

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERIA EN ALIMENTOS

**Capacidad Antagonista Frente a *Listeria monocytogenes* de
dos Sustancias Tipo Bacteriocina Utilizadas en Combinación
con NaCl y CO₂**

Tesis presentada como parte de los
requisitos para optar al grado de Licenciado
en Ingeniería en Alimentos

Astrid Denisse Martin Katusic

VALDIVIA-CHILE

2002

Profesora Patrocinante: Sra. Renate Schöbitz Twele
Tecnólogo Médico, M. Sc.
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Ciencias Agrarias

Profesoras Informantes: Sra. Luz Haydee Molina C.
Prof. Biología y Química
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Ciencias Agrarias

Srta. Irma Molina Vega
Prof. Matemáticas y Física. Master en Estadística
Instituto de Estadística
Facultad de Ciencias Económicas y Administrativas

AGRADECIMIENTOS

Quiero dejar impreso mis más profundos agradecimientos a las personas que me acompañaron, apoyaron y ayudaron a cumplir mi meta. En primer lugar quiero agradecer a mi madre, Lucía por sustentar mis estudios y brindarme durante este camino su fortaleza y sabiduría. A Osear por su constante apoyo y gran ayuda. A mis hermanos que dieron el ejemplo para impulsar esta meta. A mis amigos por su fiel compañía.

Quiero dar un especial agradecimiento a mi profesora patrocinante Sra. Renate Schöbitz por otorgarme la posibilidad de realizar este trabajo de Investigación, además por su ayuda y constante dedicación. Quiero agradecer a mis profesores informantes Srta. Irma Molina y Sra. Haydee Molina y especialmente al Sr. Wilhem Heimlich, quien tuvo muy buena disposición a responder mis inquietudes. Finalmente quiero agradecer a las integrantes del Laboratorio de microbiología, Sras. Mariela Horzella, Sade Salaive y a Erika, por su grata acogida y constante ayuda.

ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	3
2.2.1	Aspectos regulatorios sobre <i>Listeria</i>	3
2.1.2	Características de la bacteria	4
2.1.3	<i>L. monocytogenes</i> en los alimentos	6
2.2	Bacterias ácido lácticas (BAL)	7
2.3	Péptidos antimicrobianos o bacteriocinas	8
2.3.1	Espectro de actividad antimicrobiana de las bacteriocinas	10
2.3.2	Clasificación de las bacteriocinas	11
2.3.3	Factores que influyen en la producción y actividad de las bacteriocinas	11
2.3.4	Propiedades bioquímicas de las bacteriocinas	12
2.3.5	Modo de acción de las bacteriocinas	13
2.3.6	Aplicación de las bacteriocinas en alimentos	15
2.3.7	Resistencia de los microorganismos a las bacteriocinas	16
2.4	Factores de inhibición combinados o tecnología de Obstáculos	18
2.5	Factores que contribuyen al efecto antagónico de las bacteriocinas	19
3	MATERIAL Y MÉTODO	23
I	Trabajo Preexperimental	23
3.1	Selección de cepas bacterianas ácido lácticas productoras de sustancias tipo bacteriocina (STB)	23
3.2	Cepa indicadora, <i>Listeria monocytogenes</i>	23
3.3	Prueba de antagonismo indirecto con las cepas de BAL productoras de STB	24

Capítulo		Página
3.4	Prueba de antagonismo con los sobrenadantes de los cultivos de las cepas BAL	24
3.4.1	Obtención de los sobrenadantes con las STB	24
3.4.2	Técnica de la gota sobre césped	25
3.4.3	Análisis estadístico	25
3.5	Pruebas para descartar otros inhibidores y confirmar la naturaleza proteica de la STB de cepa M 14	25
3.5.1	Prueba de la catalasa	25
3.5.2	Prueba de la proteasa	26
II	Trabajo experimental	26
3.6	Producción de la STB de cepa M 14	26
3.7	Obtención de la STB de cepa <i>C. piscicola</i> L 103	27
3.8	Prueba para medir las actividades de las STB de <i>C. piscicola</i> L 103 y cepa M 14	27
3.9	Estudio del sinergismo de las STB con factores favorables a su actividad antagonista frente a <i>L. monocytogenes</i>	27
3.9.1	Técnica de difusión en agar para la determinación de la capacidad inhibidora de las STB	27
3.9.2	Aplicación de las STB con diferentes niveles de NaCl, CO ₂ y temperatura	28
3.9.3	Condiciones de incubación de los diferentes tratamientos	28
3.9.4	Análisis estadístico	30
3.10	Estudio de la combinación de las STB de la cepa <i>C. piscicola</i> L 103 y la cepa M 14	30
3.10.1	Liofilización de las STB	30
3.10.2	Combinación de las STB	30
3.10.3	Análisis estadístico	31
3.11	Estudio del antagonismo en placa de la combinación de las STB, más factores favorables a su actividad frente a <i>L. monocytogenes</i>	31

Capítulo		Página
3.12	Estudio del antagonismo en caldo de cultivo de la combinación de las STB con factores favorables a su acción inhibidora frente a <i>L. monocytogenes</i> Lm 82	32
3.12.1	Análisis de los tratamientos	33
3.12.2	Análisis estadístico	33
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
4.1	Selección de cepas productoras de STB con actividad antagónica frente a <i>L. monocytogenes</i>	34
4.1.1	Prueba de antagonismo con las cepas productoras	34
4.1.2	Prueba de antagonismo con los sobrenadantes del cultivo de las cepas de BAL	34
4.2	Actividad antagonista de las STB expuestas a diferentes combinaciones de NaCl, CO ₂ y temperatura	36
4.2.1	STB de <i>C. piscicola</i> L103	36
4.2.2	STB de cepa M14	37
4.3	Acción inhibidora de ambas STB en forma combinada	43
4.4	Factores favorables a la actividad de las STB de ambas cepas lácticas	46
4.5	Inhibición de <i>L. monocytogenes</i> Lm82 en caldo de cultivo con factores potenciadores del antagonismo de las STB	48
5	CONCLUSIONES	53
6	RESUMEN – SUMMARY	54
7	BIBLIOGRAFÍA	56
	ANEXOS	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Solubilidad del dióxido de carbono en agua a varias temperaturas (volumen de CO ₂ y 1 ATM/ volumen de agua)	22
2	Tratamientos de ambas STB con diferentes niveles de NaCl	28
3	Condiciones de temperatura y CO ₂ en los diferentes tratamientos con las STB y NaCl	29
4	Pruebas de antagonismo en agar con ocho cepas de BAL frente a <i>L. monocytogenes</i> Lm 82	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Biofilm de <i>L. monocytogenes</i> sobre una superficie de acero inoxidable	6
2	Modelo general del mecanismo de acción de péptidos antimicrobianos	14
3	Ejemplo del efecto de la tecnología de obstáculos sobre los microorganismos	19
4	Sistema de incubación bajo atmósfera de CO ₂	29
5	Tratamientos y análisis realizados en la prueba de antagonismo en caldo	32
6	Inhibición de <i>L. monocytogenes</i> Lm82 con la STB de <i>C. piscicola</i> L103 bajo diferentes condiciones de NaCl, CO ₂ y temperatura	37
7	Inhibición de <i>L. monocytogenes</i> Lm82 con la STB de cepa M14 bajo diferentes condiciones de NaCl, CO ₂ y temperatura	38
8	Comparación de los halos de inhibición obtenidos al aplicar los distintos factores en combinación a las STB	39
9	Comparación halos de inhibición obtenidos a dos temperaturas	40
10	Inhibición de <i>L. monocytogenes</i> Lm82 con ambas STB por separado y en combinación, a dos temperaturas	44
11	Combinación de STB más 12% NaCl incubadas en una atmósfera con 10% CO ₂ y 4°C de temperatura.	46
12	Inhibición de <i>L. monocytogenes</i> Lm82 en caldo ST con las STB de <i>C. piscicola</i> L103 y cepa M14, potenciadas por NaCl, CO ₂ y 4°C	48

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexos	Página
1 Halos de inhibición de cepas de BAL productoras de sustancias tipo bacteriocina (STB)	67
1.1 Pruebas de antagonismo en agar con ocho cepas de BAL y los sobrenadantes de sus cultivos frente a <i>L. monocytogenes</i> Lm 82	67
1.2 Análisis Estadístico de halos de inhibición entre las 8 cepas lácticas	67
1.2.1 Análisis de Varianza (ANDEVA)	67
1.2.2 Prueba de comparación múltiple de Tukey	67
2 STB y los factores favorables a su actividad frente a <i>L. monocytogenes</i> Lm82	69
2.1 Halos de Inhibición en mm de <i>L. monocytogenes</i> Lm82 con las STB a diferentes niveles de NaCl, CO ₂ y temperatura	69
2.2 Análisis estadístico	69
2.2.1 STB de cepa <i>C. piscicola</i> L103	69
2.2.1.1 Análisis de varianza	69
2.2.1.2 Prueba de comparación múltiple de Tukey	70
2.2.2 STB de cepa M14	71
2.2.2.1 Análisis de varianza (ANDEVA)	71
2.2.2.2 Prueba de Comparación múltiple de Tukey	71
3 Combinación de las STB de cepas <i>C. piscicola</i> L103 y cepa M14	73
3.1 Halos de Inhibición (mm) de <i>L. monocytogenes</i> con las STB separadas y combinadas a 25°C y 4°C	73
3.2 Análisis Estadístico por halos de inhibición entre temperaturas y STB	73
3.2.1 Análisis de varianza multifactorial	73
3.2.2 Prueba de comparación múltiple de Tukey entre temperaturas	73

Anexos		Página
3.2.3	Prueba de comparación múltiple de Tukey entre STB separadas y combinadas	74
4	Estudio del sinergismo de la combinación de las STB con factores favorables a su actividad antagonista frente a <i>L. monocytogenes</i> Lm82	75
4.1	STB separadas y combinadas más factores favorables a su actividad antagonista (4°C/ 10% CO ₂ / 12% NaCl)	75
4.2	Análisis estadístico	75
4.2.1	Análisis de varianza (ANDEVA) para los halos de inhibición entre las STB separadas y combinadas	75
4.2.2	Prueba de comparación múltiple de Tukey para los halos de inhibición entre las STB separadas y combinadas	75
5	Estudio del antagonismo en caldo de cultivo de la combinación de las STB más los factores favorables a la acción inhibidora frente a <i>L. monocytogenes</i> Lm82	76
5.1	Recuento de <i>L. monocytogenes</i> en caldo de cultivo con 12% de NaCl incubado a 4°C en una atmósfera con 10% de CO ₂	76
5.2	Análisis estadístico	76
5.2.1	Análisis de Varianza multifactorial para el caldo + STB	76
5.2.2	Prueba de comparación múltiple de Tukey para caldo + STB por días	77
5.2.3	Análisis de Varianza multifactorial para el control	77
5.2.4	Prueba de comparación múltiple de Tukey para el control entre días	77
5.2.5	Análisis de varianza (ANDEVA) para el día 0 entre tratamientos	78
5.2.6	Prueba de comparación múltiple para el día 0 entre tratamientos	78
5.2.7	Análisis de varianza (ANDEVA) para el día 3 entre tratamientos	78

Anexos	Página
5.2.8 Prueba de comparación múltiple para el día 3 entre tratamientos	78
5.2.9 Análisis de varianza (ANDEVA) para el día 7 entre tratamientos	79
5.2.10 Prueba de comparación múltiple para el día 7 entre tratamientos	79
5.2.11 Análisis de varianza (ANDEVA) para el día 14 entre tratamientos	79

1. INTRODUCCIÓN

Las bacteriocinas son péptidos de reducido tamaño, con una actividad antimicrobiana muy potente frente a bacterias deteriorantes y patógenas que se encuentran en los alimentos. La incorporación de bacteriocinas a los alimentos, permitiría eliminar o reducir la utilización de aditivos químicos. Su resistencia al calor, acidez, condiciones de baja a_w , y su hidrólisis por las proteasas gástricas, permitirían su utilización para incrementar la seguridad y vida útil de muchos alimentos, como productos naturales, elaborados por microorganismos considerados como seguros en los alimentos. Las bacteriocinas pueden presentar actividad antagonista frente a microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, esta bacteria patógena en particular ha mostrado resistencia a una gran variedad de estas sustancias, lo que dificulta su actividad antagonista. Es así como la sustancia tipo bacteriocina (STB) de *Carnobacterium piscicola* L103 de actividad antagónica frente a *L. monocytogenes*, solo ha ejercido un efecto bacteriostático o parcialmente bactericida sobre la bacteria patógena, por lo que es de importancia potenciar su acción inhibidora. Un mecanismo para lograr este objetivo, podría ser la posibilidad de combinarla con otra STB, ya que se ha demostrado que la aplicación de combinaciones de diferentes bacteriocinas de BAL, contribuyen a reducir la frecuencia de poblaciones bacterianas resistentes. También se ha estudiado la factibilidad de combinarlas con otros factores de inhibición, ya que el uso de un sistema de múltiples barreras incrementaría la efectividad antimicrobiana de éstas.

Hipótesis de trabajo:

El uso de una combinación de dos STB con NaCl, CO₂ y a una temperatura adecuada permiten inhibir significativamente a *Listeria monocytogenes* en un sistema “in vitro”

Objetivo general:

Estudiar el efecto de dos STB de bacterias ácido lácticas en combinación y con factores favorables para su acción antagonista frente a *L. monocytogenes*.

Objetivos específicos:

1. Evaluar en forma separada la capacidad antagonista de dos STB de bacterias ácido lácticas en contra de *L. monocytogenes*, expuestas a dos niveles de CO₂, diferentes concentraciones de NaCl y dos temperaturas.
2. Estudiar el efecto antagonista de dos STB aplicadas en forma combinada en contra de *L. monocytogenes*.
3. Evaluar en un caldo de cultivo, el efecto del NaCl, CO₂ y temperatura sobre la acción inhibitoria de una combinación de dos STB en contra de *L. monocytogenes*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es el único microorganismo patógeno que afecta al hombre entre las seis especies del género *Listeria*, sin embargo *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. ivanovii* han sido ocasionalmente asociadas con enfermedades en humanos. La bacteria fue descrita por primera vez en 1926 por Murria como *Bacterium monocytogenes* (ADAMS Y MOSS, 2000). Es un patógeno ampliamente distribuido en la naturaleza. Su ingesta a través de los alimentos produce la enfermedad conocida como listeriosis la cual causa cuadros de meningitis, meningoencefalitis, romboencefalitis y septicemia. Las mujeres embarazadas son las más frecuentemente afectadas, pero en general son también vulnerables aquellas personas de mayor edad e inmunodeprimidas como es el caso de enfermos de cáncer, sida y personas recientemente transplantadas de órganos. La listeriosis conduce a la muerte del 25% al 30% de los casos reportados (ROCOURT Y COSSART, 1997).

Este microorganismo tiene diversos orígenes, encontrándose en materias primas como la leche y la carne fresca, llegando allí desde las heces, ya que coloniza el intestino de animales y seres humanos (VIVAS, 1999). En la patogénesis humana se estima que de un 2% a 6% de individuos sanos son portadores fecales asintomáticos de esta bacteria (ROCOURT Y COSSART, 1997).

2.1.1 Aspectos regulatorios sobre *Listeria*. Durante la década de los 80 los diferentes brotes de listeriosis ocurridos en Suiza y Estados Unidos causados por alimentos contaminados, hicieron que se aceleraran los estudios sobre la

incidencia del microorganismo. Como consecuencia de ello, las autoridades sanitarias de los diferentes países intentaron impedir el surgimiento de nuevos brotes, para lo cual dictaron normas, que difieren unas de otras, pero cuyo fin era el mismo, contrar desde su origen a la bacteria, es decir desde la producción del alimento (VIVAS, 1999).

En los E.E.U.U de N.A. la Food and Drug Administration (FDA), el Departamento de Agricultura (US) y el Centro de Control de Enfermedades han impuesto la política de tolerancia cero para *L. monocytogenes*, que determina ausencia del microorganismo en 50 g de alimento. En Europa los niveles establecidos dependen del tipo de alimento, pero en general se aceptan niveles < 100 ufc/gr (FARBER 1993). En Chile, en cuanto a la importación de alimentos, las normativas chilenas no obligan a una certificación sanitaria para este patógeno. En cambio en productos de exportación se exige ausencia de *L. monocytogenes* en crustáceos congelados, productos pesqueros ahumados, empacados en atmósfera modificada y platos preparados (FUNDACIÓN CHILE, 2000).

2.1.2 Características de la bacteria. *L. monocytogenes* es un bacilo pequeño, gram positivo, que se caracteriza por su capacidad de crecer bajo diversas condiciones ambientales como las temperaturas de refrigeración (2 a 4°C), a niveles de pH bajo 5,0 y en presencia de altas concentraciones de NaCl de hasta un 30% (ROCOURT Y COSSART, 1997; MARTIN Y FISHER, 1999). Además, dependiendo del tipo de alimento, la bacteria puede resistir tratamientos térmicos de hasta 70°C durante 8 a 20 s. Esta bacteria es capaz de crecer y desarrollarse en un ambiente con 90% HR y es relativamente resistente a los preservantes químicos habitualmente usados, como el ácido sórbico y nitrito sódico (VIVAS, 1999).

El patógeno se ha aislado de variadas especies de mamíferos, aves, peces y crustáceos. No obstante su principal hábitat es el suelo y la materia vegetal en descomposición, en la cual sobrevive y crece como saprófito. En particular existen dos propiedades de *L. monocytogenes* que contribuyen a su amplia distribución en el medio ambiente y plantas procesadoras de alimentos. Una de ellas es que, a pesar de no formar esporas, puede sobrevivir por períodos largos de tiempo en variadas y extremas condiciones ambientales. En segundo lugar es una bacteria psicrófila por lo que al contaminarse un alimento en cualquier etapa de la cadena de procesamiento, el almacenamiento en frío no inhibirá el crecimiento de la bacteria (ROCOURT Y COSSART, 1997).

Una de las principales fuentes de preocupación de las industrias alimentarias es la propiedad de *L. monocytogenes* de formar películas biológicas denominadas también biofilm. Estas son un agregado de bacterias inmovilizadas en una superficie, normalmente inmersas en una matriz de sustancias extracelulares compuesta por polisacáridos y glicoproteínas de origen bacteriano. La preocupación de la industria de alimentos radica en la posibilidad de que se produzca la transferencia de la bacteria patógena, desde la superficie de los equipos donde forma el biofilm, al alimento que está en contacto con ella (PÉREZ *et al.*, 1999). *L. monocytogenes* puede adherirse a varios tipos de superficie por lo que la existencia de biofilms en maquinarias de procesamiento es frecuente (ROCOURT y COSSART, 1997). La adherencia del biofilm hace difícil su remoción y le confiere a la bacteria mayor resistencia a los desinfectantes comúnmente usados (FRANK y KOFFY, 1990). *L. monocytogenes* se adhiere y forma biofilm después de un breve período de contacto a superficies como el acero, goma, vidrio, polipropileno y otros materiales usados en plantas procesadoras de alimentos (FIGURA 1). Algunas cepas de *Listeria* pueden dominar y persistir varios años en una planta o línea de producción, por lo que se debe implementar un riguroso sistema de limpieza que asegure la erradicación del microorganismo (LUNDÉN *et al.*, 2000).

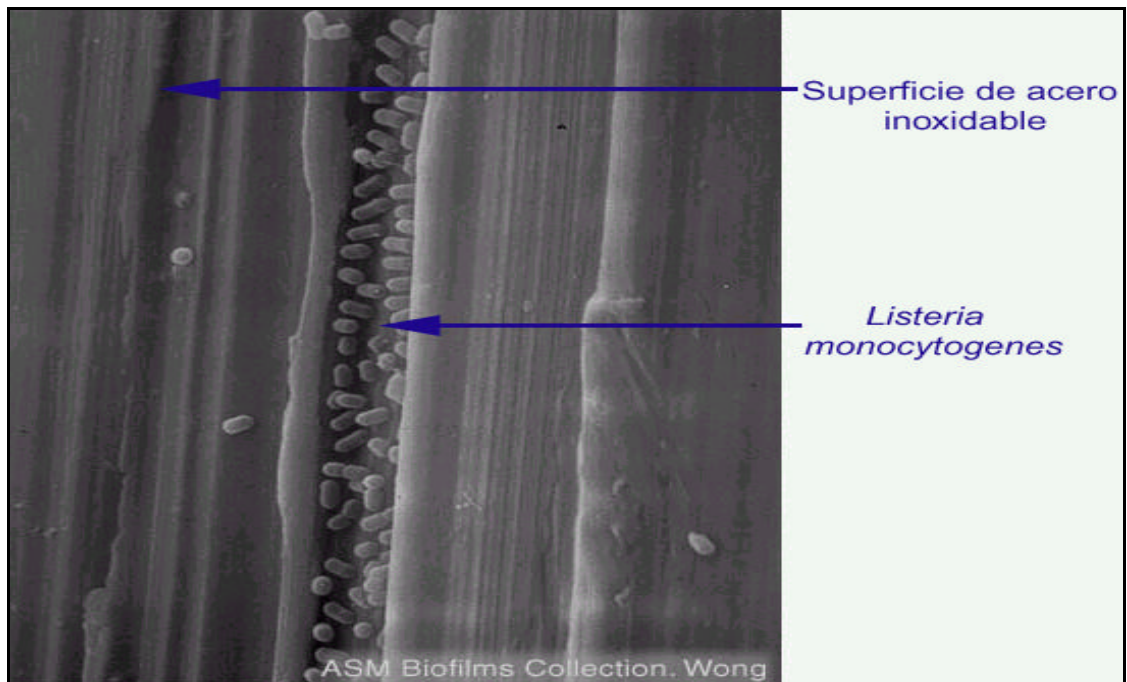


FIGURA 1. Biofilm de *L. monocytogenes* sobre una superficie de acero inoxidable

FUENTE: Biofilms en plantas Procesadoras de Alimentos ¹

2.1.3 *L. monocytogenes* en los alimentos. Puesto que la bacteria es capaz de crecer dentro de una amplia escala de temperaturas comprendida aproximadamente de 1°C a 45°C y en un rango de pH que va desde 4.1 hasta aproximadamente 9.6, está presente en una amplia variedad de productos y persiste en ellos durante mucho tiempo (JAY, 1992). La leche y los productos lácteos fueron los primeros y mejor estudiados respecto a esta bacteria. Se encuentra también en vegetales frescos, pero usualmente en bajo número probablemente debido a que el bajo pH de algunos vegetales no representa ser un buen sustrato para el crecimiento de *Listeria* (ROCOURT Y COSSART, 1997). Una amplia variedad de carnes y productos cárnicos han sido también asociados a contaminación con esta bacteria. La presencia de *Listeria* en estos

¹<http://www.asmta.org/edusrc/biofilms/infopage/045i.html>

productos, ya sean crudos o procesados puede ser elevada (hasta un 70%), dependiendo del pH, tipo de tejido (magro o graso), tipo y cantidad de microflora natural del producto y la temperatura e ingredientes del curado (JOHNSON *et al.*, 1990).

Uno de los factores que ha incidido de manera importante en la presentación de casos de listeriosis, es el incremento en la demanda de alimentos listos para su consumo, refrigerados o congelados por parte de los consumidores. Debido a que *L. monocytogenes* tiene la capacidad de sobrevivir ciertos procesos durante la elaboración de alimentos a partir de materias primas contaminadas y de crecer a temperaturas de refrigeración, se deben incorporar a los productos barreras adicionales al crecimiento microbiano, por lo que deben ser exploradas alternativas que aseguren la calidad sanitaria de los alimentos. Así nace el uso de tecnologías de preservación, clasificadas como de biopreservación, las cuales están definidas como, el uso de bacterias ácido lácticas, sus productos metabólicos o ambas para mejorar y asegurar la calidad sanitaria de alimentos no fermentados (HARRIS *et al.*, 1989; ROCOURT Y COSSART, 1997).

2.2 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas son un grupo filogenéticamente diverso de bacterias gram positivas caracterizado por algunos rasgos comunes, ya sean morfológicos, metabólicos y fisiológicos. Tienen forma de cocos o bacilos, la mayoría son aerotolerantes anaerobios, son catalasa y oxidasa negativas y sintetizan ATP en la fermentación láctica de los glúcidos, carecen de citocromos y no forman esporas. Según sus características bioquímicas, estas bacterias se clasifican en homofermentativas; cuyo único producto final de fermentación es el ácido láctico y en heterofermentativas que producen además del ácido láctico, etanol, acetato y CO₂ (CASP y ABRIL, 1999; BOURGEOIS y LARPENT, 1994).

Las bacterias ácido lácticas son industrialmente reconocidas por su capacidad de fermentación, la cual permite inhibir la microflora natural de un alimento incluyendo sus microorganismos deteriorantes y ocasionalmente patógenos, como *L. monocytogenes* (NEMETH *et al.*, 1996). Las especies más usadas para retardar el deterioro y preservar los alimentos en forma natural son los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Carnobacterium* (NETTLES y BAREFOOT, 1993). Estos microorganismos producen diferentes sustancias con características antimicrobianas. Su principal factor de inhibición es el descenso del pH, dado por la producción de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico. Los productos del metabolismo de algunas BAL, como el peróxido de hidrógeno y el diacetilo producido por bacterias fermentadoras del citrato, pueden contribuir también a la conservación de los productos alimentarios. La acción bactericida del peróxido de hidrógeno se atribuye a su efecto altamente oxidante, mediante peroxidación de los lípidos de la membrana y la destrucción de la estructura molecular básica de proteínas celulares. El diacetilo en cambio actúa desactivando enzimas microbianas por bloqueo o por modificación de la zona catalítica (O'KEEFFE y HILL, 1999; REQUENA y PELAEZ, 1995).

La síntesis de ácido láctico y la tolerancia de las BAL a este ácido y a un pH inferior a 7,0, permiten que éstas sean utilizadas en productos lácteos, cárneos y vegetales fermentados. Sin embargo, estos microorganismos pueden deteriorar la calidad organoléptica de los alimentos, produciendo olores desagradables y sabores amargos en vinos, cervezas, carnes y zumos de frutas (CASP y ABRIL, 1999; BOURGEOIS y LARPENT, 1994).

2.3 Péptidos antimicrobianos o bacteriocinas

Las bacterias ácido lácticas también producen sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica conocidas como bacteriocinas (O'KEEFFE y HILL, 1999; REQUENA y PELAEZ, 1995). Estas han sido definidas como sustancias

proteicas que exhiben un modo de acción bactericida o bacteriostático contra especies sensibles que están relacionadas taxonómicamente (PILET *et al.*, 1995; O'KEEFFE y HILL, 1999). Son grupos heterogéneos de péptidos o proteínas antibacterianas de síntesis ribosomal que varían en su espectro de actividad, modo de acción, peso molecular, origen genético y propiedades bioquímicas (ABEE *et al.*, 1995). Todas las bacteriocinas caracterizadas contienen un componente proteico esencial para su actividad biológica. Algunas son simples proteínas, mientras que otras son moléculas complejas con componentes lipídicos o carbohidratos (MEDINA *et al.*, 1992). Los criterios para considerar a un compuesto antimicrobiano producido por microorganismos gram positivos como bacteriocina, según TAGG *et al.* (1976) son:

- un estrecho espectro inhibitorio de actividad, fundamentalmente sobre especies homólogas a la especie productora.
- la presencia de un sitio proteico biológicamente activo.
- un modo de acción bactericida o bacteriostático
- la unión a receptores específicos celulares.
- la producción de bacteriocina por determinantes genéticos ligados a plasmidios y,
- la inmunidad de la célula productora frente a su propia bacteriocina.

A menudo se le aplica a las bacteriocinas la clasificación citada por TAGG *et al.* (1976), que restringe la designación de “bacteriocina” a proteínas producidas por determinantes genéticos ligados a plasmidios, las cuales son bactericidas en un estrecho espectro de bacterias cercanamente relacionadas y que poseen un sitio de unión específico. El propósito es, designar como bacteriocina solo a aquellas proteínas que presentan estas características y usar la denominación de sustancia tipo bacteriocina (STB), para describir aquellas proteínas antimicrobianas no caracterizadas completamente. Esta designación no está ampliamente adoptada, sin embargo, es útil ya que existen por lo menos cinco

casos distintos en donde se han aislado bacteriocinas en forma independiente y han sido denominadas con distintos nombres por diferentes investigadores, para luego encontrar que eran idénticas basado en sus secuencias de aminoácidos. La confusión de tener muchos nombres diferentes para la misma molécula impide el progreso en la investigación, y para prevenir esta confusión, se propuso usar el término STB (sustancia tipo bacteriocina), seguido de la designación de la cepa productora, como una forma provisional de señalar a una sustancia proteica inhibidora y sólo se le dará un nombre nuevo a la bacteriocina, cuando la secuencia de aminoácidos indique que ésta es, de hecho, única (Jack *et al*, citados por MONTVILLE y WINKOWSKY 1997)

2.3.1 Espectro de actividad antimicrobiana de las bacteriocinas. Estos péptidos antimicrobianos tienen la propiedad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y bacterias causantes del deterioro de los alimentos (MULET-POWELL *et al.*, 1998). El espectro de actividad de las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas se limita a bacterias gram positivas y no se conoce la inhibición de microorganismos gram negativos (MEDINA *et al.*, 1992). Sin embargo, el uso de agentes químicos como ácidos orgánicos, EDTA y otros agentes quelantes o condiciones ambientales adversas como nivel de pH, congelamiento o presión hidroestática que ocasionen daños a la estructura celular, pueden sensibilizar a microorganismos gram negativos tales como *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia* y *Aeromonas* (STEVENS *et al.*, 1992; CINTAS *et al.*, 2001). La susceptibilidad de las bacterias gram negativas a las bacteriocinas es entonces mucho más limitada. Según KLAENHAMMER (1988), para obtener actividad frente a bacterias gram negativas se requiere una mayor purificación de la bacteriocina. Dentro del grupo de bacterias gram positivas sensibles a las bacteriocinas se incluye varios patógenos de origen alimentario como *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* y *L. monocytogenes*.

2.3.2 Clasificación de las bacteriocinas. En una base científica se han establecido cuatro clases definidas de bacteriocinas según KLAENHAMMER, 1993:

- Clase I: lantibióticos; péptidos pequeños (menos de 5000 Da) que contienen en su estructura aminoácidos atípicos, como la nisina.
- Clase II: no lantibióticos, péptidos pequeños (menos de 10 KDa) termoestables.
- Clase III: proteínas termolábiles de peso molecular superior a 30 KDa.
- Clase IV: bacteriocinas de estructura compleja.

Las bacteriocinas más estudiadas son de la clase II, ya que poseen una poderosa acción antimicrobiana frente a un amplio rango de bacterias gram positivas deteriorantes y patógenas de los alimentos, especialmente frente a *L. monocytogenes*. Las especies de BAL que producen este tipo de bacteriocinas son *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Carnobacterium*. *Carnobacterium* spp. son comúnmente aisladas de carne envasada al vacío, son gram positivas, catalasa y oxidasa negativas, no esporuladas, heterofermentativas y no acidodúricas (SHAW y HARDING 1985). Producen bacteriocinas que se caracterizan por inhibir el crecimiento de distintas especies del género *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. grayii*) (AYMERICH *et al.*, 1998; BUCHANAN y KLAWITTER, 1992)

2.3.3 Factores que influyen en la producción y actividad de las bacteriocinas. La producción de bacteriocinas depende de la composición y pH del medio de cultivo y de la fase de crecimiento de la bacteria productora. El pH inicial del medio afecta tanto a la producción como a la estabilidad de las bacteriocinas. La producción máxima de algunas bacteriocinas ocurre durante y al final de la fase logarítmica de crecimiento. La incubación prolongada puede dar lugar a la pérdida de actividad debida a la actuación de enzimas proteolíticas producidas por los microorganismos o por la pérdida de estabilidad

de las bacteriocinas en condiciones de acidez creciente durante las últimas fases de crecimiento (MEDINA *et al.*, 1992).

2.3.4 Propiedades bioquímicas de las bacteriocinas. Debido a su naturaleza proteica, todas las bacteriocinas se inactivan por una o más enzimas proteolíticas, incluyendo aquellas de origen pancreático (tripsina y α -quimotripsina) y algunas de origen gástrico, como la pepsina. Esta característica permitiría la utilización de bacteriocinas en productos alimentarios, puesto que serían inactivadas durante su paso por el tracto gastrointestinal, sin ser absorbidos como compuestos activos y sin causar los riesgos relacionados con el uso de antibióticos (REQUENA y PELAEZ, 1995). Se han descrito bacteriocinas sensibles a enzimas no proteolíticas, como la plantaricina S, glicoproteína producida por *Lactobacillus plantarum*, la cual es sensible a la lipasa y amilasa, estas observaciones indicarían que la zona activa de esta bacteriocina presenta una composición heterogénea.

En la mayoría de las bacteriocinas de BAL se ha demostrado cierta resistencia al calentamiento. La sensibilidad a la temperatura depende del estado de purificación de la bacteriocina y de otros factores tales como el nivel de pH y la fuerza iónica. Se han observado bacteriocinas resistentes al autoclave y calentamiento a 100 - 121°C en sobrenadantes de cultivos libres de células, pero esta estabilidad térmica decrece en bacteriocinas purificadas y parcialmente purificadas. Sin embargo, la nisina purificada permanece activa después de un calentamiento a 100°C por 10 min a pH 2,0 (CINTAS *et al.*, 2001; MEDINA *et al.*, 1992). La característica de termoresistencia que presentan algunas de las bacteriocinas parece estar relacionada con su estructura molecular, normalmente compuesta por péptidos pequeños que no presentan estructura terciaria. Por otro lado, las bacteriocinas termolábiles, poseen mayor peso molecular y probablemente una estructura molecular más compleja. La termoresistencia de las bacteriocinas permite que permanezcan

activas después de tratamientos equivalentes a la pasteurización (63°C por 30 min; 72°C por 15 s) (PIARD y DESMAZEAUD, 1992).

La mayoría de las bacteriocinas de BAL son generalmente estables a pH ácido o neutro. La estabilidad a pH ácido o neutro indica probablemente una adaptación de estas sustancias al entorno natural de las bacterias que las producen. La nisina y la lactoestreptocina son, sin embargo, la excepción, ya que su actividad antimicrobiana es extremadamente dependiente de este parámetro. Es así como la nisina tiene su máxima solubilidad y estabilidad a pH 2,0, disminuyendo en la medida que aumenta el pH siendo irreversiblemente inactiva a pH 7,0. Por otro lado las lactoestreptocinas son estables y activas entre el rango de pH 4,2 a 5,0 y reversiblemente inactivas a pH 7,0 y 8,0. Por el contrario, muchas de las bacteriocinas de BAL descritas, resisten la exposición a un amplio rango de pH (3,0 a 9,0). La tolerancia a valores de pH extremos (entre 1,0 a 2,0 y 10,0 a 11,0) han sido reportadas para la acidocina B y bavaracina A (CINTAS *et al.*, 2001; PIARD y DESMAZEAUD, 1992).

2.3.5 Modo de acción de las bacteriocinas. Un mecanismo de acción común presentado por las bacteriocinas producidas por BAL consiste en la formación de poros en la membrana citoplasmática de células sensibles. La nisina y algunos péptidos de la clase II, actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática mediante la formación de poros o canales iónicos que provocan la reducción o disipación de la fuerza protón motriz. La estructura de las bacteriocinas, α -hélice o β -laminar, de dos caras, una hidrofílica y otra hidrofóbica, explicaría la formación de poros a partir del mecanismo que según el cual la naturaleza anfótera de la molécula permitiría la formación de oligómeros que atravesarían la membrana. Como consecuencia se observa, en general, una pérdida de iones K^+ , ATP y, en algunos casos, aminoácidos y moléculas pequeñas, como se muestra en la FIGURA 2. La pérdida de estas sustancias origina a su vez una pérdida del potencial de membrana, consumo

de las reservas energéticas celulares, descenso de la síntesis de ADN, ARN y proteínas, originando finalmente la muerte celular (BRUNO Y MONTVILLE, 1993; CINTAS *et al.*, 2001; REQUENA y PELAEZ, 1995).

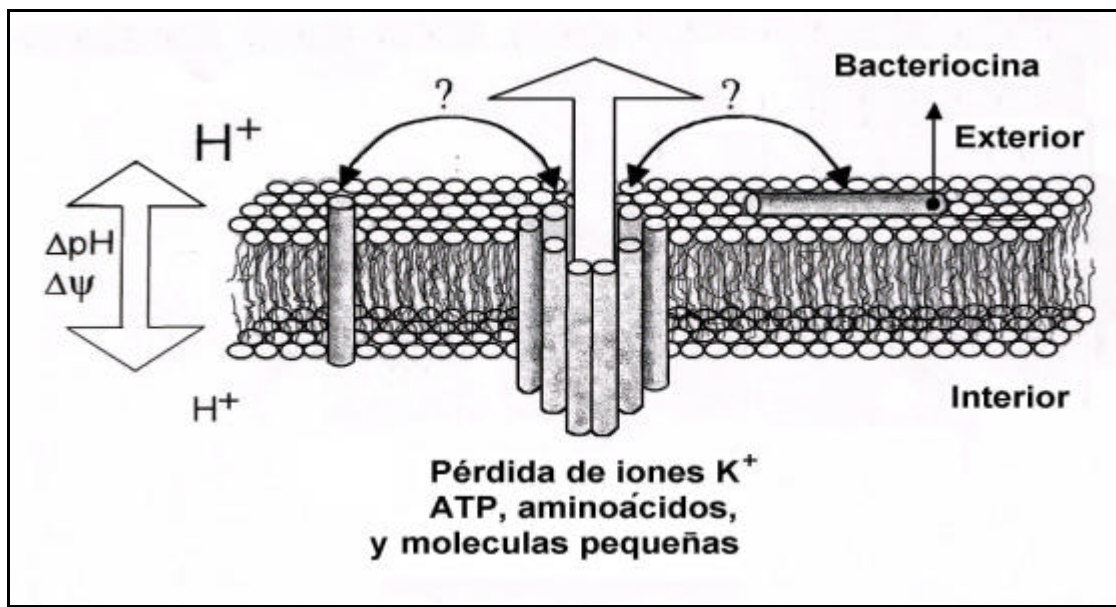


FIGURA 2. Modelo general del mecanismo de acción de péptidos antimicrobianos

FUENTE: McAULIFFE *et al.*, 2001

Estudios basados en las colicinas, bacteriocinas producidas por bacterias gram negativas, sugieren que la acción letal tiene lugar en dos fases. Primero la bacteriocina se absorbe a receptores específicos de la pared celular y posteriormente tienen lugar una serie de lesiones bioquímicas letales en la membrana citoplasmática. La primera parte es reversible, ya que la bacteriocina puede inactivarse con proteasas y la célula resulta viable. La segunda es irreversible (MEDINA *et al.*, 1992). Por otro lado, mientras que muchas bacteriocinas parecen presentar regiones anfóteras que contribuyen a la formación de poros, la especificidad en el espectro de acción de estos compuestos puede estar regida por la presencia de zonas variables en las

bacteriocinas, ya que algunas forman poros en protoplastos de las células sensibles y no en liposomas derivados de fosfolípidos, lo cual parece indicar la necesidad de receptores específicos de naturaleza proteica asociados a la membrana citoplasmática (REQUENA y PELAEZ, 1995).

2.3.6 Aplicación de las bacteriocinas en alimentos. Para el empleo de bacteriocinas en los alimentos, éstas deberán cumplir con ciertos requisitos tales como: no afectar las características organolépticas propias del producto, ser efectivas en bajas concentraciones y no ser tóxicas para el consumidor (MEDINA *et al.*, 1992). La nisina, ha sido aceptada en varios países para el uso como preservante de alimentos. Esta bacteriocina producida por *Lactococcus lactis subs. lactis* fue aislada por primera vez en 1945, se produce industrialmente desde los años 50 y se comercializa como Nisaplin[®], empleándose como agente antimicrobiano en alimentos, principalmente en Europa, aunque desde 1988, ha sido autorizado su uso en EEUU de Norteamérica como aditivo generalmente considerado seguro (GRAS) (MEDINA *et al.*, 1992). La nisina tiene un amplio espectro de actividad en contra de bacterias gram positivas (ROGERS y MONTVILLE, 1994). El extenso rango de microorganismos frente a los cuales presenta antagonismo la nisina incluye *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostocs*, *Pediococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Listeria*. Sin embargo, no se ha descrito efecto sobre bacterias gram negativas (REQUENA y PELAEZ, 1995).

En general, las condiciones que se presentan en un alimento determinado pueden ofrecer escasa solubilidad o una desigual distribución de la bacteriocina, ya que éstas son moléculas hidrofóbicas por lo que pueden adherirse a la fase lipídica orgánica de una matriz alimentaria. Sin embargo su pequeño tamaño molecular le permitiría penetrar y difundirse dentro de la fase acuosa de los alimentos. Además la sensibilidad que presentan estas sustancias proteicas a enzimas como la proteasa, dificultan su utilización en

productos como la carne, ya que éstas actuarían sobre la bacteriocina limitando su actividad (MONTVILLE y WINKOWSKY 1997)

Desde un punto de vista aplicado, las bacteriocinas pueden ser usadas como ingredientes bioactivos en polvo para alimentos, como péptidos purificados o semipurificados o a través de cultivos lácticos productores de bacteriocina. En cualquier caso, el uso de las bacteriocinas como una eficaz barrera antimicrobiana requiere de una tecnología en la cual actuarían diferentes factores antimicrobianos tradicionales (pasteurización, pH, preservantes), sinérgicamente con nuevas tecnologías (atmósfera modificada, envasado, altas presiones), cuyos sistemas en conjunto inducirían una acción letal sobre la bacteria que se quiere inhibir (CINTAS *et al.*, 2001).

2.3.7 Resistencia de los microorganismos a las bacteriocinas. Uno de los inconvenientes en el uso de las bacteriocinas consiste en su pérdida de eficacia frente a los microorganismos sensibles en un período prolongado de permanencia frente a éstos, ya que luego de una fase inicial de lisis celular de la población bacteriana sensible, se presenta la resistencia de algunas células viables que vuelven a crecer. Éstos serían mutantes resistentes a la bacteriocina. Es así como algunos autores han informado sobre la existencia de mutantes espontáneos de *L. monocytogenes* resistentes a ciertas bacteriocinas (JUNEJA y DAVIDSON, 1993). Según REKHIF *et al.* (1994), la resistencia que presentan los microorganismos a las bacteriocinas, es un carácter estable que persiste luego de diez subcultivos de la bacteria, en presencia o ausencia de la respectiva bacteriocina. Esta resistencia puede ser intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca puede ser definida como una propiedad cromosómica controlada de un organismo y la resistencia adquirida es el resultado de cambios genéticos en una célula bacteriana (mutación) o la adquisición de material genético desde otra célula (JUNEJA y DAVIDSON, 1993).

La naturaleza de la resistencia que presentan los mutantes puede ser debida a la destrucción o inactivación de las bacteriocinas por moléculas extracelulares como las enzimas, o debida a una mala adsorción o modificación de los receptores letales específicos de la célula bacteriana (REKHIF *et al.*, 1994). Muchas bacterias gram positivas se han mostrado resistentes a la actividad de la nisina, debido a que éstas sintetizan una enzima, nisinasa, la cual inactiva a la bacteriocina (ABEE *et al.*, 1995). Sin embargo, las investigaciones sobre la resistencia de bacterias gram positivas se han enfocado principalmente en la composición lipídica de la membrana citoplasmática de la bacteria sensible. MING y DAESCHEL (1995), sugieren que la resistencia de *L. monocytogenes* a la nisina es debida a un cambio en la estructura fosfolípida de la membrana celular de la bacteria sensible, ya que se observó que la resistencia de *L. monocytogenes* a la nisina fue acompañada de una significativa reducción en el contenido de fosfolípidos totales. De esta manera, la composición de ácidos grasos en la membrana citoplasmática de la bacteria tiene un efecto sobre la capacidad de las bacteriocinas para penetrar la célula y causar su inhibición (JUNEJA y DAVIDSON, 1993). Henning *et al.* citados por MURIANA (1996), propusieron que la interacción hidrofóbica entre los residuos de aminoácidos de la nisina y los ácidos grasos de la membrana fosfolípida era la responsable de la interacción entre la bacteriocina y la membrana citoplasmática.

Respecto a las bacteriocinas producidas por cepas de *Carnobacterium piscicola*, se han reportado efectos bacteriostáticos o “parcialmente” bactericidas sobre distintas cepas de *L. monocytogenes* en leche descremada (MATHIEU *et al.*, 1994); y en salmón ahumado y fresco refrigerado (GÓMEZ, 2002; DELGADO, 2001). En un estudio en caldo de cultivo (SUAZO, 2001), se encontró que cuatro cepas de *L. monocytogenes* fueron capaces de desarrollar resistencia a la bacteriocina de *C. piscicola* L103. De manera de contrarrestar esta característica de resistencia, se requiere aplicar un sistema combinado de factores de inhibición, como lo indica la “tecnología de obstáculos”, para

aumentar la efectividad de las bacteriocinas y disminuir de esta manera la presentación de mutantes resistentes.

2.4 Factores de inhibición combinados o tecnología de obstáculos

El propósito en el uso de bacteriocinas, no significa que son el factor de mayor importancia para la seguridad sanitaria y preservación de los alimentos. Cada vez, y con mayor frecuencia se les ha considerado a las bacteriocinas como contribuyentes en la “tecnología de obstáculos” para la preservación y seguridad sanitaria de los alimentos. Ello implica enfrentar los microorganismos a un medio hostil en orden a inhibir su crecimiento, acortar su sobrevivencia y/o causar su muerte. La resistencia que encuentran los microorganismos para su crecimiento y/o sobrevivencia en un alimento está determinada por una serie de factores intrínsecos como pH, a_w , potencial redox, y factores extrínsecos como lo es la temperatura de almacenamiento y la atmósfera de envasado, barreras las cuales actúan como “obstáculos” para los microorganismos. En la FIGURA 3 se muestra un ejemplo en donde cada barrera u “obstáculo” contribuye a la eventual inhibición del microorganismo y se grafica con líneas entrecortadas la capacidad que tiene el microorganismo de ir superando cada barrera hasta su inhibición. La utilización de un sistema de factores inhibidores combinados presenta una ventaja fundamental, puesto que permite una aplicación menos extrema de un tratamiento simple, ya que limita la intensidad de cada factor con el fin de reducir sus efectos negativos y acumular, con la combinación de varios factores, sus efectos positivos conservando las cualidades específicas de los productos. El concepto de la tecnología de obstáculos comprende entonces el uso de estos factores en combinación, cuyas interacciones son significativas para la estabilidad microbiana de los alimentos, lo que le da al producto calidad sanitaria y lo identifica como seguro para la salud de los consumidores (BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 1997; CASP y ABRIL, 1999)

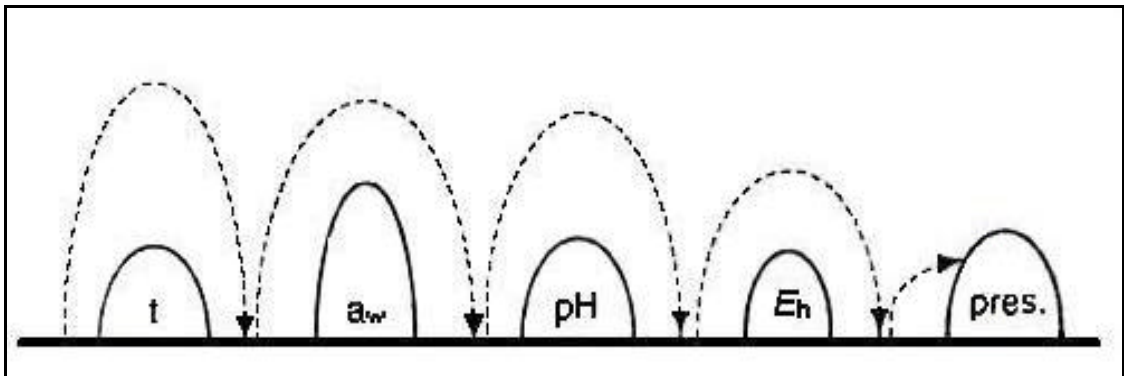


FIGURA 3. Ejemplo del efecto de la tecnología de obstáculos sobre los microorganismos

FUENTE: GORRIS, (1999)

La refrigeración y la atmósfera modificada han sido las principales barreras usadas para controlar la proliferación microbiana en los alimentos no procesados, pero debido a la presencia de patógenos como *L. monocytogenes* que crece a bajas temperaturas y bajo atmósfera modificada, se requieren barreras adicionales para otorgar una óptima seguridad sanitaria a un producto. Las bacteriocinas tienen un espectro de actividad antimicrobiana que incluye microorganismos patógenos como *L. monocytogenes*. En contraste a barreras bioestáticas, las cuales simplemente detienen el crecimiento de los microorganismos, las bacteriocinas pueden ser una barrera bactericida la cual reduciría los niveles de microorganismos susceptibles, dificultando la sobrevivencia y crecimiento de los microorganismos en los alimentos (MURIANA, 1996; GORRIS, 1999)

2.5 Factores que contribuyen al efecto antagónico de las bacteriocinas

Entre las principales limitaciones en el uso de las bacteriocinas en los alimentos están, su estrecho espectro de actividad antimicrobiana, su bajo poder de acción frente a bacterias gram negativas y levaduras y, la existencia de cepas resistentes. Para contrarrestar la resistencia que presentan algunos microorganismos a las bacteriocinas, se estudia la posibilidad de combinarlas

con otros factores de inhibición, los cuales incrementarían la efectividad en la acción antimicrobiana de éstas. Ejemplos de estos factores son las tradicionales barreras comúnmente usadas en alimentos tales como la acidificación, la adición de NaCl, las temperaturas de refrigeración y la utilización de atmósfera modificada con la incorporación de dióxido de carbono (DE MARTINIS *et al.*, 1997; NINGYUN CAO y CHEN, 1994).

Varias estrategias han sido propuestas para mejorar la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas. Una de éstas alternativas es el uso de combinaciones de diferentes bacteriocinas (MULET-POWELL *et al.*, 1998). Se ha demostrado que la aplicación de diferentes bacteriocinas combinadas de BAL, contribuye a reducir la frecuencia de poblaciones bacterianas resistentes y a mejorar la calidad sanitaria y la vida útil de un alimento (CINTAS *et al.*, 2001), ya que la acción combinada de dos o más bacteriocinas puede reforzar considerablemente la acción inhibidora frente a bacterias patógenas (REQUENA y PELAEZ, 1995). HANLIN *et al.*, (1993), indican que las bacteriocinas lácticas en combinación tendrían una mayor propiedad antibacteriana en un gran número de bacterias gram positivas. En su trabajo, observaron que una mayor cantidad de *Listeria* fue inhibida por la combinación de pediocina más nisina que las mismas aplicadas en forma individual. MULET-POWELL *et al.* (1998), también demostraron que combinaciones de pediocina AcH más lacticina 481 y pediocina AcH más lacticina F, presentaban una acción sinérgica frente a *L. monocytogenes*.

Otra manera de potenciar la actividad inhibitoria de una bacteriocina, es combinándola con factores antimicrobianos que sean además favorables a su actividad. El NaCl modifica el balance osmótico del ambiente que rodea a una bacteria, en este ambiente con reducida actividad de agua el microorganismo pierde agua para reestablecer el equilibrio osmótico. La pérdida de agua resulta en una reducción de la actividad metabólica, deteniéndose el crecimiento de la

bacteria. Una alta concentración de NaCl puede ejercer un efecto deshidratante sobre los microorganismos y esta pérdida de agua de las células o plasmólisis resulta en una mayor inactivación celular. La concentración de NaCl requerida para limitar el crecimiento microbiano depende de la fase de crecimiento de los microorganismos y de la temperatura (BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 1997). En un trabajo realizado por DE MARTINIS *et al.* (1997), se evaluó el efecto combinado del NaCl y la temperatura en la efectividad de la nisina contra *L. monocytogenes*. Uno de sus resultados fue que la resistencia de la bacteria a la nisina se vio disminuida con el incremento de la concentración de sal. THOMAS y WIMPENNY (1996), quienes estudiaron el efecto combinado de variaciones de temperatura y NaCl, demostraron que las bajas temperaturas y las concentraciones más elevadas de NaCl incrementaron sinérgicamente la acción inhibitoria de la nisina frente a *L. monocytogenes*. El incremento de la concentración de NaCl potenció también la acción inhibitoria de la nisina frente a *Staphylococcus aureus*.

Otra de las alternativas es el uso de atmósfera modificada como factor de inhibición de los microorganismos, lo cual resulta favorable a la acción de la bacteriocina. El uso de dióxido de carbono para la destrucción de microorganismos es de gran interés. Este método conceptualmente difiere de los procesos convencionales de preservación, en que éste, produce la pérdida de sustancias intracelulares desde las células o membranas. Un daño en las áreas críticas de la pared celular produce un desbalance en el sistema biológico de la célula causando la muerte de la bacteria. La ventaja del tratamiento con dióxido de carbono es que la inactivación microbiana no solo es efectiva en bacterias expuestas ya que también puede penetrar en materiales porosos y afectar a los microorganismos dentro de los alimentos (NINGYUN CAO y CHEN, 1994). El mecanismo en la inhibición por CO₂ es una combinación de varios procesos y uno de éstos es el efecto del CO₂ sobre el pH. El dióxido de carbono se disuelve en agua produciendo ácido carbónico el cual se disocia

parcialmente en ion bicarbonato (HCO_3^-) e ion hidrógeno. El ácido carbónico produce una apreciable caída del pH. Probablemente la mayor importancia en el efecto de inhibición, es la habilidad del CO_2 de penetrar la membrana plasmática y acidificar el interior de la célula. El efecto del dióxido de carbono no es uniforme entre los microorganismos. Las bacterias gram negativas son más sensibles a éste, mientras que las bacterias gram positivas, particularmente *Lactobacillus*, tienden a ser más resistentes. Otro factor contribuyente son los cambios en las propiedades físicas de la membrana plasmática que afecta el transporte de solutos; la inhibición de importantes enzimas, particularmente aquellas envueltas en reacciones de carboxilación y descarboxilación en la cual el CO_2 es un reactante y finalmente la reacción con grupos amino de proteínas lo que causa cambios en sus propiedades y actividad (ADAMS y MOSS, 2000). El tratamiento con CO_2 puede también ser combinado con otras barreras antimicrobianas, como las bacteriocinas, aumentando así su efectividad inhibidora especialmente a temperatura de refrigeración (NINGYUN CAO y CHEN, 1994). Un factor muy importante en el uso de CO_2 en combinación con otros factores de inhibición es su fuerte dependencia a la temperatura, debido a que su efectividad antimicrobiana es reforzada con la reducción de la temperatura. La razón del efecto favorecedor de la temperatura de refrigeración sobre acción antimicrobiana del CO_2 es el incremento en la solubilidad en agua al disminuir la temperatura. La solubilidad del CO_2 a 0°C es alrededor del doble que a 20°C , como se observa en el CUADRO 1 (ADAMS y MOSS, 2000; DANIELS *et al.*, 1985).

CUADRO 1. Solubilidad del dióxido de carbono en agua a varias temperaturas (volumen de CO_2 / volumen de agua) a 1 atm

Temperatura ($^\circ\text{C}$)	0	12	20	26	32
Solubilidad	3,46	2,20	1,71	1,84	1,27

FUENTE: adaptado según DANIELS *et al.*, (1985)

3. MATERIAL Y MÉTODO

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL) de la Universidad Austral de Chile, entre junio y diciembre del año 2001.

I.Trabajo Preexperimental

En el estudio se utilizó la cepa láctica *Carnobacterium piscicola* L 103 productora de una sustancia tipo bacteriocina (STB). Con el objeto de seleccionar una cepa adicional con actividad antagonica de tipo bacteriocina, frente a *Listeria monocytogenes* Lm 82, se realizaron pruebas preliminares con cepas de bacterias ácido lácticas de cepario del laboratorio de microbiología.

3.1 Selección de cepas bacterianas ácido lácticas productoras de sustancias tipo bacteriocina (STB)

Se trabajó con ocho cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de carne envasada al vacío y de cecina (SCHÖBITZ, 1989¹) que presentaban actividad antagonica frente a *L. monocytogenes* Lm 82. Las cepas lácticas estudiadas habían sido designadas como: K 47, K 54, K 86, K 138, K 140, M 3, M 14, M 31. Las cepas se mantuvieron congeladas a $-18 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (freezer Fensa, Chile) en caldo Soya Trypticasa (ST), adicionado de glicerol al 1% (como crioprotector). Para controlar su pureza éstas fueron sembradas con asa en placas de agar ST e incubadas a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Posteriormente se les realizó una tinción de gram para verificar nuevamente su pureza y morfología.

¹ Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile

3.2 Cepa indicadora, *Listeria monocytogenes*

Se trabajó con la cepa *L. monocytogenes* Lm 82 (Food and Drug Administration F.D.A., Washington DC), la cual se mantuvo congelada a $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en caldo ST adicionado con 1% de glicerol. Para verificar morfología y pureza, se inoculó en caldo ST (inóculo al 1%) a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h y se le realizó la tinción de gram.

3.3 Prueba de antagonismo indirecto con las cepas de BAL productoras de STB (TAGG *et al.*, 1976)

Las cepas de BAL productoras de STB (3.1) fueron incubadas en caldo ST a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h. A partir de los cultivos, se inocularon placas de agar ST en forma de gota con tórula estéril. Las placas fueron incubadas a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ en atmósfera con 10% CO_2 por 24 h. La cepa indicadora *L. monocytogenes* Lm 82, fue incubada en caldo ST a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 h. A partir de este cultivo se realizaron dos diluciones en buffer fosfato (APHA, 1992), tomando 0,7 mL de la mayor dilución la cual se adicionó a 7 mL de agar semisólido (caldo ST con 0,75% de agar), para obtener una concentración final de 10^5 ufc/mL. Este cultivo fue vertido como césped sobre las placas de agar ST, previamente inoculadas con las cepas lácticas en estudio. Las placas fueron nuevamente incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h. **Lectura:** reacción positiva, determinada por la presencia de halos de inhibición alrededor de los inóculos bacterianos.

3.4 Prueba de antagonismo con los sobrenadantes de los cultivos de las cepas BAL (TAGG *et al.*, 1976)

3.4.1 Obtención de los sobrenadantes con las STB. Las cepas de BAL (3.1) productoras de STB, fueron inoculadas en caldo ST (inóculo al 1%) con agitación a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Posteriormente los cultivos fueron centrifugados a 7.700 g por 20 min a 4°C (Centrífuga Beckmann J-12, rotor JA-20, California, USA). A los sobrenadantes se les ajustó el pH a 6,5 con NaOH 40% (P/V) para

eliminar el efecto de inhibición por acidez y posteriormente, fueron esterilizados por filtración a través de filtros Acrodisc 0,22 μm (Gelman Sciences, Inc., Ann Arbor, Mich) y conservados a $-18 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta su utilización (Freezer Fensa, Chile).

3.4.2 Técnica de la gota sobre césped. Un cultivo de 18 h en caldo ST de la cepa indicadora (3.2) fue diluido a 10^5 ufc/mL (concentración final) en agar semisólido (caldo ST con 0,75% de agar) temperado a 45°C . Este fue vertido sobre placas que contenían 5 mL de agar ST y secada su superficie bajo campana de flujo laminar (Pure Aire, Van Nuys, California). Luego fueron puestas sobre las placas gotas de 20 μL del sobrenadante neutralizado y esterilizado de las cepas lácticas (3.4.1). Las placas fueron incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h. **Lectura** reacción positiva, determinada por la formación de halos de inhibición en el césped de la bacteria indicadora.

3.4.3 Análisis estadístico. Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante el análisis de varianza simple (una vía) con un nivel de confianza del 95%. Al registrarse diferencia significativa entre las distintas cepas se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey, para determinar la cepa de mayor acción antagonista utilizando el software Statgraphics 2.0 plus. En esta etapa fue seleccionada la cepa láctica productora de STB, designada como M14, por presentar la mayor capacidad para inhibir a *L. monocytogenes* Lm 82 (el halo de inhibición fue de mayor tamaño y nitidez que las demás cepas en estudio).

3.5 Pruebas para descartar otros inhibidores y confirmar la naturaleza proteica de la STB de cepa M14

3.5.1 Prueba de la catalasa (AHN y STILES, 1990). Para excluir el potencial de inhibición por peróxido de hidrógeno, el sobrenadante de la cepa M14 neutralizado y esterilizado por filtración (3.4.1) fue tratado con catalasa de hígado de bovino (Sigma N° C-10). Para la prueba, un tubo con 5 mL del

sobrenadante fue inoculado con 100 UI (38,46 μ g) de catalasa por mL de sobrenadante. Como control se dejó un tubo sin tratar con la enzima. Ambos tubos fueron incubados a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 2 h. Transcurrido el tiempo, los tubos fueron dejados en baño maría (Memmert, Thelco) a $95 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5 min para la inactivación por calor de la enzima. **Lectura:** la actividad remanente de la STB se determinó mediante la técnica de la gota sobre césped (3.4.2). En el caso de ser una STB no debía verse afectada su actividad inhibidora en presencia de la enzima.

3.5.2 Prueba de la proteasa (AHN y STILES, 1990). Para confirmar el origen proteico de la sustancia inhibidora, el sobrenadante ajustado a pH 6,5 y esterilizado por filtración (3.4.1) fue tratado con proteasa tipo I, de páncreas de bovino (Sigma N° P4630). Un tubo con 5 mL de sobrenadante fue inoculado con 1 mg de la enzima por mL. Como control se dejó un tubo sin tratar con la enzima. Ambos tubos fueron incubados en baño maría a 37°C por 2 h y posteriormente, fueron dejados en baño maría a $95 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5 min para la inactivación por calor de la enzima. **Lectura:** la actividad remanente de la STB fue medida mediante la técnica de la gota sobre césped (3.4.2). En presencia de una STB en el sobrenadante tratado con la enzima, se elimina el efecto inhibidor sobre *L. monocytogenes*, obteniéndose ausencia del halo de inhibición en el césped.

II. Trabajo Experimental

Para el desarrollo del trabajo experimental se trabajó con la STB de cepa M14 en combinación con la STB de cepa *C. piscicola* L 103.

3.6 Producción de la STB de cepa M 14

A partir de un cultivo de 24 h en caldo D-MRS de la cepa M14, se inocularon 400 mL de caldo D-MRS, incubados bajo agitación a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h. De

este cultivo se obtuvo el sobrenadante tratado descrito anteriormente (3.4.1). Este fue conservado a $-18 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta su utilización.

3.7 Obtención de la STB de cepa *C. piscicola* L 103

Se trabajó a partir de un cultivo continuo en caldo D-MRS de la cepa *C. piscicola* L103 (ZUÑIGA, 2002), el cual se almacenó congelado a $-18 \pm 1^\circ\text{C}$. El sobrenadante del cultivo se obtuvo a partir de la técnica descrita anteriormente (3.4.1).

3.8 Prueba para medir las actividades de las STB de *C. piscicola* L 103 y cepa M 14 (BAREFOOT y KLAENHAMMER, 1983)

Para conocer la actividad de las STB en los sobrenadantes de las cepas *C. piscicola* L 103 y cepa M 14, se utilizó el ensayo de dilución crítica, el cual consistió en diluir el sobrenadante en proporciones de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 con buffer fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,05 M, pH 6,5) dejando un control sin diluir. Se utilizó la técnica de la gota sobre césped (3.4.2). Para ello se colocaron 20 μL de cada dilución sobre una placa de agar ST cubierta con el césped de la bacteria indicadora, *L. monocytogenes* Lm 82. Las placas se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h. **Lectura:** la actividad inhibitoria de las STB se definió como el recíproco de la mayor dilución que presentó un halo de inhibición y se expresó en UA / mL (unidades de actividad por mililitro).

3.9 Estudio del sinergismo de las STB con factores favorables a su actividad antagonista frente a *L. monocytogenes*

Para el estudio del sinergismo de las STB con los factores, se utilizó la técnica de difusión en agar (3.9.1).

3.9.1 Técnica de difusión en agar para la determinación de la capacidad inhibitoria de las STB (BAREFOOT y KLAENHAMMER, 1983). Se trabajó con placas de 30 mL de agar ST y en las cuales por medio de un sacabocado de 7 mm de diámetro se hicieron pocillos. A cada pocillo se le adicionó en forma

separada 50 μ L de las muestras. Para la absorción del líquido en los pocillos, las placas se dejaron durante 1 h bajo campana de flujo laminar. Posteriormente éstas fueron cubiertas con 9 mL de agar semisólido previamente inoculado con 0,9 mL de un cultivo de 18 h de la cepa *L. monocytogenes* diluida a 10^5 ufc/mL (concentración final).

3.9.2 Aplicación de las STB con diferentes niveles de NaCl, CO₂ y temperatura. Se trabajó en forma separada con las STB de la cepa de *C. piscicola* L 103 y de la cepa M 14. Para la prueba se usaron distintas concentraciones de NaCl (3, 6 y 12% (P/V)) y un control con 0% (P/V) de NaCl. Para ello se prepararon soluciones con 6, 12 y 24% de NaCl esterilizadas en autoclave, las que fueron mezcladas en forma separada y en proporciones iguales con las STB (3.6; 3.7). Para los controles con 0% de NaCl se mezclaron en proporciones iguales las STB en forma separada con caldo ST. Además se usó un control sin STB, pero con 12% de NaCl para descartar el efecto inhibitor del NaCl sobre *L. monocytogenes*. Para la prueba se utilizó la técnica de difusión en agar (3.9.2) colocando 50 μ L de los tratamientos señalados en el CUADRO 2. Como cepa indicadora se utilizó *L. monocytogenes* Lm 82 (3.2)

CUADRO 2. Tratamientos de las STB con diferentes niveles de NaCl

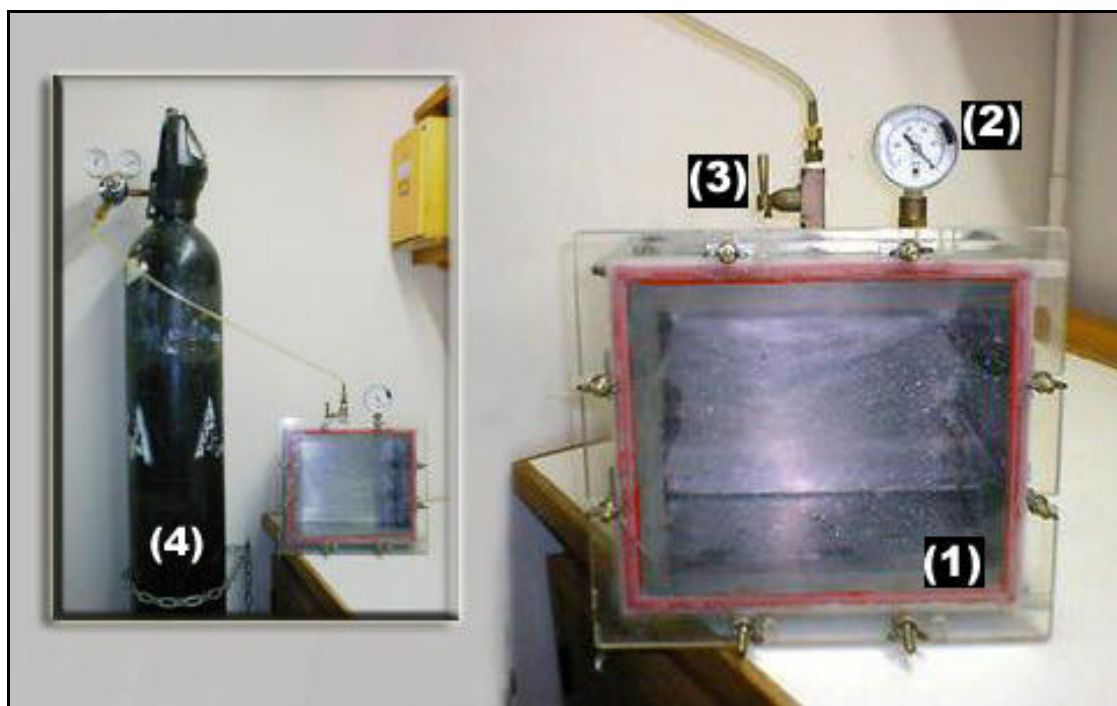
Tratamiento		Tratamiento	
A	STB ⁽¹⁾ + 0% NaCl	A	STB ⁽²⁾ + 0% NaCl
B	STB + 3% NaCl	B	STB + 3% NaCl
C	STB + 6% NaCl	C	STB + 6% NaCl
D	STB + 12% NaCl	D	STB + 12% NaCl
E	12% NaCl (Control)	E	12% NaCl (Control)

STB ⁽¹⁾ = Sustancia tipo bacteriocina de cepa *C. piscicola* L103 con actividad de 800 UA/mL

STB ⁽²⁾ = Sustancia tipo bacteriocina de cepa M14 con actividad de 400 UA/mL.

3.9.3 Condiciones de incubación de los diferentes tratamientos. La incubación de las placas fue a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h y a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ por 14 días. Se

incluyó la variable con y sin CO₂, para lo cual las placas fueron incubadas en una cámara de vacío, a la que se le inyectaba CO₂ al 10% como se muestra en la FIGURA 4. Las diferentes condiciones de incubación de los tratamientos se señalan en el CUADRO 3. Cada tratamiento se realizó en duplicado y con tres repeticiones.



(1) Cámara de Vacío; (2) Manómetro; (3) Válvula de Inyección de gas; (4) Cilindro de gas.

FIGURA 4. Sistema de incubación bajo atmósfera de CO₂¹

CUADRO 3. Condiciones de temperatura y CO₂ en los diferentes tratamientos con las STB y NaCl

I	4 ± 2°C en atmósfera con CO ₂ por 14 días
II	25 ± 1°C en atmósfera con CO ₂ por 24 h.
III	4 ± 2°C al ambiente por 14 días
IV	25 ± 1°C al ambiente por 24 h.

¹ Composición de la atmósfera 90% N₂ y 10% CO₂

3.9.4 Análisis estadístico. Los resultados de los halos de inhibición obtenidos en cada tratamiento se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza multifactorial con un nivel de confianza de un 95%. Al registrarse diferencia significativa se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey para determinar el tratamiento más efectivo. Se utilizó el Software Statgraphics 2.0 plus.

3.10 Estudio de la combinación de las STB de la cepa *C. piscicola* L 103 y la cepa M14

3.10.1 Liofilización de las STB. Para incrementar la actividad de las STB en los sobrenadantes previo al estudio de ambas sustancias combinadas, éstas fueron liofilizadas y posteriormente resuspendidas en un volumen inferior al inicial. Volúmenes de 300 mL de los sobrenadantes de la cepa de *C. piscicola* L103 y cepa M14 fueron liofilizados durante 24 h (LABCONCO, USA). Los sobrenadantes deshidratados fueron reconstituidos en 30 mL de buffer fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,05 M, pH 6,5). Posterior a este proceso, los sobrenadantes fueron nuevamente esterilizados por filtración (3.4.1).

3.10.2 Combinación de las STB. Se combinaron en proporción 1:1 las dos STB liofilizadas y rehidratadas (3.10), para estudiar un posible efecto sinérgico entre ambas, favorable a su actividad antagonista frente a *L. monocytogenes* Lm 82. Se utilizó la técnica de difusión en agar (3.9.1). Para la prueba se hicieron pocillos en placas con agar ST. Un pocillo contenía la mezcla de las STB, y dos pocillos fueron los controles de cada una de las STB por separado. Para evaluar el efecto de la temperatura, las placas se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h y a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ por 14 días bajo condiciones ambientales. La prueba se realizó en duplicado y con tres repeticiones

3.10.3 Análisis estadístico. Los resultados de los halos de inhibición obtenidos por cada STB por separado y ambas en combinación, se analizaron estadísticamente, mediante un análisis de varianza simple (una vía) con un 95% de confianza. El chequeo de varianza se realizó con el test de Barlett. Al registrarse diferencia significativa se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey, para determinar la más efectiva, utilizando el software Statgraphics 2.0 plus.

3.11 Estudio del antagonismo en placa de la combinación de las STB, más factores favorables a su actividad frente a *L. monocytogenes*

La combinación de las dos STB se sometió a los niveles de temperatura, CO₂ y NaCl que resultaron más efectivos en el estudio de las STB en forma individual (3.9.2). Se utilizó la técnica de difusión en agar (3.9.1). A la combinación de ambas STB le fue aplicada una concentración de 12% (P/V) de NaCl y fue incubada en una atmósfera con CO₂ a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 14 días. Como control se chequearon ambas STB en forma separada. Además a cada tratamiento se le determinó la actividad (UA/mL), usando el ensayo de dilución crítica mediante la técnica de la gota sobre césped (3.4.2) aplicando la combinación más efectiva de los factores (3.9.2) antes mencionados. Cada tratamiento se realizó en duplicado y con tres repeticiones.

3.11.1 Análisis estadístico. Los resultados de los halos de inhibición obtenidos por las STB separadas y combinadas, expuestas además a los factores favorables, se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza simple (una vía) con un 95% de confianza. El chequeo de varianza se realizó con el test de Barlett. Al registrarse diferencia significativa se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey, para determinar cual es más efectiva, utilizando el software Statgraphics 2.0 plus.

3.12 Estudio del antagonismo en caldo de cultivo de la combinación de las STB con factores favorables a su acción inhibidora frente a *L. monocytogenes* Lm 82

Para la prueba fueron usados los factores que resultaron más efectivos en la inhibición de *L. monocytogenes* (3.9.2) y se prepararon los tres tratamientos que se señalan en la FIGURA 5. Un Tubo con 5 mL de caldo ST al 12% (P/V) de NaCl, fue inoculado con un cultivo de 24 h de *L. monocytogenes*, a una concentración final en el caldo de 10^6 ufc/mL. Posteriormente se le inoculó 5 mL de una mezcla en proporciones iguales de ambas STB y se incubó a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, en una atmósfera con 10% de CO_2 durante 14 días. Como control, se utilizó un tubo con 10 mL de caldo ST al 12% (P/V) de NaCl inoculado con *L. monocytogenes* a una concentración de 10^6 ufc/mL, sin la mezcla de STB. Un segundo control consistió en un matraz con 5 mL de caldo ST al 12% (P/V) de NaCl, más 5 mL de la mezcla de STB para comprobar la actividad de ésta en el tiempo. Ambos controles también fueron incubados a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ en una atmósfera con 10% de CO_2 por 14 días.

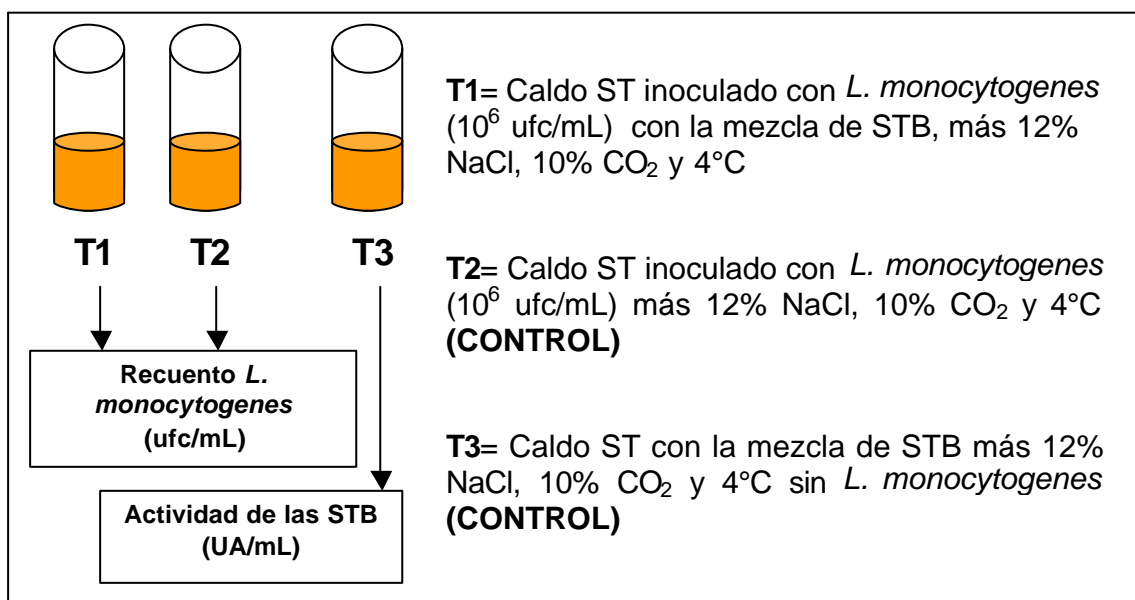


FIGURA 5. Tratamientos y análisis realizados en la prueba de antagonismo en caldo

3.12.1 Análisis de los tratamientos. Para verificar el efecto bactericida o bacteriostático de la mezcla de STB sobre *L. monocytogenes*, se realizaron recuentos de la bacteria en la superficie de agar ST a los 0, 3, 7 y 14 días y se determinó la actividad remanente de la mezcla de STB en el control en cada fecha de muestreo (FIGURA 5). Cada tratamiento se realizó en duplicado y con 3 repeticiones.

3.12.2 Análisis estadístico. Los resultados de los recuentos de *L. monocytogenes* se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza multifactorial, con un nivel de confianza de 95%. Al registrarse diferencias significativas se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Para verificar diferencias significativas entre el caldo con las STB y el control entre días, se realizaron análisis de varianza simple por cada día de recuento. Anterior a esto, se realizó un chequeo de varianza con el test de Barlett. Al registrarse diferencia significativa en el análisis de varianza, se aplicó entonces la prueba de comparación múltiple de Tukey

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Selección de una cepa productora de STB con actividad antagonista frente a *Listeria monocytogenes*

La primera etapa de este trabajo consistió en la selección de una cepa productora de una STB, adicional a *Carnobacterium piscicola* L103 con actividad antagonista frente a *L. monocytogenes*, para estudiar el efecto combinado de ambas STB frente a la bacteria patógena. Para la selección se realizaron pruebas de antagonismo en placa, con las cepas lácticas y los sobrenadantes de los cultivos.

4.1.1 Prueba de antagonismo con las cepas productoras. De las 8 cepas lácticas en estudio, 7 mostraron actividad frente a *L. monocytogenes* (ANEXO 1.1). En el CUADRO 4 se presentan los halos de inhibición promedio obtenidos, donde la cepa que presentó el mayor halo de inhibición fue K86 con un promedio de $24,20 \pm 0,28$ mm. Esta inhibición sin embargo pudo deberse principalmente a productos metabólicos del desarrollo de la cepa. Esto se comprueba ya que en el sobrenadante neutralizado el efecto inhibitor fue menor, alcanzando sólo $20,57 \pm 0,83$ mm, por lo que se trabajó con los sobrenadantes neutralizados de las cepas para descartar la inhibición debida a la acidez del caldo de cultivo.

4.1.2 Prueba de antagonismo con los sobrenadantes de los cultivos de las cepas de BAL. En esta etapa se seleccionó la cepa cuyo sobrenadante neutralizado presentó el mayor halo de inhibición. Los resultados del CUADRO 4 y el análisis estadístico mostraron diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los halos de inhibición de las diferentes cepas (ANEXO 1.2.1). El test de

comparación múltiple de Tukey identificó los halos correspondientes a las cepas K47, K54 y M14 como los significativamente mayores a las demás cepas (ANEXO 1.2.2). Sin embargo, para el trabajo se seleccionó el sobrenadante de la cepa M 14, por presentar el halo de mayor nitidez y tamaño con un promedio de $22,46 \pm 0,49$ mm.

CUADRO 4. Pruebas de antagonismo en agar con ocho cepas de BAL frente a *L. monocytogenes* Lm 82

Cepas	Cepa productora Halos de inhibición (mm)	Sobrenadante Halos de inhibición (mm)
K 47	$22,10 \pm 0,08^{1)}$	$22,16 \pm 0,37$
K 54	$23,95 \pm 0,13$	$21,74 \pm 1,23$
K 86	$24,20 \pm 0,28$	$20,58 \pm 0,83$
K 138	$23,38 \pm 0,26$	$19,56 \pm 0,97$
K 140	$19,28 \pm 0,09$	$19,40 \pm 0,16$
M 3	----- ²⁾	NR
M 14	$20,62 \pm 0,53$	$22,46 \pm 0,49$
M 31	$23,32 \pm 0,17$	$17,80 \pm 0,62$

¹⁾ Valor promedio del triplicado de tres repeticiones

²⁾ Ausencia de halo de Inhibición

NR: no realizado

Para descartar otro tipo de inhibición, como la producción de peróxido de hidrógeno, el sobrenadante de la cepa M14 se trató con catalasa. Además para verificar la naturaleza proteica de la sustancia inhibidora, el sobrenadante se trató con una proteasa. La presencia de halos de inhibición en la prueba de la catalasa y la ausencia de halos de inhibición en la prueba de la proteasa, permitió identificar a la sustancia inhibidora presente en el sobrenadante de la cepa M14 como una STB. La STB de la cepa M14 se utilizó en las pruebas del estudio combinado, junto a la STB de cepa *C. piscicola* L103, frente a *L. monocytogenes* Lm82. Los resultados de las pruebas de dilución crítica para la determinación de la actividad, arrojaron como resultado para la STB de *C.*

piscicola L103 una actividad de 800 UA/mL y para la STB de la cepa M14 una actividad de 400 UA/mL.

4.2 Actividad antagonista de las STB expuestas a diferentes combinaciones de NaCl, CO₂ y temperatura

Las STB de *C. piscicola* L103 y de M14 fueron expuestas en forma separada a diferentes concentraciones de NaCl (0, 3, 6, 12%), incubadas en una atmósfera con 10% de CO₂ o bajo condiciones ambientales y a temperaturas de 4 y 25°C. Para determinar la combinación más efectiva de los factores para potenciar la acción inhibitoria de las STB frente a *L. monocytogenes*, se utilizó la técnica de “difusión en agar”, obteniéndose los resultados que se señalan a continuación.

4.2.1 STB de *C. piscicola* L103. Los halos de inhibición promedio obtenidos por las diferentes combinaciones de NaCl, CO₂ y temperatura con la STB de *C. piscicola* L103 se presentan en la FIGURA 6. Los valores son el promedio del duplicado de tres repeticiones. Los resultados de los distintos tratamientos se detallan en el ANEXO 2.1.

Se observa en la FIGURA 6 que el tratamiento más efectivo para inhibir a *L. monocytogenes* con la STB de *C. piscicola* fue a 4°C, en presencia de CO₂ y con un 12% de NaCl, alcanzando un halo de inhibición promedio de 47,02 ± 2,02 mm. El tratamiento menos eficaz, en cambio fue a 25°C, bajo condiciones ambientales y 0% de NaCl, con un halo de inhibición promedio de 12,67 ± 0,56 mm. El análisis estadístico arrojó como resultado, diferencias significativas entre las temperaturas ($p < 0,05$), entre los tratamientos con y sin CO₂ ($p < 0,05$) y entre los tratamientos con las diferentes concentraciones de NaCl ($p < 0,05$) (ANEXO 2.2.1).

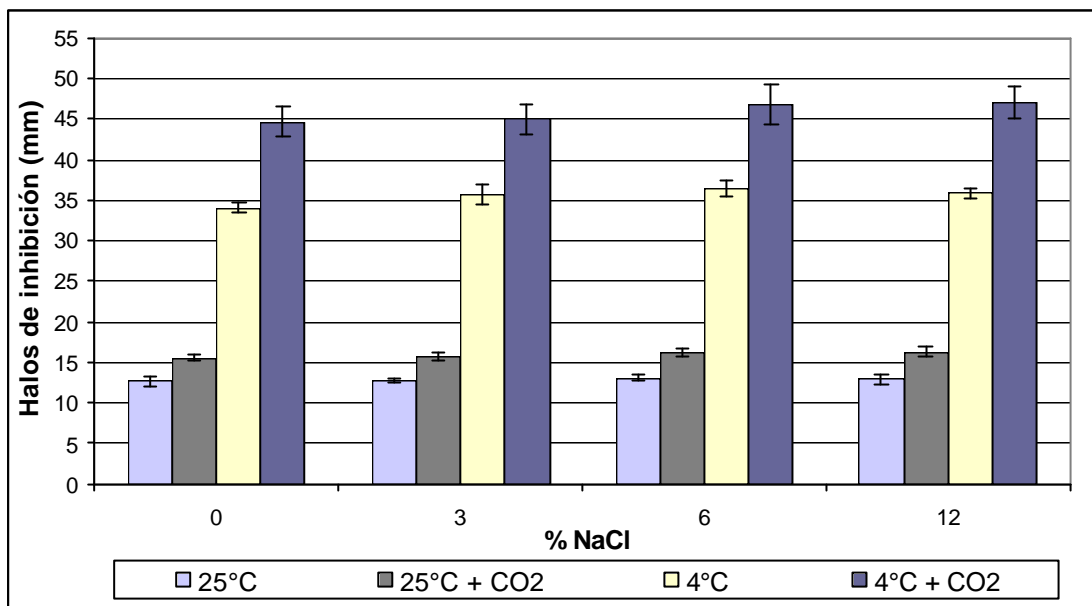


FIGURA 6. Inhibición de *L. monocytogenes* Lm 82 con la STB de *C. piscicola* L103 y diferentes condiciones de NaCl, CO₂ y temperatura

Para identificar el tratamiento más efectivo, se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey (ANEXO 2.2.1). El factor que mostró mayor efecto sobre la actividad de la STB fue la temperatura de refrigeración, siendo a 4°C el tamaño del halo de inhibición significativamente mayor que a 25°C. El CO₂ resultó ser el segundo factor más efectivo, obteniéndose en presencia de CO₂ un halo de inhibición significativamente mayor al tratamiento sin CO₂ y finalmente se observó que las concentraciones 6 y 12% de NaCl presentaron halos de inhibición significativamente mayores que con 0% de NaCl.

4.2.2 STB de cepa M14. Los halos de inhibición promedio dados por las diferentes combinaciones de NaCl, CO₂ y temperatura con la STB de cepa M14 se presentan en la FIGURA 7. Los resultados de los distintos tratamientos se detallan en el ANEXO 2.1.

Los resultados fueron similares a los obtenidos con la STB de *C. piscicola*, ya que se observó que el mayor efecto de inhibición alcanzado con la STB de cepa M14 fue también a 4°C, en presencia de CO₂ y con 12% de NaCl, obteniéndose un halo de inhibición promedio de 41,40 ± 0,46 mm. En cambio el tratamiento menos eficaz fue a 25°C con 0% de NaCl y en condiciones ambientales con un halo de inhibición promedio de 11,17 ± 0,53 mm. El análisis estadístico arrojó como resultado que existieron diferencias significativas entre ambas temperaturas ($p < 0,05$), entre los tratamientos con y sin CO₂ ($p < 0,05$) y entre las diferentes concentraciones de NaCl ($p < 0,05$) (ANEXO 2.2.2).

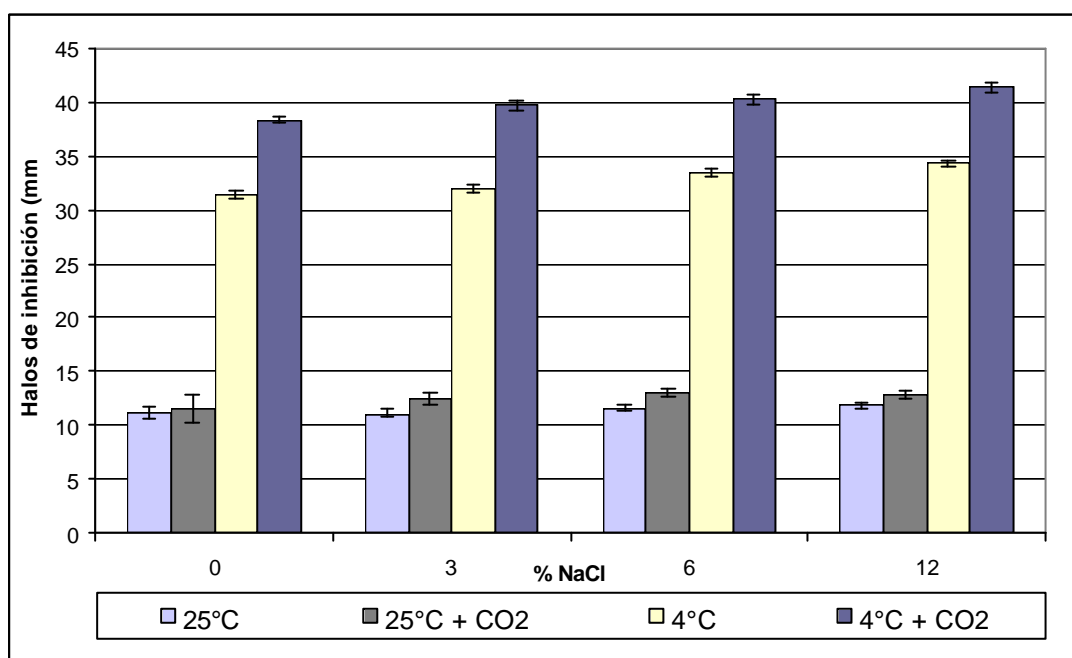
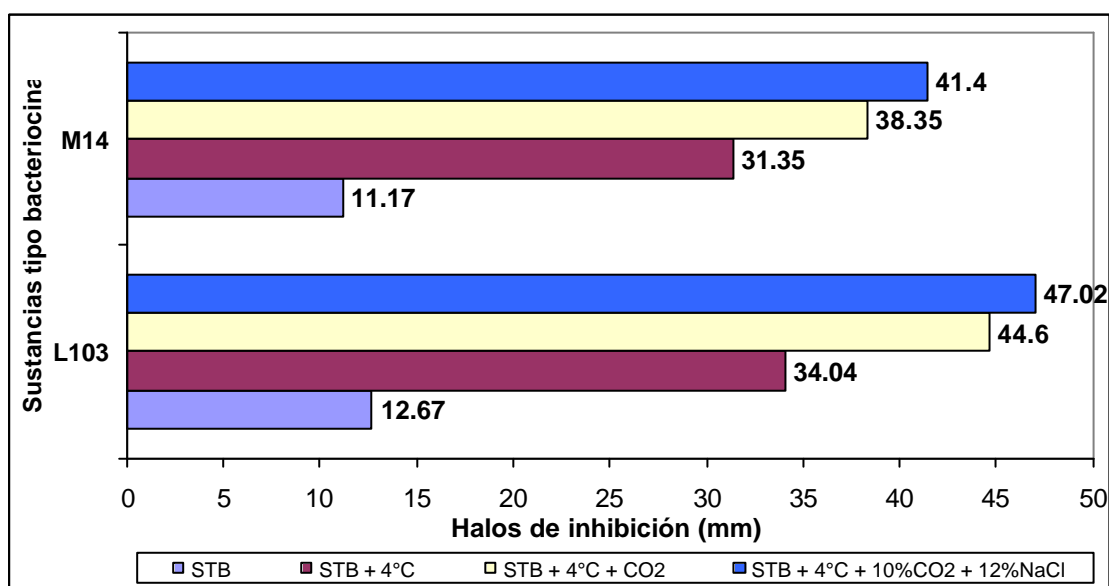


FIGURA 7. Inhibición de *L. monocytogenes* Lm 82 con la STB de cepa M14 y diferentes condiciones de NaCl, CO₂ y temperatura.

Para identificar la combinación más efectiva para inhibir *L. monocytogenes*, se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey (ANEXO 2.2.2), resultando ser la temperatura de refrigeración el factor más efectivo para la acción inhibidora de la STB de la cepa M14 sobre *L. monocytogenes* con un halo de

inhibición significativamente mayor al obtenido a 25°C. El CO₂ fue el segundo factor más efectivo según el tamaño del halo de inhibición, siendo éste en presencia de CO₂ significativamente mayor al del tratamiento sin CO₂. El NaCl también tuvo un efecto estadísticamente significativo, siendo la concentración de 12% de NaCl, significativamente más favorable a la acción de la STB de cepa M14 que las demás concentraciones de NaCl. Al analizar los resultados de la STB de *C. piscicola* L103 y la STB de cepa M14 frente a los tres factores estudiados, se observa que el efecto antagónico de ambas STB sobre *L. monocytogenes* fue reforzado por la temperatura de refrigeración, la presencia de CO₂ y el NaCl que en combinación presentaron una acción antimicrobiana sinérgica frente a la bacteria.

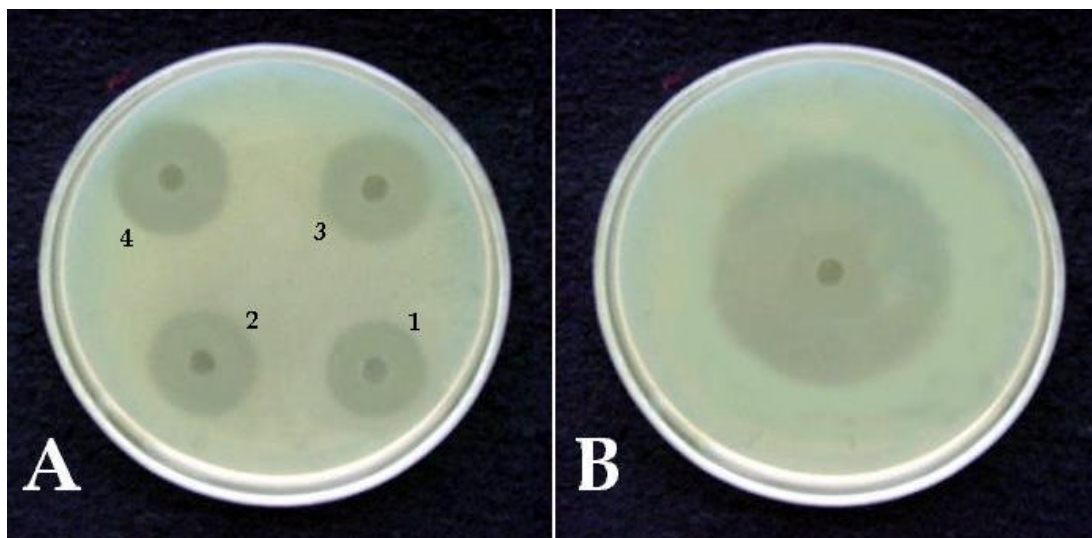


Los valores son el promedio del duplicado de tres repeticiones

FIGURA 8. Comparación de los halos de inhibición obtenidos al aplicar los distintos factores en combinación a las STB.

En la FIGURA 8 se observa el aumento del halo de inhibición a medida que se van aplicando la temperatura de refrigeración, el CO₂ y NaCl, factores que en conjunto van ejerciendo una actividad antimicrobiana más efectiva. Para la STB

de cepa M14 las combinaciones CO₂ - temperatura de refrigeración y NaCl - temperatura de refrigeración fueron significativas en su acción potenciadora a la actividad de la STB (ANEXO 2.2.2). En cambio sólo la combinación CO₂ - temperatura de refrigeración fue significativa a la acción de la STB de *C. piscicola* (ANEXO 2.2.1). Sin embargo, la temperatura de refrigeración fue la más favorable para ambas STB en comparación con los otros factores de inhibición estudiados. Esto concuerda con un trabajo de BUCHANAN *et al.* (1989), quienes evaluaron el efecto combinado de la temperatura, pH, atmósfera, NaCl, y nitrito de sodio sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*. Los resultados de estos autores demostraron claramente que aunque el microorganismo es psicotrófico, la refrigeración en combinación con otros factores fue el factor de mayor control sobre la tasa de crecimiento de la bacteria.



A: 25°C 1) 0% NaCl; 2) 3% NaCl; 3) 6% NaCl 4) 12% NaCl B: 4°C (12% NaCl)

FIGURA 9. Comparación halos de inhibición obtenidos a dos temperaturas

En la FIGURA 9 se pueden observar los halos de inhibición obtenidos a 25°C y 4°C. El efecto altamente potenciador de la temperatura de refrigeración sobre la acción antagonista de las STB se observó también en un trabajo realizado por

BUCHANAN y KLAWITTER (1992), quienes demostraron que las bajas temperaturas efectivamente refuerzan la acción antagonista de las bacteriocinas de *C. piscicola* frente a *L. monocytogenes*. También se ha observado que la nisina es mucho más efectiva a temperaturas de refrigeración que a temperatura ambiente frente a *Clostridium botulinum* y *Listeria* (ROGERS y MONTVILLE, 1994; CHUNG *et al.*,1989). DIMITRIJEVIC *et al.* (1999), demostraron que la inhibición en placa de *L. monocytogenes* por bacteriocinas de BAL es mayor a 4°C que a 37°C.

La efectividad de la temperatura de refrigeración en la acción antibacteriana de las STB, podría atribuirse a que facilita la pérdida de constituyentes esenciales de las células sensibles, ya que ABEE *et al.* (1994), demostraron que la acción de la nisina para inducir pérdida de K⁺ desde las células de *L. monocytogenes*, fue mayor en células cultivadas a 4°C que a 30°C, explicando, que el incremento en la proporción de cadenas de ácidos grasos insaturados en la membrana a 4°C, ayuda a mantener una óptima fluidez de la membrana.

El CO₂ fue el segundo factor más favorable a la acción de ambas STB, ya que el efecto inhibitor sobre *L. monocytogenes* fue significativamente mayor (p<0,05) en presencia de este gas. La acción favorable del CO₂ sobre las bacteriocinas, ha sido observada previamente. TAYLOR *et al.* (1990), encontraron que, un tratamiento de nisina en presencia de una atmósfera con 100% de CO₂ retrasaba significativamente la producción de toxina por *C. botulinum*. NILSSON *et al.* (2000), observaron una acción sinérgica del CO₂ y la nisina frente a *L. monocytogenes* Scott A, donde la acción antimicrobiana de la nisina fue duplicada en presencia de CO₂.

El efecto sinérgico de la bacteriocina y el CO₂ se produce a nivel de la membrana citoplasmática de la célula sensible, donde el CO₂ expande las regiones hidrofóbicas de los lípidos de la membrana, incrementando su

permeabilidad. En adición, el CO₂ también causa que las células modifiquen su composición fosfolipídica, lo que incrementa la fluidez de membrana y refuerza la formación de poros por parte de la bacteriocina (NILSSON *et al.*, 2000) La resistencia de la nisina a *L. monocytogenes* es acompañada por cambios en la composición lipídica lo que causa una membrana más rígida (MING Y DAESCHEL, 1995). De esta manera, el CO₂ cumple un papel importante desestabilizando la membrana y favoreciendo la acción de la bacteriocina.

Otro aspecto importante de destacar es que la inhibición de *L. monocytogenes* por ambas STB, en presencia de CO₂ fue significativamente ($p < 0,05$) más pronunciada a 4°C que a 25°C (ANEXO 2.2.1; ANEXO 2.2.2). La temperatura de refrigeración es un factor de importancia en la efectividad del CO₂, ya que refuerza su acción antimicrobiana. A bajas temperaturas el CO₂ incrementa su solubilidad en la fase acuosa y ello le permite difundir con mayor facilidad en el medio en que está inmerso, penetrando con mayor rapidez la célula bacteriana y causando una rápida caída del pH. Esta acidificación, produce una inhibición del crecimiento microbiano ya que afecta las actividades metabólicas de la célula (DANIELS *et al.*, 1985; NINGJUN CAO Y CHEN, 1994). FANG Y LIN, (1994), también observaron que el efecto antimicrobiano sobre *L. monocytogenes*, de la nisina combinada con CO₂ fue más pronunciado a 4°C.

El NaCl tuvo un efecto favorable a la acción antimicrobiana de las STB, ya que en la medida que aumentaba la concentración de NaCl en combinación con las STB, la inhibición de *L. monocytogenes* fue significativamente mayor ($p < 0,05$). GÓMEZ (2002), también observó un efecto significativamente favorable del NaCl sobre la STB de *C. piscicola* L103. Similar situación se dió en un trabajo de GÄNZLE *et al.* (1999), donde el NaCl tuvo un efecto sinérgico con la actividad de la curvacina A y sakacina P, frente a *L. monocytogenes*. HARRIS *et al.* (1991), observaron que en un medio adicionado con NaCl, refuerza el efecto bactericida de la nisina en contra de *L. monocytogenes*. El efecto

favorable del NaCl sobre la acción antagonista de la STB de cepa M14, se vió reforzado por la temperatura de refrigeración, ya que el efecto inhibitor de la combinación de NaCl y STB de cepa M14 sobre *L. monocytogenes* fue significativamente mayor ($p < 0,05$) a 4°C con respecto al obtenido a 25°C (ANEXO 2.2.2). En cambio, no se observó esta situación para la STB de *C. piscicola* L103 (ANEXO 2.2.1). Por su parte, BUCHANAN y BAGY (1997), demostraron que a 4°C, una concentración de 2,5% de NaCl refuerza la acción inhibitor de la bacteriocina de *C. piscicola* LK5 frente a *L. monocytogenes*.

La concentración de un 12% de NaCl, usada como control, no afectó el crecimiento de *L. monocytogenes*, ya que no presentó halo de inhibición. Respecto a esta elevada tolerancia de *L. monocytogenes* a diferentes concentraciones de NaCl, se ha observado que sobrevive por 100 días en una concentración de sal mayor a 30,5% a 4°C (LOVETT y TWEDT, 1988), es capaz de sobrevivir 132 días en presencia de 22,5% NaCl a 4°C y puede crecer dentro de 72 h en la presencia de 10% NaCl a 25°C (McClure *et al.*, citados por PETERSON *et al.*, 1993). Esta característica de *L. monocytogenes* de crecer en un amplio rango de concentraciones de sal y su adaptabilidad a este ambiente salino es debida a su habilidad de acumular solutos intracelulares como K⁺, betaina, y glutamato los que actúan como “osmoprotectores” en respuesta al stress osmótico (PATCHETT *et al.*, 1992). Sin embargo se ha descubierto recientemente, que la prolina y otros osmoprotectores ayudan también al patógeno a crecer mejor a bajas temperaturas, aún sin stress osmótico. De esta manera al exponer al patógeno a temperaturas de refrigeración y NaCl, ambas condiciones de stress dividen el mecanismo protector, lo que neutraliza la condición desfavorable (GORRIS, 1999).

4.3 Acción inhibitor de ambas STB en forma combinada

En la FIGURA 10 se muestran los halos de inhibición promedio de *L. monocytogenes* obtenidos a las temperaturas de 4°C y 25°C, utilizando la STB

de *C. piscicola* L103 y la STB de cepa M14 en forma separada y en combinación. Se observó que a 4°C se obtuvieron los halos de inhibición de mayor tamaño, con un promedio de $58,15 \pm 1,29$ mm para STB de *C. piscicola* L103, de $50,75 \pm 0,74$ mm para la STB de cepa M14 y de $56,30 \pm 2,50$ mm para la combinación de las STB. En cambio a 25°C fueron de $24,61 \pm 2,45$ mm; $21,26 \pm 1,50$ mm y $23,69 \pm 2,43$ mm, respectivamente. La diferencia entre las temperaturas de incubación fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (ANEXO 3.2.1) y la prueba de comparación múltiple de Tukey identificó a la temperatura de 4°C como la más efectiva para la acción inhibitoria de las STB, por separado y en combinación (ANEXO 3.2.2). Ello corrobora el efecto favorable de la temperatura de refrigeración sobre la acción inhibitoria de las STB separadas y combinadas, frente a *L. monocytogenes*.

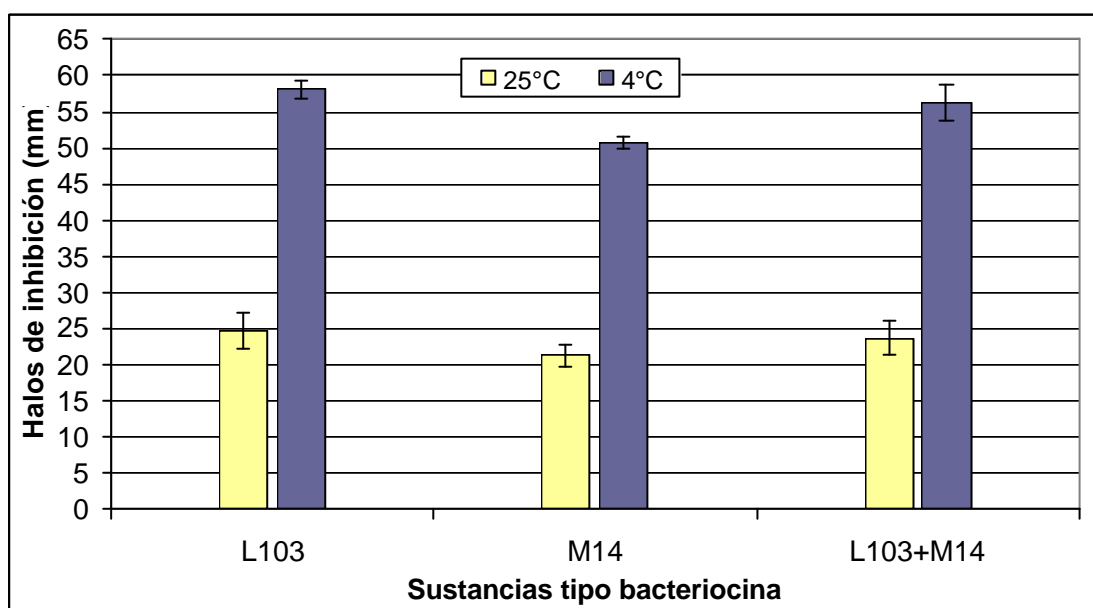


FIGURA 10 Inhibición de *L. monocytogenes* Lm82 con ambas STB por separado y en combinación, a dos temperaturas.

Se observa que la sensibilidad de *L. monocytogenes* varió frente a las dos STB, siendo mayor con la STB de *C. piscicola*. El análisis estadístico arrojó como resultado que entre las STB combinadas y la STB de cepa M14 existe diferencia significativa ($p < 0,05$) (ANEXO 3.2.3) y la prueba de comparación múltiple de Tukey indicó que la inhibición dada por la STB de cepa M14 fue significativamente menor a la acción inhibitoria de la combinación de ambas STB, sin embargo no existió diferencia significativa entre la inhibición dada por las STB combinadas y la STB de cepa *C. piscicola* L103 (ANEXO 3.2.3). Los resultados indican que no hubo sinergismo en la acción combinada de las STB, ya que el halo de inhibición dado por la combinación de las STB fue de tamaño intermedio entre los halos de inhibición obtenidos por cada una de las STB por separado.

Una posible causa para la baja efectividad de la combinación de las STB estudiadas podría ser que éstas no difieran en su mecanismo de acción. Para evitar la baja efectividad de bacteriocinas usadas en combinación, VIGNOLO *et al.* (2000), sugieren que una mezcla de bacteriocinas deben tener diferentes modos de acción, para lograr una inhibición más eficaz asegurando prevenir el crecimiento de *Listeria*. De esta manera, la eficaz acción de una combinación de bacteriocinas depende de las bacterias productoras, ya que si provienen de una misma especie, es probable que sus bacteriocinas sean del mismo tipo y si la bacteria es resistente a una de ellas lo será también a la otra. La perspectiva es entonces, buscar bacteriocinas de distintas especies bacterianas con diferentes modos de acción frente a microorganismos susceptibles, esto permitiría reducir la frecuencia de mutantes resistentes (REKHIF *et al.*, 1994). HANLIN *et al.* (1993), demostraron que las combinaciones de bacteriocinas, especialmente aquellas con diferentes modos de acción producían un mayor efecto de inhibición sobre las bacterias sensibles.

Otro aspecto fundamental de considerar para el estudio del efecto sinérgico al combinar bacteriocinas, es trabajar con el mismo nivel de actividad final de las STB en UA/mL, así como trabajar con la actividad que produce el máximo efecto de inhibición en la población susceptible (KALCHAYANAND *et al.*, 1994). En el presente estudio, la actividad de la STB de *C. piscicola* fue de 800 UA/mL y la actividad de la STB de cepa M14 fue de 400 UA/mL, esto explicaría la diferencia en la sensibilidad de *Listeria* frente a ambas STB. Para lograr obtener la misma actividad de ambas STB, se debe reducir la actividad de la STB de *C. piscicola* a la mitad. Esto significaba diluir la STB, lo cual implicaba pérdida de efectividad antimicrobiana. Además los resultados de ZUÑIGA (2002), arrojaron que no existía diferencia significativa en la acción antagonista de la STB de *C. piscicola* L103 con actividades de 800 y 1600 UA/mL respectivamente.

Una mezcla de bacteriocinas podría tener una interacción sinérgica, antagónica o simplemente no interactuar en su inhibición frente a una determinada bacteria, por lo que se sugiere al usar combinaciones de bacteriocinas, aplicar en forma adicional factores de inhibición que puedan sensibilizar a la bacteria o simplemente potenciar la acción antagonista de las bacteriocinas frente a ésta.

4.4 Factores favorables a la actividad de las STB de ambas cepas lácticas

Una vez estudiados los factores que favorecieron la acción inhibidora de ambas STB en forma separada contra *L. monocytogenes*, éstos se utilizaron en combinación con ambas STB. Los resultados se presentan en la FIGURA 11. Los halos de inhibición promedio de ambas STB combinadas y en forma separada, expuestas a temperatura de refrigeración de $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 10% de CO_2 y 12% de NaCl se presentan en el ANEXO 4.1. Los halos de inhibición promedio fueron de $59,73 \pm 4,81$ mm para la STB de *C. piscicola* L103, de $49,18 \pm 2,66$ mm para la STB de cepa M14 y de $55,01 \pm 3,17$ mm para las STB combinadas.

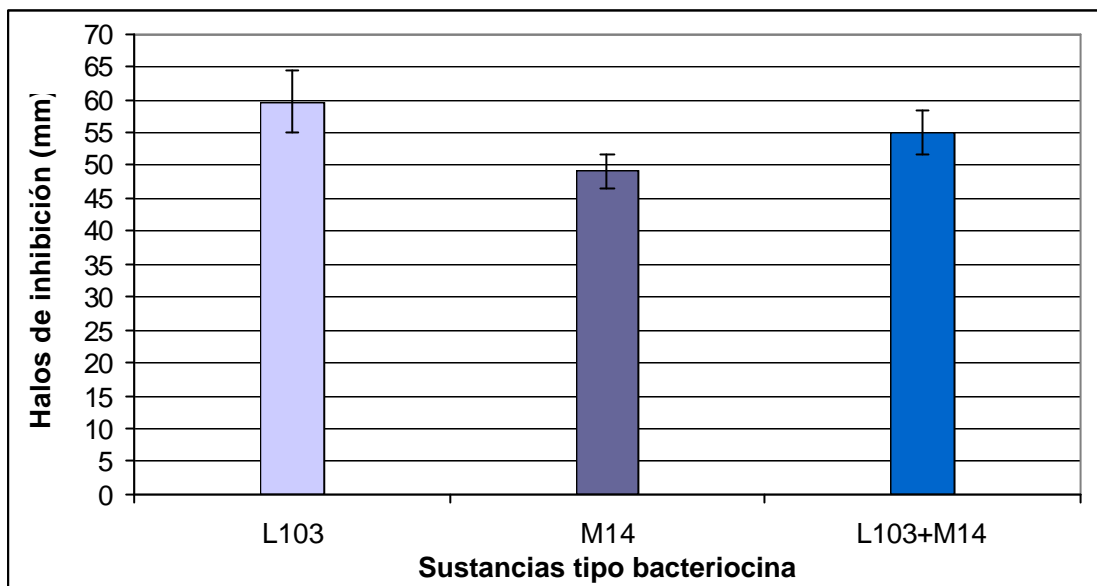


FIGURA 11 Combinación de STB más 12% NaCl incubadas en una atmósfera con 10% CO₂ y 4°C de temperatura.

Como se observa en la FIGURA 10, las STB combinadas y expuestas a 12% de NaCl, 10% de CO₂ y 4°C, no presentaron una acción antimicrobiana sinérgica frente a *L. monocytogenes*. El análisis estadístico arrojó como resultado diferencia significativa entre la actividad de la STB de *C. piscicola* L103 y la actividad de la STB de cepa M14 ($p < 0,05$) (ANEXO 4.2.1). La prueba de comparaciones múltiples de Tukey, indicó que la STB de cepa *C. piscicola* L103 tuvo una actividad significativamente mayor a la STB de cepa M14. Sin embargo, no se observó diferencia significativa entre la acción inhibidora de ambas STB con respecto a la acción inhibidora de las STB combinadas (ANEXO 4.2.2).

Según MULET-POWELL *et al.* (1998), la efectividad de una combinación de bacteriocinas depende de las condiciones del medio en que es evaluada. Estos autores observaron que la combinación de pediocina AcH más lacticina 481 y la combinación de pediocina AcH más lacticina F no aumentaba su antagonismo

frente a *L. monocytogenes* en un medio sólido, sin embargo mostraron una acción sinérgica en un medio líquido. A continuación se presentan los resultados de la combinación de ambas STB con los factores favorables frente a *L. monocytogenes* en un medio de cultivo líquido.

4.5 Inhibición de *L. monocytogenes* Lm 82 en caldo de cultivo con factores potenciadores del antagonismo de las STB

En la FIGURA 12 se presentan los recuentos de *L. monocytogenes* en caldo ST en presencia de ambas STB más NaCl y CO₂ incubados a 4°C. En el caldo control sin las STB, sólo estaban presentes los factores favorables a la actividad. Los resultados corresponden al promedio del duplicado de tres repeticiones, de los recuentos de *L. monocytogenes* en el cultivo con las STB y en el control a los 0, 3, 7 y 14 días de incubación (ANEXO 5.1).

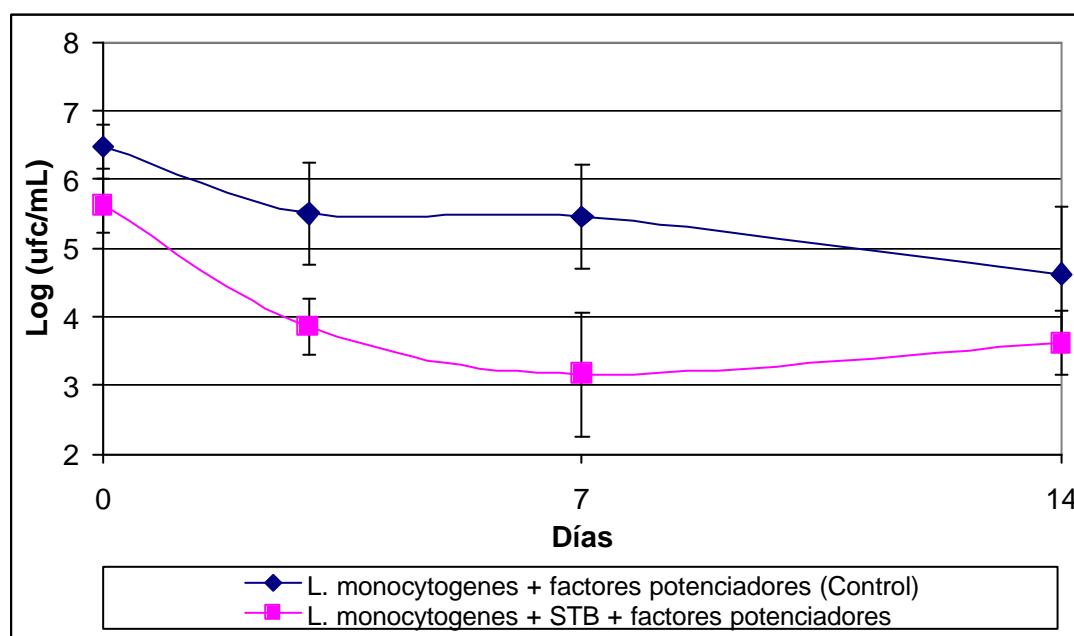


FIGURA 12. Inhibición de *L. monocytogenes* Lm82 en caldo ST con las STB de *C. piscicola* L103 y cepa M14 potenciadas por NaCl, CO₂ y 4°C.

En la FIGURA 12, se observa que en el día cero la población de *L. monocytogenes* al ser expuesta a la mezcla de las STB sufrió una reducción inmediata de aproximadamente 1 ciclo Log (ufc/mL). Esta reducción fue significativa con respecto al control ($p < 0,05$) (ANEXOS 5.2.5; 5.2.6), y es una demostración de la rápida efectividad de las STB sobre la bacteria patógena. La acción bactericida inmediata de una bacteriocina frente a *L. monocytogenes*, también se observó en un estudio de BUCHANAN y KLAWITTER (1992), donde al agregar la bacteriocina de *C. piscicola* LK5 a un cultivo de 24 h de *L. monocytogenes* Scott A, la actividad bactericida fue evidente dentro de los primeros cinco minutos.

En el presente estudio se observó además que el cultivo de *L. monocytogenes* con la combinación de STB disminuyó 2 ciclos logarítmicos desde una población inicial de 5,61 Log (ufc/mL) a una población final de 3,61 Log (ufc/mL) en el día 14. El análisis estadístico demostró que la disminución de la población de *L. monocytogenes* en el caldo con las STB del día 0 al día 14 fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (ANEXOS 5.2.1; 5.2.2) lo que indica que la combinación de las STB, con NaCl, CO₂ y la temperatura de refrigeración fue efectiva para inhibir significativamente a *L. monocytogenes*.

Se puede observar en la FIGURA 12, que en el control hubo una reducción en la población bacteriana desde un recuento inicial de 6,48 Log (ufc/mL) a un recuento en el día 14, de 4,61 Log (ufc/mL), lo cual significa una reducción de 1,87 ciclos logarítmicos. Esto demuestra que el crecimiento de *L. monocytogenes* en el control también fue afectado por la combinación de NaCl, CO₂ y temperatura de refrigeración, condición que también se encontraba en el caldo con las STB. SUAZO (2001), demostró que *L. monocytogenes* Lm 82 es capaz de crecer en caldo ST incubado a 6°C, desde una población inicial de 10⁵ ufc/mL en el día 0 a niveles de 10⁹ ufc/mL en el día 14. Ello demuestra que la temperatura de refrigeración no es una barrera para el crecimiento de este

microorganismo. Sin embargo, la temperatura de refrigeración en combinación con otros factores de inhibición como el CO₂ y NaCl, ejercen en conjunto una acción antimicrobiana efectiva frente a *L. monocytogenes*, inhibiendo su crecimiento. El análisis estadístico demostró que la disminución de la población de *L. monocytogenes* del día 0 al día 14 en el control fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (ANEXOS 5.2.3; 5.2.4). Ello indica que los factores antimicrobianos en ausencia de las STB también ejercieron un efecto antimicrobiano significativo sobre el crecimiento de la bacteria. Sin embargo, este efecto inhibitorio fue significativamente mayor en presencia de las STB ya que se observó una diferencia de entre 1 a 2 ciclos logarítmicos entre el control y el tratamiento con las STB en los diferentes días de incubación. Esto fue corroborado por el análisis estadístico, que demostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el control y el cultivo con las STB en los días 0, 3 y 7 de incubación (ANEXOS 5.2.5 a 5.2.10).

La combinación de los factores con las STB inhibieron significativamente a *L. monocytogenes*, sin embargo sólo se logró un efecto “parcialmente bactericida” sobre el crecimiento de la bacteria, ya que se observó un aumento en la última semana de incubación. Este efecto inhibitorio transitorio de las bacteriocinas de la clase II ha sido reportado previamente por MATHIEU *et al.* (1994); REKHIFF *et al.* (1994) y BOUTTEFROY y MILLIERE (2000), quienes también observaron un aumento significativo de la población de *Listeria* luego de una fase inicial de inhibición por las respectivas bacteriocinas aplicadas. El efecto “parcialmente bactericida” ha sido observado también en otros estudios, en los cuales si bien la presencia de otros factores favoreció la efectividad de las bacteriocinas frente a *Listeria*, sólo se logró detener el crecimiento pero no destruir completamente la población bacteriana. En la investigación THOMAS y WIMPENNY (1996), evaluaron el efecto combinado de la temperatura de refrigeración y la concentración de NaCl, sobre la acción inhibitoria de la nisina frente a *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Si bien confirmaron que el descenso de la

temperatura incrementa la acción inhibitoria de la nisina frente a ambas bacterias, la baja temperatura y las altas concentraciones de NaCl sólo incrementaron un efecto “bacteriostático” de la nisina frente a *L. monocytogenes*.

La baja efectividad observada a través del tiempo, podría deberse a una insuficiente cantidad de STB utilizada para inhibir o interactuar con las células y/o la presentación de células bacterianas resistentes a las STB. Sin embargo, no es debida a una disminución de la actividad de las STB, ya que en el caldo control la actividad se mantuvo en 400 UA/mL.

Se observa en la FIGURA 12, que a partir del séptimo día de incubación en el tratamiento con las STB, *L. monocytogenes* comenzó a crecer. En el control en cambio hubo una reducción de la población a partir de la última semana de incubación. BOUTTEFROY Y MILLIERE (2000), señalan que el NaCl podría ser un factor negativo en la acción de las bacteriocinas frente a *L. monocytogenes*, debido a que interfiere la absorción de éstas a la célula bacteriana. DE MARTINIS *et al.* (1997), postulan que el posible efecto protector del NaCl puede deberse a que los cationes monovalentes son capaces de unirse a los fosfolípidos de la membrana y prevenir de esta manera la absorción de la bacteriocina a la célula.

Otro factor de importancia en la efectividad de las STB y los factores antimicrobianos utilizados, es la población inicial bacteriana a la cual son aplicados. En el estudio se trabajó con un inóculo inicial elevado de 10^6 ufc/mL, y esto puede haber afectado la eficacia del tratamiento, ya que en un estudio de PETERSON *et al.* (1993), se observó que la inhibición de *L. monocytogenes* por NaCl estuvo directamente relacionada con el nivel del inóculo inicial de la bacteria siendo mayor la inhibición, cuando una cantidad menor del inóculo inicial fue usada. GUYER y JEMMI (1991), también demostraron que el

crecimiento de *L. monocytogenes* con 6% de NaCl, almacenado a 4 o 10°C estaba fuertemente relacionado con el nivel de inóculo inicial de la bacteria. En las muestras inoculadas con 10^2 y 10^5 ufc/g de *L. monocytogenes*, se observó un crecimiento significativo de la bacteria, en cambio con un inóculo inicial de 10 ufc/g no hubo incremento de la población bacteriana. Además estos autores señalan que “el uso de un inóculo inicial menor de bacterias, es una aproximación más realista a los niveles normalmente encontrados en productos contaminados con *L. monocytogenes*”.

El nivel de CO₂ usado, podría no ser suficiente para producir una óptima inhibición del crecimiento de *Listeria*. DANIELS *et al.* (1985), señalan que concentraciones sobre un 5% de CO₂ son particularmente efectivas contra microorganismos psicrótrófos que causan el deterioro de alimentos refrigerados pero no sobre microorganismos patógenos como *L. monocytogenes*, por lo que deben aplicarse concentraciones más elevadas. En un estudio con atmósfera modificada se mostró que se necesita un 100% de CO₂ para inhibir significativamente el crecimiento de *L. monocytogenes* ya que un 70% de CO₂ fue insuficiente para inhibir completamente a *L. monocytogenes* (NILSSON *et al.*, 2000). Además, se ha observado que *L. monocytogenes* es incapaz de multiplicarse en atmósfera con 100% de CO₂ a temperaturas de 5°C y que no sobrevive en condiciones anaeróbicas con altas concentraciones de CO₂ (75% - 80% CO₂) (FARBER, 1991; HENDRICKS y HOTCHKISS, 1997).

Es importante aclarar que para la cepa láctica utilizada, designada como M14, el primer objetivo fue evaluar la capacidad antagonista de su STB en forma separada y en combinación con la STB de *C. piscicola* frente a *L. monocytogenes* y debido a que no presentó una acción antimicrobiana efectiva, y no tuvo un efecto sinérgico al combinarla con la STB de *C. piscicola*, no se realizó su identificación.

5. CONCLUSIONES

- La temperatura de refrigeración, un 10% de CO₂ y 12% de NaCl favorecieron significativamente ($p < 0,05$) la acción antagonista de las sustancias tipo bacteriocina (STB) de *C. piscicola* L103 y cepa M14 frente a *L. monocytogenes* Lm 82, en las pruebas de antagonismo en placa.
- Las STB de *C. piscicola* L103 y de la cepa láctica M14 no presentaron una acción sinérgica frente a *L. monocytogenes* Lm 82, al ser usadas en combinación en las pruebas de antagonismo en placa.
- La combinación de las STB de *C. piscicola* L103 y M14 en caldo, con 12% de NaCl, en presencia de un 10% de CO₂, y a 4°C, inhibieron significativamente ($p < 0,05$) a *L. monocytogenes* Lm 82, ejerciendo un efecto “parcialmente bactericida” sobre la bacteria patógena.

6. RESUMEN

La sustancia inhibidora tipo bacteriocina (STB) de *Carnobacterium piscicola* L103 ha exhibido un modo de acción bacteriostático o parcialmente bactericida frente a la cepa de *Listeria monocytogenes* Lm82. El objetivo de este trabajo fue, aumentar la actividad inhibitoria de la STB de *C. piscicola* L103 frente a *L. monocytogenes*, combinándola con otra STB y factores favorables para su actividad. Para la selección de la cepa láctica se utilizaron pruebas de antagonismo en placa. La STB seleccionada fue designada como M14 la cual fue estudiada en combinación con la STB de *C. piscicola* L103. Ambas STB fueron expuestas en forma separada a cuatro concentraciones de NaCl, dos niveles de CO₂ y dos temperaturas para evaluar la acción favorable de estos factores y determinar el tratamiento más efectivo frente a *L. monocytogenes*. Los resultados indicaron que no hubo una acción sinérgica entre ambas STB frente a *L. monocytogenes*. Sin embargo, se demostró que el uso combinado de 12% de NaCl, 10% de CO₂ y la temperatura de refrigeración favorecieron significativamente la acción antagonista de ambas STB frente al patógeno. Para el estudio del antagonismo en caldo, se inoculó caldo soya tripticasa (ST) con *L. monocytogenes* en presencia de ambas STB y 12% de NaCl. La incubación se realizó a 4°C bajo una atmósfera con 10% de CO₂ por 14 días. Los resultados determinaron una acción inhibidora significativa sobre la bacteria patógena, en relación al control sin las STB. En el control con 12% de NaCl, incubado a 4°C con un 10% de CO₂ también se observó una disminución significativa de *L. monocytogenes*. Se concluye que las STB combinadas con los factores potenciadores ejercieron una acción antimicrobiana “parcialmente bactericida” sobre *L. monocytogenes*, la cual resultó significativamente mayor al control sin las STB.

SUMMARY

The bacteriocin like inhibitory substance (BLIS) of *Carnobacterium piscicola* L103 has exhibited a bacteriostatic or partially bactericidal mode of action against *Listeria monocytogenes* Lm82. The objective of this work was, to increase the activity of the BLIS of *C. piscicola* L103 against *L. monocytogenes*, combining it with another BLIS and factors that enhance its activity. For the selection of the lactic acid bacteria, test of antagonism in plates and well diffusion method were used. The selected STB was designated as M14 and used in combination with the BLIS of *C. piscicola* L103, to study its possible synergistic action against the pathogen. Both BLIS were also exposed separately to four concentrations of NaCl, two levels of CO₂ and two temperatures, to evaluate the action of these factors to enhance the BLIS activity and to determine the most effective treatment against *L. monocytogenes*. The results indicated that there was not a synergistic action of the combined BLIS against the bacterium. However it was demonstrated that the additional factors significantly increased the antagonistic action of both BLIS against *L. monocytogenes*. The most effective treatment was given by the combination of refrigeration temperature, with 10% CO₂ and 12% NaCl. Trypticase soy broth (STB) containing 12% NaCl was also inoculated with *L. monocytogenes* and both BLIS, incubated at 4°C for 14 days in an atmosphere with 10% of CO₂. Results indicated that the population of *L. monocytogenes* decreased, significantly in the presence of the both BLIS in combination with the inhibitory factors. In the control with 12% of NaCl, incubated at 4°C with 10% of CO₂ the *L. monocytogenes* population also decreased but to a lesser extend. In conclusion, the BLIS combined with the other inhibitory factors had a “partial bactericidal” action against *L. monocytogenes* in culture broth, which was significantly higher than the control without the BLIS.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ABEE, T., ROMBOUTS, F. M., HUGENHOLTZ, J., GUIHARD, G., and LETELLIER, L. 1994. Mode of Action of Nisin Z against *Listeria monocytogenes* scott A Grown at High and Low Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*. 60 (6): 1962-1968.
- ABEE, T., KROCKEL, L., y HILL, C. 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*. 28: 169-185.
- ADAMS, M. R., y MOSS, M. O. 2000. *Food Microbiology*. Royal Society of Chemistry. Guildford, UK. 479 p.
- AHN, C., y STILES, M.E., 1990. Plasmid-Associated Bacteriocin Production by a Strain of *Carnobacterium piscicola* from Meat. *Applied and Environmental Microbiology*. 56 (8): 2503-2510.
- (APHA) American Public Health Association. 1992. MARSHALL, R.T. PhD, Editor. *Microbiological count Methods. Standard Methods for the examination of dairy products*. Washington, DC. 546 p.
- AYMERICH, M. T., HUGAS, M., y MONFORT, J. M. 1998. Review: Bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. *Food Science and Technology International*. 4 (3): 141-158.
- BARBOSA-CÁNOVAS, G.V., POTHAKAMURY, U. R., PALOU, E., y SWANSON, B. G. 1997. *Nonthermal Preservation of Foods*. Marcel Dekker. New York. 276 p.

- BAREFOOT, S.F., y KLAENHAMMER, T.R., 1983. Detection and Activity of Lactacin B, a bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology. 45 (6): 1808-1815.
- BRUNO, M. E. C., y T. J. MONTVILLE. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 58: 2255-2259.
- BOUTTEFROY, A. y MILLIERE, J. B. 2000. Nisin-Curvaticin 13 Combinations for Avoiding the Regrowth of Bacteriocin Resistant Cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. International Journal of Food Microbiology. 62: 65-75.
- BUCHANAN, R.L., STAHL, H.G., y WHITING, R.C. 1989. Effects and Interactions of Temperature, pH, Atmosphere, Sodium Chloride, and Sodium Nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection. 52 (12): 844-851.
- BUCHANAN, R. L. y KLAWITTER, L. A. 1992. Characterization of Lactic Acid Bacterium, *Carnobacterium piscicola* LK5, with Activity Against *Listeria monocytogenes* at Refrigeration Temperatures. Journal of Food Safety. 12: 199-217.
- BUCHANAN, R.L., y BAGI, L. K. 1997. Microbial competition: Effect of Culture Conditions on the Suppression of *Listeria monocytogenes* Scott A by *Carnobacterium piscicola*. Journal of Food Protection. 62 (3): 254-261.
- BOURGEOIS, C. M., y LARPENT, J. P. 1994. Microbiología Alimentaria. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 366 p.

- CASP, A., y ABRIL, J. 1999. Procesos de conservación de Alimentos. Editorial Mundiprensa. Madrid, España. 494 p.
- CHUNG, K. T., DICKSON, J. S., CROUSE, J. D. 1989. Effects of Nisin Growth of Bacteria Attached to Meat. *Applied and Environmental Microbiology*. 55 (6): 1329-1333.
- CINTAS, L. M., CASAUS, M. P., HERRANZ, C., NES, I. F., y HERNÁNDEZ, P. E. 2001. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*. 7 (4): 281-305.
- DANIELS, J. A., KRISHNAMURTHI, R., y RIZVI, S. S. H. 1985. A Review of Effects of Carbon Dioxide on Microbial Growth and Food Quality. *Journal of Food Protection*. 48 (6): 532-537.
- DELGADO, R. 2001. Efecto de una Bacteriocina de *Carnobacterium piscicola* parcialmente purificada sobre Salmón Fresco Refrigerado. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 106 p.
- DE MARTINIS, E. C. P., CRANDALL, A. D., MAZZOTTA, A. S., y MONTVILLE, T. J. 1997. Influence of pH, Salt, and Temperature on nisin Resistance in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 60 (4):420-423.
- DIMITRIJEVIC, J., TEODOROVIC, V., BALTIC, M. Y MIRLOVIC, M. 1999. Variations in the sensitivity of *Listeria monocytogenes* types to lactic acid bacteria bacteriocins. *Acta Veterinaria (Beograd)*. 49: 49-56.
- FANG, T. J., y LIN L. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fragi* on Cooked Pork in a Modified Atmosphere

- Packaging/Nisin Combination System. *Journal of Food Protection*. 57 (6): 479-485.
- FARBER, J. M. 1991. Microbiological Aspects of Modified Atmosphere Packaging Technology- A Review. *Journal of Food Protection*. 54 (1): 58-70.
- FARBER, J. M. 1993. Current Research on *Listeria monocytogenes* in Foods: An Overview. *Journal of Food Protection*. 56 (7): 640-643.
- FRANK, J. F., y KOFFY, R. A. 1990. Surface-Adherent Growth of *Listeria monocytogenes* is Associated with Increased Resistance to Surfactant Sanitizers and Heat. *Journal of Food Protection*. 53: 550-554.
- FUNDACIÓN CHILE. 2000. Manual Técnico. *Listeria monocytogenes* en el procesamiento fresco congelado de salmonídeos: Identificación de vías de contaminación. 25 p
- GÄNZLE, M. G., WEBER, S., y HAMMES, W. P. 1999. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of Bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*. 46: 207-217.
- GÓMEZ, Y. 2002. Efecto del NaCl, Aceite de salmón y Temperatura, sobre la Difusión y Capacidad Antagonista de la Bacteriocina de *Carnobacterium piscicola* L103. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 105 p
- GORRIS, G. M. 1999. Hurdle Technology. En: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Editorial Academic Press. Londres, Gran Bretaña. p 1071-1076.

- GUYER, S., y JEMMI, T. 1991. Behavior of *Listeria monocytogenes* during Fabrication and Storage of Experimentally Contaminated Smoked Salmón. *Applied and Environmental Microbiology*. 57:1523-1526
- HARRIS, L. J., DAESCHEL, M. A., STILES, M. E., y KLAENHAMMER, T. R. 1989. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 52 (6): 384-387.
- HARRIS, L. J., FLEMING, H. P., and KLAENHAMMER, T. R. 1991. Sensitivity and Resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A, and UAL500 to Nisin. *Journal of Food Protection*. 54 (11): 836-840.
- HANLIN, M. B., KALCHAYANAND, N., RAY, P., y RAY, B. 1993. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria in Combination Have Greater Antibacterial Activity. *Journal of Food Protection*. 56 (3): 252-255.
- HENDRICKS, M. T., y HOTCHKISS, J. H. 1997. Effect of Carbon Dioxide on the growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria monocytogenes* in Aerobic Atmospheres. *Journal of Food Protection*. 60 (12): 1548-1552.
- JOHNSON, J. L., DOYLE, M. P., y CASSENS, R. G. 1990. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. In *Meat and Meat Products*. *Journal of Food Protection*. 53: 81-91.
- JAY, J. 1992. *Microbiología moderna de los Alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 804 p.
- JUNEJA, V. K., y DAVIDSON, P. M. 1993. Influence of Altered Fatty Acid Composition on Resistance of *Listeria monocytogenes* to Antimicrobials. *Journal of Food Protection*. 56 (4): 302- 305.

- KALCHAYANAND, N., SIKES, T., DUNNE, C.P., and RAY, B. 1994. Hydrostatic Pressure and Electroporation Have Increased bactericidal Efficiency in Combination with Bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*. 60 (11): 4174 – 4177.
- KLAENHAMMER, T. R. 1988. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Biochimie* 70: 337- 349
- KLAENHAMMER, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 12: 39-86
- LOVETT, J. y TWEDT, R. M. 1988. *Listeria*. *Food Technology*. 42 (4): 188-191
- LUNDÉN, J. M., MIETTINEN, M. K., AUTIO, T. J. y KORKEALA, H. J. 2000. Persistent *Listeria monocytogenes* Strains Show Enhanced Adherence to Food Contact Surface after Short Contact Times. 63 (9): 1204-1207.
- McAULIFFE, O., ROSS, R. P., HILL, C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *Microbiology Reviews*. 25: 285-308.
- MATHIEU, F., MICHEL, M., LEBRIHI, G., y LEFEBVRE, G. 1994. Effect of the bacteriocin carnocin CP5 and of the producing strain *Carnobacterium piscicola* CP5 on the viability of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in Salt solution, broth and skimmed milk, at various incubation temperatures. *International Journal of Food Microbiology*. 22: 155-172.
- MARTIN, S. E., y FISHER, C. W. 1999. *Listeria monocytogenes*. En: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Editorial Academic Press. Londres, Gran Bretaña. p 1228-1238.

- MING, X. y DAESCHEL, M. A. 1995. Correlation of cellular Phospholipid Content with Nisin Resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. Journal of Food Protection. 58 (4): 416-420.
- MEDINA, M., GAYA, P. y NÚÑEZ, M. 1992. Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas. Revista Española de Lechería. 34: 28-32.
- MONTVILLE, T. J., y WINKOWSKY, K. 1997. Biologically Based Preservation Systems and Probiotic Bacteria. En: Food Microbiology: fundamentals and frontiers. Editorial American Society for Microbiology. Washington D. C., Estados Unidos. p 557-577.
- MULET-POWELL, N., LACOSTE-ARMYNOT, A.M., VIÑAS, M., y SIMEON DE BUOCHBERG, M. 1998. Interactions between Pairs of Bacteriocins From Lactic Bacteria. Journal of Food Protection. 61 (9): 1210-1212.
- MURIANA, P. M. 1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. In Food. Journal of Food Protection. Supplement : 54-63.
- NEMETH, A., GASPARIK-REICHARDT, J., FARKAS, J., BALOGH, I. Y ANDRASSY, E. 1996. Identification and Characterization of Bacteriocins produced by Lactic Acid Bacteria. Fleischwirtschaft (10): 1042-1044.
- NETTLES, C. G., y BAREFOOT, S. F. 1993. Biochemical and Genetic Characteristics of Bacteriocins of Food-Associated Lactic Acid Bacteria. Journal of Food protection. 56 (4): 338-356.
- NILSSON, L., CHEN, Y., CHIKINDAS, M. L., HUSS, H. H., GRAM, L., and MONTVILLE, T. J. 2000. Carbon Dioxide and Nisin Act Synergistically on

Listeria monocytogenes. Applied and Environmental Microbiology. 66 (2): 769-774.

NINGYUN CAO, H. L., y CHEN, L. 1994. Antimicrobial Effects of Pressurized Carbon Dioxide on *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection. 59 (3): 657- 659.

O'KEEFFE, T. y HILL, C. 1999. Bacteriocins. En: Enciclopedia of Food Microbiology. Editorial Academic Press. Londres, Gran Bretaña. p 183-197.

PATCHET, R. A., KELLY, A. F., y KROLL, R. G. 1992. Effect of Sodium Chloride on the Intracellular Solute pools of *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection. 58 (12): 3959-3963.

PÉREZ ELORTONDO, F.J., SALMERÓN, J., ALBISU, M., y CASAS, C. 1999. Biofilms in the food industry. Food Science and Technology International. 5 (1): 25-30.

PETERSON, M.E., PELROY, G. A., PARANJPYE, R.N., POYSKY, F.T., ALMOND, J.S, y EKLUND, M.W. 1993. Parameters for Control of *Listeria monocytogenes* in Smoked Fishery Products: Sodium Chloride and Packaging Method. Journal of Food Protection. 56 (11): 938-943.

PIARD, J. C., Y DESMAZEAUD, M. J. 1992. Inhibiting Factors produced by Lactic Acid Bacteria. Bacteriocins and others antibacterial substances. Letters Applied International Technology. 72: 113-142.

PILET, M.F., DOUSSET, X., BARRÉ, R., NOVEL, G., DESMASEAUD, M., y PIARD, J.C. 1995. Evidence for two Bacteriocins produced by

- Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from Fish and Active against *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection. 58 (3): 256-262.
- REKHIF, N., ATRIH, A., y LEFEBVRE, G. 1994. Selection and Properties of Spontaneous Mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 Resistant to Different Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Strains. Current Microbiology. 28: 237-241.
- REQUENA, T., y PELÁEZ, C. 1995. Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 35 (1): 19-44.
- ROCOURT, J., COSSART, P. 1997. *Listeria monocytogenes*. En: Food Microbiology: fundamentals and frontiers. Editorial American Society for Microbiology. Washington D. C., Estados Unidos. p 337-352.
- ROGERS, A. M. y MONTVILLE, T. J. 1994. Quantification of Factors Which Influence Nisin's Inhibition of *Clostridium botulinum* 56A in a Model Food System. Journal of Food Science. 59(3): 663- 668.
- SHAW, B. G., y HARDING, C. D. 1985. Atypical Lactobacilli from Vacuum-Packaged Meats: Comparison by DNA Hybridization, Cell Composition and Biochemical Test with a Description of *Lactobacillus carnis* sp. Nov. Systematic Applied Microbiology. 6: 291-297.
- STEVENS, K. A., SHELDON, B. W., KLAPES, N. A., y KLAENHAMMER, T. R. 1992. Effect of Treatment Conditions on Nisin Inactivation of Gram Negative Bacteria. Journal of Food Protection. 55: 763-767

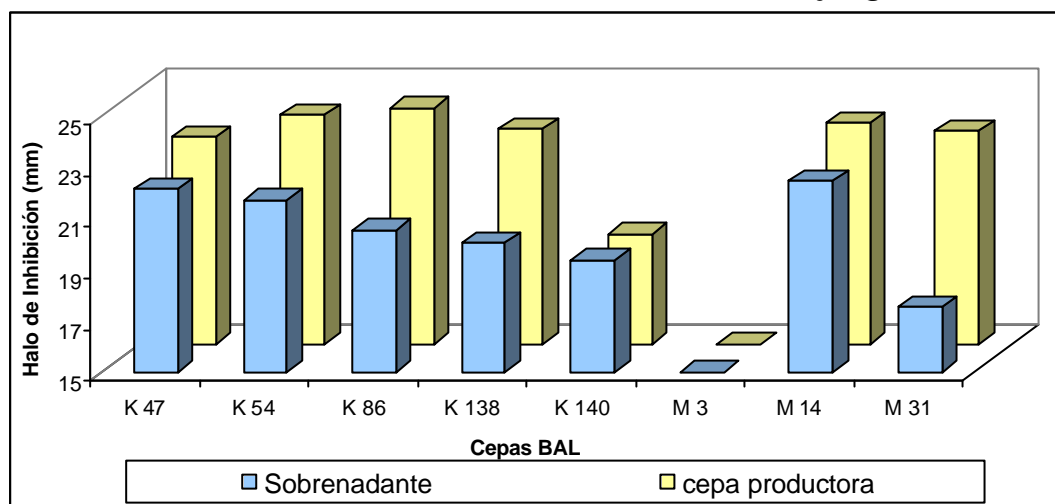
- SUAZO, V. 2001. Caracterización del Antagonismo de una Bacteriocina de *Carnobacterium piscicola* frente a Cepas de *Listeria monocytogenes*. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 87 p.
- TAGG, J.R., DAJANI, A.S., WANNAMAKER, L.W. 1976. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacteriological Reviews*. 40 (3): 722-756
- TAYLOR, L.Y. CANN, D.D, Y WELCH, B. J. 1990. Antibotulinal Properties of Nisin in Fresh Fish Packaged in an Atmosphere of Carbon Dioxide. *Journal of Food Protection*. 53 (11): 953-957.
- THOMAS, L.V., y WIMPENNY, J.W.T. 1996. Investigation of the effect of Combined Variations in Temperature, pH, and NaCl Concentration on nisin Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (6): 2006-2012
- VIVAS, L. 1999. Listeriosis: Problema en desarrollo. *ILE*. 86 – 90
- VIGNOLO, G., PALACIOS, J., FARÍAS, M.E., SESMA, F., SCHILLINGER, U., HOLZAPFEL, W., y OLIVER, G. 2000. Combined Effect of Bacteriocins on the Survival of Various *Listeria* Species in Broth and Meat System. *Current Microbiology*. 41: 410-416
- ZÚÑIGA, A. 2002. Producción Continua de Bacteriocina de *Carnobacterium piscicola* a escala prepiloto y Estudio de su Efecto Antagónico en Contra de *L. monocytogenes*. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias.

ANEXOS

ANEXO 1

1. HALOS DE INHIBICIÓN DE CEPAS DE BAL PRODUCTORAS DE SUSTANCIAS TIPO BACTERIOCINA (STB)

1.1 Pruebas de antagonismo en agar con ocho cepas de BAL y los sobrenadantes de sus cultivos frente a *L. monocytogenes* Lm 82



M3 no presentó halo de inhibición en la prueba de antagonismo con la cepa

1.2 Análisis Estadístico de halos de inhibición entre las 8 cepas lácticas

1.2.1 Análisis de Varianza (ANDEVA)

Chequeo de Varianza: Bartlett's test: 1.78368 P-Value = 0.0953193

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	70.1021	6	11.6837	20.83	0.0000
Within groups	11.78	21	0.560952		
Total (Corr.)	81.8821	27			

1.2.2 Prueba de comparacion múltiple de Tukey Method: 95.0 percent Tukey HSD

cepa	Count	Mean	Homogeneous Groups
M 31	4	17.8	X
K 140	4	19.4	X X
K 138	4	19.5625	X
K 86	4	20.575	X X
K 54	4	21.7375	X X
K 47	4	22.1625	X X
M 14	4	22.4625	X

Contrast	Difference	+/- Limits
M14 - M31	*4.6625	1.72205
M14 - K47	0.3	1.72205
M14 - K54	0.725	1.72205
M14 - K86	*1.8875	1.72205
M14 - K138	*2.9	1.72205
M14 - K140	*3.0625	1.72205
M31 - K47	*-4.3625	1.72205
M31 - K54	*-3.9375	1.72205
M31 - K86	*-2.775	1.72205
M31 - K138	*-1.7625	1.72205
M31 - K140	-1.6	1.72205
K47 - K54	0.425	1.72205
K47 - K86	1.5875	1.72205
K47 - K138	*2.6	1.72205
K47 - K140	*2.7625	1.72205
K54 - K86	1.1625	1.72205
K54 - K138	*2.175	1.72205
K54 - K140	*2.3375	1.72205
K86 - K138	1.0125	1.72205
K86 - K140	1.175	1.72205
K138 - K140	0.1625	1.72205

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 2

2. STB Y LOS FACTORES FAVORABLES A SU ACTIVIDAD FRENTE A *L. monocytogenes* Lm82

2.1 Halos de Inhibición en mm de *L. monocytogenes* Lm82 con las STB a diferentes niveles de NaCl, CO₂ y temperatura

STB de <i>C. piscicola</i> L103				
25°C ± 1°C			4°C ± 2°C	
NaCl	s / CO ₂	c / CO ₂ ²⁾	s / CO ₂	c / CO ₂
0%	12,67 ± 0,56 ¹⁾	15,53 ± 0,30	34,04 ± 0,57	44,60 ± 1,87
3%	12,79 ± 0,11	15,73 ± 0,45	35,74 ± 1,28	44,92 ± 1,78
6%	13,13 ± 0,26	16,20 ± 0,40	36,39 ± 0,98	46,72 ± 2,50
12%	12,87 ± 0,69	16,27 ± 0,60	35,88 ± 0,62	47,02 ± 2,02
STB de cepa M14				
25°C ± 1°C			4°C ± 2°C	
NaCl	s / CO ₂	c / CO ₂	s / CO ₂	c / CO ₂
0%	11,17 ± 0,53	11,54 ± 1,24	31,35 ± 0,32	38,35 ± 0,13
3%	11,07 ± 0,38	12,40 ± 0,56	31,98 ± 0,35	39,68 ± 0,45
6%	11,64 ± 0,21	13,05 ± 0,39	33,49 ± 0,26	40,26 ± 0,47
12%	11,84 ± 0,21	12,90 ± 0,39	34,31 ± 0,33	41,40 ± 0,46

¹⁾ Valores corresponden al promedio de duplicados con tres repeticiones

²⁾ concentración ≈ 10% CO₂

2.2 Análisis Estadístico

2.2.1 STB de cepa *C. piscicola* L103

2.2.1.1 Análisis de varianza

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A: Temperature	8251,17	1	8251,17	6113,22	0,0000
B: CO ₂	543,178	1	543,178	402,44	0,0000
C: NaCl	17,229	3	5,743	4,25	0,0116
INTERACTIONS					
AB	160,564	1	160,564	118,96	0,0000
AC	6,81287	3	2,27096	1,68	0,1886
BC	2,28234	3	0,76078	0,56	0,6426
RESIDUO	47,2404	35	1,34972		
TOTAL (CORREGIDO)	90,2848	47			

2.2.1.2 Prueba de Comparación múltiple de Tukey Method: 95.0 percent Tukey HSD

Temperatura

Temperatura	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
25°C	24	14.4	X
4°C	24	40.6221	X
Contrast		Difference	+/- Limits
4 - 25		*26.2221	0.680051

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

CO₂

CO ₂	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
0%	24	24.1471	X
10%	24	30.875	X
Contrast		Difference	+/- Limits
0 - 10		*-6.72792	0.680051

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

NaCl

NaCl	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
0%	12	26.6283	X
3%	12	27.2942	XX
12%	12	28.0108	X
6%	12	28.1108	X
Contrast		Difference	+/- Limits
0 - 3		-0.665833	1.2793
0 - 6		*-1.4825	1.2793
0 - 12		*-1.3825	1.2793
3 - 6		-0.816667	1.2793
3 - 12		-0.716667	1.2793
6 - 12		0.1	1.2793

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

2.2.2 STB de cepa M14

2.2.2.1 Análisis de varianza (ANDEVA)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A: Temperature	7157,5	1	7157,5	24682,97	0,0000
B: CO ₂	203,034	1	203,034	700,17	0,0000
C: NaCl	29,5202	3	9,84007	33,93	0,0000
INTERACTIONS					
AB	109,989	1	109,989	379,30	0,0000
AC	5,91074	3	1,97025	6,79	0,0010
BC	0,837217	3	0,279072	0,96	0,4213
RESIDUO	10,1492	35	0,289977		
TOTAL (CORREGIDO)	7516,94	47			

2.2.2.2 Prueba de Comparación múltiple de Tukey Method: 95.0 percent Tukey HSD

Temperatura

Temperatura	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
25°C	24	11.9304	X
4°C	24	36.3529	X
Contrast			Difference +/- Limits
4 - 25			*24.4225 0.315211

*denota una diferencia estadísticamente significativa

CO₂

CO ₂	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
0%	24	22.085	X
10%	24	26.1983	X
Contrast			Difference +/- Limits
0 - 10			*-4.11333 0.315211

*denota una diferencia estadísticamente significativa

NaCl

NaCl	Count	LS Mean	Homogeneous Groups	
0%	12	23.0617	X	
3%	12	23.7808	X	
6%	12	24.6117	X	
12%	12	25.1125	X	
Contrast			Difference	+/- Limits
0 - 3			*-0.719167	0.592968
0 - 6			*-1.55	0.592968
0 - 12			*-2.05083	0.592968
3 - 6			*-0.830833	0.592968
3 - 12			*-1.33167	0.592968
6 - 12			-0.500833	0.592968

*denota una diferencia estadísticamente significativa

ANEXO 3

3. COMBINACIÓN DE LAS STB DE CEPA *C. piscicola* L103 Y CEPA M143.1 Halos de Inhibición (mm) de *L. monocytogenes* Lm 82 con las STB separadas y combinadas a 25°C y 4°C

	25°C	4°C
STB de cepa <i>C. piscicola</i> L103	24.61 ± 2.45 ¹⁾	58.15 ± 1.29
STB de cepa M14	21.26 ± 1.50	50.75 ± 0.74
STB de ambas cepas combinadas	23.69 ± 2.43	56.30 ± 2.50

¹⁾ Valores corresponden al promedio de duplicados con tres repeticiones

3.2 Análisis Estadístico por halos de inhibición entre temperaturas y STB

3.2.1 Análisis de varianza multifactorial

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value

MAIN EFFECTS					
temperatura	4345.29	1	4345.29	1084.59	0.0000
STB	86.0486	2	43.0243	10.74	0.0015
RESIDUAL	56.0897	14	4.00641		

TOTAL (CORRECTED)	4487.43	17			

3.2.2 Prueba de comparación múltiple de Tukey entre temperaturas
Method: 95.0 percent Tukey HSD

temperature	Count	LS Mean	Homogeneous Groups	
25°C	9	23.1867	X	
4°C	9	54.2611	X	

Contrast			Difference	+/- Limits

4 - 25			*31.0744	2.0254

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

3.2.3 Prueba de comparación múltiple de Tukey entre STB separadas y combinadas
Method: 95.0 percent Tukey HSD

STB	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
A: M14	6	35.7933	X
B: L103+M14	6	39.335	X
C: L103	6	41.0433	X
Contrast		Difference	+/- Limits
C - A		*5.25	3.03619
C - B		1.70833	3.03619
A - B		*-3.54167	3.03619

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

ANEXO 4

4. ESTUDIO DEL SINERGISMO DE LA COMBINACIÓN DE LAS STB CON FACTORES FAVORABLES A SU ACTIVIDAD ANTAGONISTA FRENTE A *L. monocytogenes* Lm 82

4.1 STB separadas y combinadas más factores favorables a su actividad antagonista (4°C/ 10% CO₂/ 12% NaCl)

	Halo de inhibición (mm)
STB de cepa <i>C. piscicola</i> L103	59.73 ± 4.81 ¹⁾
STB de cepa M14	49.18 ± 2.66
Combinación de ambas STB	55.01 ± 3.17

¹⁾ Valores del duplicado de tres repeticiones

4.2 Análisis estadístico

4.2.1 Análisis de varianza (ANDEVA) para los halos de inhibición entre las STB separadas y combinadas

Chequeo de varianza: Bartlett's test: 1.12015 P-Value = 0.756911

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	162.851	2	81.4256	6.29	0.0337
Within groups	77.6953	6	12.9492		
Total (Corr.)	240.547	8			

4.2.2 Prueba de comparación múltiple de Tukey para los halos de inhibición entre las STB separadas y combinadas
Method: 95.0 percent Tukey HSD

STB	Count	Mean	Homogeneous Groups
A: M14	3	49.1767	X
B: L103 + M14	3	55.0133	XX
C: L103	3	59.57	X

Contrast	Difference	+/- Limits
C – A	*10.3933	9.01516
C – B	4.55667	9.01516
A – B	-5.83667	9.01516

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

ANEXO 5

**5. ESTUDIO DEL ANTAGONISMO EN CALDO DE CULTIVO DE LA
COMBINACIÓN DE LAS STB MÁS LOS FACTORES FAVORABLES A LA
ACCIÓN INHIBIDORA FRENTE A *L. monocytogenes* Lm82**

**5.1 Recuento de *L. monocytogenes* en caldo de cultivo con 12% de NaCl
incubado a 4°C en una atmósfera con 10% de CO₂**

Días	Control de <i>L. monocytogenes</i> Log (ufc/mL)	<i>L. monocytogenes</i> más STB Log (ufc/mL)
0	6.48 ± 0.32 ¹⁾	5.61 ± 0.39
3	5.50 ± 0.74	3.85 ± 0.27
7	5.45 ± 0.67	3.16 ± 1.03
14	4.61 ± 1.25	3.61 ± 0.47

¹⁾ Valores promedio de duplicados con tres repeticiones

5.2 Análisis Estadístico

5.2.1 Análisis de Varianza multifactorial para el Caldo + STB

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value

MAIN EFFECTS					
A:repeticion	0.830521	2	0.415261	1.11	0.3875
B:dias	10.4084	3	3.46946	9.31	0.0113
RESIDUAL	2.2349	6	0.372484		

TOTAL (CORRECTED)	13.4738	11			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

5.2.2 Prueba de comparación múltiple de Tukey para el Caldo + STB por días Method: 95.0 percent Tukey HSD

Días	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
7	3	3.16507	X
14	3	3.61978	X
3	3	3.85152	X
0	3	5.61928	X

Contrast	Difference	+/- Limits
0 - 3	*1.76777	1.71935
0 - 7	*2.45421	1.71935
0 - 14	*1.9995	1.71935
3 - 7	0.686443	1.71935
3 - 14	0.231737	1.71935
7 - 14	-0.454707	1.71935

*denota una diferencia estadísticamente significativa.

5.2.3 Análisis de Varianza multifactorial para el control

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:repeticion	3.19849	2	1.59924	4.36	0.0678
B:dias	5.26281	3	1.75427	4.78	0.0495
RESIDUAL	2.20225	6	0.367042		
TOTAL (CORRECTED)	10.6635	11			

5.2.4 Prueba de comparación múltiple de Tukey para el control entre días Method: 95.0 percent Tukey HSD

Días	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
14	3	4.61611	X
7	3	5.45194	XX
3	3	5.50831	XX
0	3	6.4857	X

Contrast	Difference	+/- Limits
0 - 3	0.977383	1.70674
0 - 7	1.03375	1.70674
0 - 14	*1.86958	1.70674
3 - 7	0.05637	1.70674
3 - 14	0.8922	1.70674
7 - 14	0.83583	1.70674

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

5.2.5 Análisis de Varianza (ANDEVA) para el día 0 entre tratamientos

Chequeo de Varianza : Bartlett's test: 1.02028 P-Value = 0.799929

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.12601	1	1.12601	8.49	0.0435
Within groups	0.53052	4	0.13263		
Total (Corr.)	1.65653	5			

5.2.6 Prueba de comparación múltiple para el día 0 entre tratamientos Method: 95.0 percent Tukey HSD

Tratamientos	Count	Mean	Homogeneous Groups
I: caldo +STB	3	5.61928	X
II:Control	3	6.4857	X
Contrast			Difference +/- Limits
II - I			*0.866413 0.823525

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

5.2.7 Análisis de Varianza (ANDEVA) para el día 3 entre tratamientos

Chequeo de Varianza : Bartlett's test: 1.52492 P-Value = 0.245237

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	4.11746	1	4.11746	12.97	0.0227
Within groups	1.27	4	0.3175		
Total (Corr.)	5.38746	5			

5.2.8 Prueba de comparación múltiple para el día 3 entre tratamientos Method: 95.0 percent Tukey HSD

Tratamientos	Count	Mean	Homogeneous Groups
I: Caldo + STB	3	3.85152	X
II: Control	3	5.50831	X
Contrast			Difference +/- Limits
II - I			*1.6568 1.27417

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

5.2.9 Análisis de varianza (ANDEVA) para el día 7 entre tratamientos

Chequeo de Varianza Bartlett's test: 1.09345 P-Value = 0.592865

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	7.84466	1	7.84466	10.29	0.0327
Within groups	3.04989	4	0.762473		
Total (Corr.)	10.8946	5			

5.2.10 Prueba de comparación múltiple para el día 7 entre tratamientos Method: 95.0 percent Tukey HSD

Tratamientos	Count	Mean	Homogeneous Groups
I: Caldo + STB	3	3.16507	X
II: Control	3	5.45194	X
Contrast	Difference	+/- Limits	
II - I	*2.28687	1.97455	

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

5.2.11 Análisis de varianza (ANDEVA) para el día 14 entre tratamientos

Chequeo de Varianza: Bartlett's test: 1.51448 P-Value = 0.249117

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.48902	1	1.48902	1.65	0.2686
Within groups	3.61576	4	0.903939		
Total (Corr.)	5.10478	5			