause of septic arthritis palm tree thorn injury; case report and literature review. *Archives of Disease in Childhood*, 88, 542-544.
- Ley 18284. Dto. 2126/71. (Código Alimentario Argentino). Anexo I. 1969 – 1971. Última actualización 2014.
- Lindberg, A.M.; Ljungh, A.; Ahrné, S.; Löfdahl, S.; Molin, G. (1998). *Enterobacteriaceae* found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and the presence of toxin encoding genes. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 11-17.
- Lund, A.M.; Mostert, J.F.; Carelsen, M.A.; Lategan, B. (1992). Proteolytic and lipolytic psychrotrophic *Enterobacteriaceae* in pasteurised milk and dairy products. *The South African Journal of Dairy Science*, 24, 7-10.
- O'Brien, J.K.; Marshall, R.T. (1996). Microbiological quality of raw ground chicken processed at high isostatic pressure. *Journal of Food Protection*. 59, 146-150.
- Ongsakul, M.; Jundarat, A.; Rojanaworant, C. (2009). Antibacterial effect of crude Alcoholic and Aqueous extracts of six medicinal plants against *S. aureus* and *E. coli*. *Journal of Health Research*, 23, 153-156.
- Onishi, T.; Umemura, S.; Yanagawa, M.; Matsumura, M.; Sasaki, Y.; Ogasawara, T.; Ooshima, T. (2008). Remineralization effects of gum arabic on caries-like enamel lesions. *Archives of oral Biology*, 53, 257-260.
- Rodríguez Saucedo, E.N. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Universidad Autónoma Indígena de México. Mochichahui, El Fuerte, Sinaloa. *Ra Ximhai*, 7, 1, 153-170.
- Rojas, J.J.; Ochoa, V.J.; Ocampo, S.A.; Muñoz, J.F. (2006). Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of nonnosocomial infections. *BMC Complement and Alternative Medicine*, 6, 2-7.
- Saini, M.; Saini, R.; Roy, S.; Kumar, A. (2008). Comparative pharmacognostical and antimicrobial studies of acacia species (*Mimosaceae*). *Journal of Medicinal Plants Research*, 2, 12, 378-386.
- Subczynski, W.K.; Markowska, E.; Sielewiesink, J. (1991). Effect of polar carotenoids on the oxygen diffusion concentration product in lipid bilayers. An EPR spin label study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1068, 68-72.
- Ternström, A.; Molin, G. (1987). Incidence of potential pathogens on raw pork, beef and chicken in Sweden, with special reference to *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Journal of Food Protection*, 50, 141-146.
- Tyler, V.; Brady, L.; Robbers, J. (1977). *Pharmacognosy*. 7<sup>th</sup> ed, p. 66–80. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Venugopalan, A.; Giridhar, P. (2012). Bacterial growth inhibition potential of annatto plant parts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1879-1882.
- Weisburg W.G.; Barns S.M.; Pelletier D.A.; Lane D.J. (1991). 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*. 173, 2, 697-703.

Yolmeh, M., Habibi Najafi, M.B., Salehi, F. 2014. Genetic algorithm-artificial neural network and adaptive neuro-fuzzy inference system modeling of antibacterial activity of annatto dye on *Salmonella enteritidis*. *Microbial Pathogenesis*, 67, 36-40.