



Universidad Austral de Chile

Escuela de Ingeniería en Alimentos

**Sensibilidad de *Listeria monocytogenes* Frente
a una Bacteria Ácido Láctica y Diferentes
Combinaciones de pH y NaCl**

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

Ximena del Carmen Aguilar Kemp

Valdivia – Chile
2007

PROFESOR PATROCINANTE:

Sra. Renate Schöbitz Twele
Tecnólogo Médico, M. Sc. en Microbiología de
los Alimentos
Instituto de Ciencia y Tecnología de los
Alimentos

PROFESORES INFORMANTES:

Sr. Luigi Ciampi Panno
Ingeniero Agrónomo, Master of Science,
Doctor of Philosophy, Post Doctoral Fellow
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal

Sr. Ah-Hen Kong Shun
Ingeniero en Alimentos, Dipl.-Ing, Doctor
Instituto de Ciencias y Tecnología de los
Alimentos

Esta Tesis fue financiada y forma parte del proyecto FONDEF D04I 1153 titulado “Desarrollo de biocontroladores de *Listeria monocytogenes* para su incorporación al procesamiento industrial del salmón”. De acuerdo a lo informado por el honorable consejo universitario sobre los derechos de propiedad intelectual, los resultados de esta tesis están encriptados para no interferir y alterar procesos de obtención de patentes y otros derechos.

AGRADECIMIENTOS

Cuesta comenzar a escribir ésta hoja, y a medida que lo hago, la ansiedad aumenta por agradecer a tantas personas, ya sea de forma directa o indirecta que participaron en la realización de mi tesis.

En primer lugar, quiero nombrar a Dios que ha hecho posible llegar a éste punto de mi vida, por tu protección divina.....gracias DIOS!!!!!!!

En segundo lugar a la persona más importante de mi vida, que ha sido un padre, una madre y una maravillosa abuelita. A ti abuelita, muchas gracias, me faltará vida para devolver tanto amor, dedicación, protección, esfuerzo y sobre todo la confianza puesta en mi. Sin ti no hubiese podido llegar hasta esta etapa tan importante de mi vidate amo mi abuelita!

Un sincero agradecimiento a mi patrocinante, Renate Schöbitz, por el tiempo y respaldo que me ha dado, por sus sugerencias para poder terminar esta tesis.

No puedo olvidar a mis compañeros y amigos con los cuales he compartido en varias facetas de mi vida, gracias por lo buenos y malos momentos. En especial a mis compañeros de laboratorio por ser las personas encantadoras, gracias.

Gracias a Milena, Claudia, Bexi, Danitza, Marlene, Inelia, Cristina y Carolina por quererme y escucharme, por esos momentos inolvidables, por ser mis amigas.

A Pato por compartir estos últimos años, por tu amistad gracias.

Debo un reconocimiento especial a las personas que me acogieron como parte de su familia, por darme techo y cariño, por la ayuda en todo sentido, gracias Sra Alicia, Don Juanito e hijos. También un especial agradecimiento para Roxana, Alex y Katy por su desinteresado cariño, muchas gracias.

Gracias a la vida por encontrar al hombre más maravilloso de éste mundo, a ti mi amor, Armando, por esa entrega total de amor, apoyo y comprensión, gracias por disfrutar mis alegrías, sufrir mis penas, por estar conectado con cada parte de mis sentidos. Gracias por darme la oportunidad de conocer a tu familia, quienes me acogieron y apoyaron. A tu mamá, por tratarme como hija y a tus hermanos por su cariño. Gracias por ser la familia que nunca tuvemuchas gracias!!!!!!!.

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el cariño y apoyo incondicional de las personas nombradas. Esto es también vuestro premio.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	3
2.1.1	Capacidad de formar “biofilm”	3
2.1.2	Incidencia de <i>Listeria</i> en alimentos	4
2.1.3	Comportamiento de <i>Listeria</i> en los alimentos	4
2.1.4	<i>Listeria</i> en la industria del salmón	5
2.2	Factores de sensibilidad frente a <i>L. monocytogenes</i>	6
2.3	Antagonismo Microbiano	6
2.3.1	Bacterias ácido lácticas	6
2.3.2	Bacteriocinas de las bacterias ácido lácticas (BAL)	6
2.3.3	Modo de acción de las bacteriocinas	7
2.4	Barreras adicionales para inhibir desarrollo de <i>L. monocytogenes</i>	7
2.5	Estudio de bacteriocinas aplicadas en alimentos	8
2.6	Efecto de las bacteriocinas sobre <i>L. monocytogenes</i>	8
2.7	Resistencia de <i>L. monocytogenes</i> frente a las bacteriocinas	9
2.8	Producción de la STB bajo distintas condiciones de NaCl y pH	9
2.9	Efecto de pH, NaCl y T ^o , sobre <i>L. monocytogenes</i>	10
3	MATERIAL Y MÉTODO	11
3.1	Etapas preliminares del estudio	11
3.1.1	Estandarización del recuento en placa de los recuentos de <i>Listeria monocytogenes</i> y la BAL productora de STB	11
3.1.2	Obtención sobrenadante de la cepa láctica (BAL-A)	11
3.1.3	Control positivo sobrenadante cepa BAL-B	11
3.2	Cepas del estudio	11
3.2.1	Cepa ácido láctica productora de una sustancia tipo bacteriocina (STB)	11
3.2.2	Cepas de <i>L. monocytogenes</i>	11
3.3	Prueba de antagonismo indirecto y gota sobre césped: cepa BAL-A productora de STB y su sobrenadante frente a 10 cepas de <i>Listeria</i> (TAGG., et al 1976)	12
3.4	Desarrollo de cepas resistentes de <i>Listeria</i> a la STB de la cepa	14

	láctica, a 25°C	
3.5	Prueba de cocultivo en caldo ST, de dos cepas de <i>L. monocytogenes</i> , en forma separada frente a la cepa BAL-A productora de STB, con dos niveles de pH	15
3.6	Cocultivo en caldo ST para dos cepas de <i>L. monocytogenes</i> con dos concentraciones de NaCl, a 25°C	18
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1	Prueba de antagonismo indirecto: cepa BAL-A productora de STB frente a nueve cepas de <i>L. monocytogenes</i> y una de <i>L. innocua</i>	19
4.2	Prueba de gota sobre césped: sobrenadante de cepa BAL-A productora de STB frente a 10 cepas de <i>Listeria</i>	20
4.3	Prueba de antagonismo indirecto y gota sobre césped: desarrollo de resistencia de Lm ISP y Lm 82 a la STB de la cepa láctica BAL-A	22
4.4	Prueba de cocultivo en caldo ST para Lm 82 y Lm ISP, frente a la cepa BAL-A a dos niveles de pH	25
4.5	Prueba de cocultivo en caldo ST para Lm 82 y Lm ISP, frente a la cepa BAL-A a dos niveles de NaCl (1,5% y 3,0%), a pH 6,0	29
5	CONCLUSIONES	33
6	RESUMEN-SUMMARY	34
7	BIBLIOGRAFÍA	36
8	ANEXOS	44

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Diseño experimental para dos pruebas de cocultivos (3.5 y 3.6)	18
2	Prueba de antagonismo indirecto en agar MRS con la cepa BAL-A frente a 10 cepas de <i>Listeria</i>	21
3	Prueba de gota sobre césped en agar MRS con sobrenadante de la cepa BAL-A frente a 10 cepas de <i>Listeria</i>	22

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Interacción de los monómeros de bacteriocina con la membrana citoplasmática: Modelo de complejo de poración. (Farías citado por NUÑEZ, 1996)	7
2	Medición de la zona radial para pruebas de antagonismo indirecto y diámetro para técnica gota sobre césped	12
3	Prueba de antagonismo indirecto y gota sobre césped	13
4	Siembras seriadas de cepas resistentes de <i>L. monocytogenes</i> frente a la cepa láctica productora de STB	14
5	Prueba de antagonismo indirecto de colonias resistentes de <i>L. monocytogenes</i> a la STB de la cepa BAL-A	15
6	Esquema de inoculación para las pruebas de cocultivo de <i>L. monocytogenes</i> y la cepa BAL-A, a 25°C	16
7	Esquema para el recuento en placa, de <i>L. monocytogenes</i> y la cepa BAL-A, del cocultivo al tiempo cero	17
8	Esquema para el recuento en placa, de <i>L. monocytogenes</i> y la cepa BAL-A, del cocultivo a las 24, 48 y 72 h	17
9	Prueba de antagonismo indirecto en agar MRS, con la cepa BAL-A frente a cepas de <i>Listeria</i>	20
10	Prueba de la gota sobre césped sobre agar MRS del sobrenadante de la cepa BAL-A	21
11	Prueba de antagonismo indirecto y gota sobre césped de Lm 82	22
12	Prueba de antagonismo indirecto: cepa láctica productora de bacteriocina frente a cinco colonias resistentes de <i>Listeria</i> Lm 82, a 25 °C ± 1°C	23
13	Prueba de gota sobre césped: sobrenadante neutralizado de cepa BAL-A frente a cinco colonias resistentes de <i>Listeria</i> Lm 82, a 25 °C ± 1 °C	24
14	Prueba de antagonismo indirecto: cepa láctica productora de bacteriocina frente a cinco colonias resistentes de <i>Listeria</i> Lm ISP, a 25 °C ± 1 °C	24
15	Prueba de gota sobre césped: sobrenadante neutralizado de cepa BAL-A frente a cinco colonias resistentes de <i>Listeria</i> Lm ISP, a 25 °C ± 1 °C	25
16	Antagonismo de cepa BAL-A en cocultivo con Lm 82 a dos niveles de pH en caldo ST, a 25 °C ± 1°C	26
17	Antagonismo de cepa BAL-A en cocultivo con Lm ISP a dos niveles de pH en caldo ST, a 25 °C ± 1°C	27
18	Recuentos en pruebas de cocultivo, a 25 °C ± 1 °C	29

19	Antagonismo de cepa BAL-A en cocultivo con Lm 82 a dos niveles de NaCl en caldo ST a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y pH 6,0	30
20	Antagonismo de cepa BAL-A en cocultivo con Lm ISP a dos niveles de NaCl en caldo ST a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y pH 6,0	31

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Recuento en placa de un cultivo de 18 h en caldo ST, para cepas de <i>Listeria</i> y de 24 h en caldo MRS, para la cepa láctica BAL-A	45
2	Operaciones realizadas para las pruebas de cocultivo	46
2.1	Solución tampón de buffer fosfato 20mM, utilizadas para la elaboración del medio de cultivo a dos niveles de pH (LAMA, 2002)	46
2.2	Rangos de pH para pruebas de cocultivo	46
2.3	Preparación del medio de cultivo caldo Soya Trypticasa (ST) adicionado de cloruro de sodio para cocultivos	46
3	Prueba de antagonismo indirecto en agar MRS con cepa BAL-A frente a 10 cepas de <i>Listeria</i>	47
4	Análisis estadístico de la zona radial de los halos de inhibición entre las 10 cepas de <i>Listeria</i> en antagonismo indirecto	48
4.1	Análisis de varianza (ANDEVA)	48
4.2	Prueba de comparación múltiple de Tukey. Method: 95.0 percent HSD	48
4.3	Comparación de medias de la zona radial frente a las 10 cepas de <i>Listeria</i>	48
5	Prueba de gota sobre césped en agar MRS con la cepa BAL-A frente a 10 cepas de <i>Listeria</i>	49
6	Análisis estadístico de la zona radial de los halos de inhibición entre las 10 cepas de <i>Listeria</i> en gota sobre césped	50
6.1	Análisis de varianza (ANDEVA)	50
6.2	Prueba de comparación múltiple de Tukey. Method: 95.0 percent HSD	50
6.3	Comparación de medias del diámetro frente a las 10 cepas de <i>Listeria</i>	50
7	Prueba de antagonismo indirecto en agar MRS con cepa BAL-A y su control frente a 10 cepas de <i>Listeria</i>	51
8	Recuento en placa de <i>Listeria</i> Lm 82 y cepa BAL-A, en agar OXA y agar MRS, correspondiente, a pH 5,5 y 6,5	52
9	Análisis estadístico de las pruebas de cocultivo de la cepa Lm 82 a dos niveles de pH	53
9.1	Análisis de varianza (ANDEVA) a pH 5,5	53
9.2	Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica. Method: 95.0 percent HSD	53
9.3	Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos por tiempo. Method: 95.0 percent HSD	53
9.4	Prueba de interacciones para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica.	53

9.5	Análisis de varianza (ANDEVA) a pH 6,5.	54
9.6	Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica. Method: 95.0 percent HSD	54
9.7	Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos por tiempo. Method: 95.0 percent HSD	54
10	Recuento en placa de <i>Listeria</i> Lm ISP y cepa BAL-A, en agar OXA y agar MRS, correspondiente, a pH 5,5 y 6,5	55
11	Análisis estadístico de las pruebas de cocultivo de la cepa Lm ISP a dos niveles de pH	56
11.1	Análisis de varianza (ANDEVA) a pH 5,5	56
11.2	Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica. Method: 95.0 percent HSD	56
11.3	Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos por tiempo. Method: 95.0 percent HSD	56
11.4	Prueba de interacciones para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica.	56
11.5	Análisis de varianza (ANDEVA) a pH 6,5.	57
11.6	Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica. Method: 95.0 percent HSD	57
11.7	Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos por tiempo. Method: 95.0 percent HSD	57
12	Recuento en placa de <i>Listeria</i> Lm 82 y cepa BAL-A, en agar OXA y agar MRS, correspondiente, a 1,5% y 3,0% NaCl y pH 6,0	58
13	Análisis estadístico de las pruebas de cocultivo de la cepa Lm 82 a dos niveles de % NaCl.	59
13.1	Análisis de varianza (ANDEVA) a 1,5% NaCl	59
13.2	Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica. Method: 95.0 percent HSD	59
13.3	Prueba de comparación múltiple de Tuckey para los recuentos por tiempo. Method: 95.0 percent HSD	59
13.4	Prueba de interacciones para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica.	59
13.5	Análisis de varianza (ANDEVA) a pH 3,0% NaCl.	60
13.6	Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica. Method: 95.0 percent HSD	60
13.7	Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos por tiempo. Method: 95.0 percent HSD	60
14	Recuento en placa de <i>Listeria</i> Lm ISP y cepa BAL-A, en agar OXA y agar MRS, correspondiente, a 1,5% y 3,0% NaCl y pH 6,0	61
15	Análisis estadístico de las pruebas de cocultivo de la cepa Lm ISP a dos niveles de % NaCl.	62

15.1	Análisis de varianza (ANDEVA) a 1,5% NaCl	62
15.2	Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica. Method: 95.0 percent HSD	62
15.3	Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos por tiempo. Method: 95.0 percent HSD	62
15.4	Prueba de interacciones para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica.	62
15.5	Análisis de varianza (ANDEVA) a pH 3,0% NaCl.	63
15.6	Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica. Method: 95.0 percent HSD	63
15.7	Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos por tiempo. Method: 95.0 percent HSD	63

1 INTRODUCCIÓN

El cultivo del salmón no solo constituye la principal actividad acuicultora en Chile. Es además, uno de los principales pilares de nuestra economía. Su consumo, en general, ha aumentado considerablemente. Este cambio en los hábitos de los consumidores ha estado provocado por las nuevas formas de vida, la gran oferta de estos productos y su abaratamiento. Esto ha hecho que los riesgos asociados a este tipo de productos se incrementen, sobre todo en lo relativo a la existencia de patógenos emergentes.

El salmón ahumado es un producto muy especial, no solo por sus peculiares características organolépticas (sabor, textura y olor), sino también por su vulnerabilidad ante algunos problemas de calidad higiénico-sanitaria. El ahumado en frío tiene algunas limitaciones, es por ello que requiere un control exhaustivo de todos los procesos en que interviene el producto para evitar problemas microbiológicos. El ahumado no elimina la posible presencia de la bacteria patógena *Listeria monocytogenes*. En este producto los controles sanitarios en la industria alimentaria no son aún eficaces para combatir este agente, la cual puede ocasionar graves problemas de salud entre sus consumidores.

Es fundamental mantener la cadena de frío tanto en la elaboración de los productos alimentarios y su distribución como en el hogar. Para ello se está buscando una forma más natural para la conservación de los alimentos. Las bacterias ácido lácticas (BAL), han estado presentes en la alimentación desde hace siglos; se encuentran en productos fermentados como la leche y derivados, productos cárnicos y vegetales. Estos microorganismos, cuando fermentan carbohidratos producen una mezcla de sustancias con acción antimicrobiana como: ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y péptidos de bajo peso molecular llamados bacteriocinas. Estas últimas son estudiadas como una alternativa a minimizar el riesgo microbiológico.

Debido a las características fisiológicas y bioquímicas de las BAL, su uso en la conservación de los alimentos, permitirá disminuir el empleo de preservativos químicos adicionados a éstos. El uso de las bacteriocinas como preservadores naturales de alimentos contribuye a la tecnología de "obstáculos", para la seguridad y preservación de alimentos, ayudando a reducir el espectro de microorganismos que pudieran desarrollarse en el alimento, sobre todo de *L. monocytogenes*.

HIPÓTESIS

Distintas cepas de *L. monocytogenes* presentan diferencias en su sensibilidad frente a la sustancia tipo bacteriocina de una cepa BAL, aislada de salmón ahumado en frío. El NaCl y distintas condiciones de pH adicionados a la STB de una cepa BAL, afectan la sensibilidad de *Listeria monocytogenes*.

Objetivo general

Determinar la sensibilidad de distintas cepas de *L. monocytogenes* frente a la sustancia tipo bacteriocina (STB) de la cepa BAL-A, en combinación con factores extrínsecos e intrínsecos del salmón ahumado en frío.

Objetivos específicos

- Analizar la sensibilidad de 10 cepas de *L. monocytogenes*, frente a la sustancia tipo bacteriocina de la cepa BAL-A.
- Evaluar el desarrollo de resistencia frente a la STB de la cepa BAL-A, de dos cepas de *L. monocytogenes* seleccionadas a, 25 °C.
- Conocer el efecto inhibitorio sobre *L. monocytogenes* de la STB de la cepa BAL-A, en combinación con tres condiciones de pH, 5,0, 5,5 y 6,5.
- Conocer el efecto inhibitorio sobre *L. monocytogenes* de la STB de la cepa BAL-A en combinación con tres concentraciones de NaCl, 1,5 % y 3,0 % y 6,0 %.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Listeria monocytogenes*

El género *Listeria* comprende seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. greyi* (KARUNASAGAR, 1999). Son bacilos cortos de 0,4-0,5 × 0,5-2,0 µm con extremos redondeadas, pueden estar solas o en cadenas cortas y menos frecuentemente en filamentos largos. Estas bacterias son gram-positivas, no formadoras de endoesporas, anaeróbicas facultativas, catalasa positivas y oxidasa negativas (BERGEY **et al.**, 2000). Crecen en medios de cultivo como los caldos de infusión de cerebro corazón, de soya tripticasa y de triptosa (JAY, 2000).

Por tratarse de una bacteria psicrótrofa, en los alimentos contaminados almacenados en frío no es inhibido su crecimiento. Crecen en el rango de temperatura entre 1,0 a 50° C (óptimo entre 30°C y 37°C), con una actividad de agua mínima entre 0,9 y 0,97 (MARTÍN y FISHER, 2000) y son capaces de crecer en el intervalo de pH desde 4,1 hasta alrededor de 9,6 (JAY, 2000). Son tolerantes a la sal, crecen a elevadas concentraciones de NaCl, hasta un 10% de NaCl y sobreviven por un año en presencia de un 16% NaCl (MARTÍN y FISHER, 2000).

L. monocytogenes ha sido reconocido como un patógeno importante causante de ETA (enfermedades transmitidas por los alimentos), sólo desde inicios de los años 80' (BLACKBURN y MACCLURE, 2002). HEINITZ y JOHNSON (1998), encontraron que la incidencia de *L. monocytogenes* era más alta en pescado ahumado en frío, que en ahumado en caliente. Además, analizaron más de 70 muestras de 4 países: Canadá, Noruega, Filipinas y Reino Unido, donde la ocurrencia de *Listeria* fue de 14,3%, 23,7%, 0% y 16,1% respectivamente. El serotipo más común asociado con enfermedad en alimentos fue el tipo 4b (MARTÍN y FISHER, 2000).

La ingesta del patógeno a través de los alimentos causa listeriosis, una enfermedad ligada a grupos muy particulares de la población humana, siendo el más frecuente el representado por mujeres embarazadas, con el consiguiente aborto espontáneo del feto. Otro grupo importante es el de la población con algún tipo de inmunodeficiencia como drogadicción, SIDA, alcoholismo o quimioterapia. Personas de avanzada edad o niños muy pequeños son también sensibles a presentar los síntomas de la enfermedad (DEL CAMINO, 1991).

Diversos alimentos han sido implicados como fuente de *L. monocytogenes* como productos cárnicos, lácteos y vegetales (MARTÍN y FISHER, 2000), así como quesos frescos de tipo hispano, paté, hot dogs, salame, leche chocolatada pasteurizada, mantequilla, camarones cocidos, mejillones ahumado, pescado ahumado, ensalada de papas, hortalizas crudas y ensalada de repollo (FAO/OMS, 2004).

2.1.1 Capacidad de formar “biofilm”. Una de las principales preocupaciones de las industrias alimentarias es la propiedad de *L. monocytogenes* de formar películas

biológicas denominadas biofilm. Esta bacteria forma biofilm sobre numerosas superficies (BLACKMAN y FRANK, 1996), propiedad que varía entre cepas de *L. monocytogenes* (BORUCKI *et al.*, 2003) y es debido a factores intrínsecos de cada cepa de *L. monocytogenes*. Algunas cepas de este agente persisten en el desarrollo del procesamiento de alimentos por largos periodos de tiempo y en algunos casos cepas persistentes han sido responsables de listeriosis (KATHARIOU, 2002 y TOMPKIN, 2002). La persistencia se relaciona a la habilidad de las cepas a formar biofilm y la sobrevivencia a tratamientos con sanitizantes (HOLAH *et al.*, 2002).

ARIZCUN *et al.* (1998), en su investigación para encontrar un procedimiento de descontaminación para remover los biofilms de esta bacteria, encontraron que la combinación de NaOH (pH 10,5; 100 mM) y ácido acético (pH 5,4; 76,7 mM) aplicado secuencialmente a 55°C cada 5 min fue el tratamiento más efectivo para remover los biofilms de *L. monocytogenes*.

2.1.2 Incidencia de *Listeria* en alimentos. RODAS-SUARÉZ *et al.* (2006), analizaron la presencia de *Listeria* spp en muestras de ostras, pescados y mariscos. *L. monocytogenes* fue encontrada en un 4,5% de las muestras de pescado y en un 8,3 % de las muestras de mariscos, y no fue aislada de las ostras. Además fueron encontradas cepas multiresistentes a antibióticos, representando una potencial amenaza para la salud humana. SÁNCHEZ *et al.* (2006), en su investigación sobre la incidencia de especies de *Listeria* en una planta productora de alimentos congelados, encontraron que de los 30 productos de origen animal, se detectó la presencia de *L. monocytogenes* en la materia prima animal, específicamente en la carne molida, lo cual representó un 1,66% del total de muestras analizadas, en definitiva de un total de 580 muestras analizadas, *L. monocytogenes* se detectó en un 0,34 %. LAWRENCE y GILMOUR (1994), estudiaron la incidencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en una planta de procesamiento de pollos, y encontraron que el 46% de las muestras de pollo crudo contenían bacterias de género *Listeria* spp, mientras que la presencia de *L. monocytogenes* fue menor (26 %).

2.1.3 Comportamiento de *Listeria* en los alimentos. El desarrollo de *L. monocytogenes* sobre carne de vacuno envasada al vacío depende de factores como temperatura, pH y flora competitiva. Con un pH normal de la carne, en un transcurso de 9 semanas a una temperatura de almacenamiento de 2 °C y 4 °C, no se presentó desarrollo de *L. monocytogenes*, puesto que después de 1 a 2 semanas ya dominaron las bacterias lácticas. En cambio con un pH > 6,0 y en la primera semana de almacenamiento a 2 °C y 4 °C, hubo un incremento en el número de *Listerias* en una potencia de 10 (KAYA y SCHMIDT, 1993).

El pescado con frecuencia se contamina con bacterias patógenas, como *L. monocytogenes*, las cuales son capaces de crecer en productos frescos y congelados, y su predominio en pescado ahumado es elevado. Es por ello que FIGUERA *et al.* (2005), en una investigación sobre el crecimiento de *Listeria* sobre atún ahumado empacado al vacío, demostraron que el ahumado en caliente tuvo un efecto inhibitor en la población inicial de esta bacteria, efecto que se redujo después de 7 días de almacenamiento. Además la combinación de salmuera, ahumado y temperaturas superiores a los 40°C redujeron más de 3 % la humedad de los productos ahumados, afectando el crecimiento de esta bacteria.

2.1.4 *Listeria* en la industria del salmón. El salmón ahumado puede estar contaminado con *L. monocytogenes*, donde los niveles de contaminación son generalmente bajos y los consumidores son rara vez expuestos a concentraciones de riesgo. El efecto de preservación del humo en caliente es debido particularmente a la baja actividad de agua junto con la formación de una membrana en la superficie causada por el salado y secado, la cual constituye una barrera física e inhibe el crecimiento de microorganismos (RØRVIK , 2000)

Para el ahumado de salmón habitualmente son empleados dos métodos: ahumado en frío a 18 °C – 28 °C y un proceso de ahumado en caliente, sobre 68 °C (KARUNASAGAR, 1999). Las poblaciones de *L. monocytogenes* inoculados en la superficie de porciones de salmón cambian muy poco durante el proceso de ahumado en frío entre 22,2°C a 30,6°C por 20 horas, con o sin aplicación de humo; pero cuando la temperatura de proceso fue más baja entre 17,1 °C a 21,1 °C, las poblaciones disminuyeron entre 10 a 25 colonias al aplicar el humo (EKLUND **et al.**, 1994). El estudio de RØRVIK (2000), concuerda con lo mencionado anteriormente, donde el proceso de ahumado en frío de los salmones, demostró disminuir la población de *L. monocytogenes* a temperaturas entre los 17,1 °C a 21,1 °C, mientras que desde los 22,2 °C a 30 °C la bacteria logró sobrevivir. La prevención de la recontaminación en ambos procesos del salmón es sin embargo, de gran importancia.

En el estudio de EKLUND **et al.** (1994), identificaron la incidencia y fuentes de *L. monocytogenes* en la industria del pescado ahumado en frío. Según estos autores la primera fuente de contaminación es la superficie externa del pescado congelado y fresco, además de diferentes etapas de procesamiento. Los equipos, el personal y otras superficies con las cuales el producto toma contacto y se contamina, constituyen las fuentes secundarias de contaminación. Por otra parte, en el mismo estudio se identificó los niveles de incidencia de *L. monocytogenes*, para lo cual se aisló de salmón ahumado en frío de 6 plantas de procesamiento. De un total de 61 muestras, 48 fueron positivas, con un rango de 0,3 – 34,3 células de *L. monocytogenes* por gramo.

Debido a que las temperaturas usadas en la operación de ahumado en frío no fueron letales para *L. monocytogenes*, THURETTE **et al.** (1998), reportaron la inactivación de *L. monocytogenes* en la presencia de humo líquido. El estudio de POYSKY **et al.** (1997), identificaron las temperaturas requeridas para inactivar *L. monocytogenes* en la superficie de filetes de salmón procesados con o sin humo o humo líquido, en un proceso de ahumado en caliente. Cuando los filetes de salmón fueron procesados con calor y en ausencia de humo, el producto tuvo que alcanzar temperaturas de 83,3 °C o superiores para inactivar a *L. monocytogenes*. La interacción de calor y humo líquido sin diluir, bajó la temperatura letal a 58,9 °C. Cuando la concentración de humo líquido disminuyó, las temperaturas letales para *L. monocytogenes* aumentaron.

Algunos países han fijado límites legales en el número de células de *L. monocytogenes* permitidas en los alimentos listos para el consumo. Es así como la exigencia de EE.UU. de NA es la ausencia del microorganismo en muestras de 50g. En Alemania, por otro lado en cambio los productos que contengan más de 10^4 microorganismos / g están sometidos a una retirada automática (JAY, 2000), BATT **et al.** (2000), señalaron

que si este microorganismo no excede 100 células/g de alimento en el punto de consumo, el alimento se considera aceptable para individuos que no están en riesgo.

WALSH *et al.* (2001), estudiaron la resistencia a los antibióticos entre cepas de *Listeria*, incluyendo a *L. monocytogenes*, en alimentos. Se observó resistencia a uno o más antibióticos en un 0,6% de *L. monocytogenes*, comparada con 19,5 % de *Listeria innocua*, en cambio no se observó resistencia en *Listeria seeligeri* o *Listeria welshimeri*. La resistencia a tetraciclina (6,7%) y penicilina (3,7%), fue lo más frecuentemente observado.

2.2 Factores de sensibilidad frente a *L. monocytogenes*

En el estudio de ZHENG *et al.* (2005), fueron seleccionados sanitizantes para evaluar la efectividad en contra de *L. monocytogenes* en salchichas, utilizando diacetato de sodio (SD), diacetato de sodio más benzoato de potasio y la mezcla de lactato de sodio (SL), diacetato de sodio y benzoato de potasio (PB). Los tratamientos fueron evaluados a $-2,2$ °C, $1,1$ °C, $4,4$ °C, 10 °C y $12,8$ °C a lo largo de 90 días. El más efectivo fue el de 6 % SD, para la inhibición de *L. monocytogenes*. Según YOON *et al.* (2004), el uso de PL + SDA (lactato de sodio + diacetato de sodio), en todos los niveles probados inhiben completamente el crecimiento de *L. monocytogenes* Scott A en salmón ahumado, almacenado a 4 °C durante 32 días. A un 5 % de la solución comercial, se observó efecto listeriostático a 10 °C, durante 11 días.

ROBBINS (2005), demostró la eficacia de ozono, cloro y peróxido de hidrógeno para destruir células planctónicas y biofilm de dos cepas de *L. monocytogenes*. La cepa Scott A fue eliminada completamente a 4 ppm ozono, La cepa 10403S, en cambio requirió una concentración 1,00 ppm para eliminar estas células. Las células del biofilm de *L. monocytogenes* Scott A fueron completamente eliminadas con 150 ppm de cloro, a 20 °C por 1 min y un 3,5 % de H_2O_2 , a 20 °C después de 5 min.

2.3 Antagonismo Microbiano

2.3.1 Bacterias ácido lácticas. En la actualidad se considera a las bacterias lácticas microorganismos GRAS (Generally Recognized As Safe), por lo que su utilización y/o la de sus metabolitos como bioconservantes, está recibiendo una gran atención (GOULD, 1996). Los principales mecanismos de antagonismo microbiano de las bacterias lácticas son, la competencia por nutrientes y la formación de ácido láctico y acético, con el consiguiente descenso del pH (LINDGREN y DOBROGOSZ, 1990). Además, pueden producir otras sustancias antimicrobianas como etanol, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrógeno, ácido benzoico, isómeros D de aminoácidos, reuterina y bacteriocinas (REQUENA y PELÁEZ, 1995).

2.3.2 Bacteriocinas de las bacterias ácido lácticas (BAL). Los microorganismos poseen distintas formas para competir en su ambiente, una de ellas es la producción de sustancias antagónicas, como son las bacteriocinas. Las bacteriocinas son definidas como proteínas biológicamente activas en contra de cepas de la misma especie o especies muy relacionadas a la cepa productora. Según SAHL y BIERBAUM (1998), las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente por las bacterias productoras.

Las bacteriocinas representan uno de los sistemas de defensa microbiana mejor estudiados. El humano puede aprovechar esta gran diversidad de moléculas para usarlas como inhibidores de microorganismos patógenos en alimentos. Evitando de esta forma la aparición de cepas multiresistentes. La aplicación en seguridad microbiológica alimentaria de péptidos antimicrobianos producidos por bacterias ha experimentado un extraordinario avance en los últimos años. Un único microorganismo puede producir más de una bacteriocina y éstas han sido aisladas de una variedad de productos alimenticios de origen industrial y natural, principalmente de productos cárnicos y lácteos, pero también de vegetales (ENNAHAR *et al.*, 2000).

2.3.3 Modo de acción de las bacteriocinas. La formación de poros (FIGURA 1) en la membrana citoplasmática de las células sensibles sería un mecanismo de acción común de las bacteriocinas producidas por las BAL (KLAENHAMMER, 1993). Este proceso induce la disipación de la fuerza protón-motriz (PMF), (Montville y Bruno, citados por ENNAHAR *et al.*, 2000). La PMF es un gradiente electroquímico, compuesto de un potencial de membrana y una gradiente de pH, necesarios en distintos procesos metabólicos celulares, dependientes de energía. La eliminación de esta fuente de energía celular promueve la salida rápida de metabolitos de pequeño tamaño, como aminoácidos y nucleótidos, interrumpiendo los procesos de biosíntesis de la célula (BROTZ *et al.*, 1998).

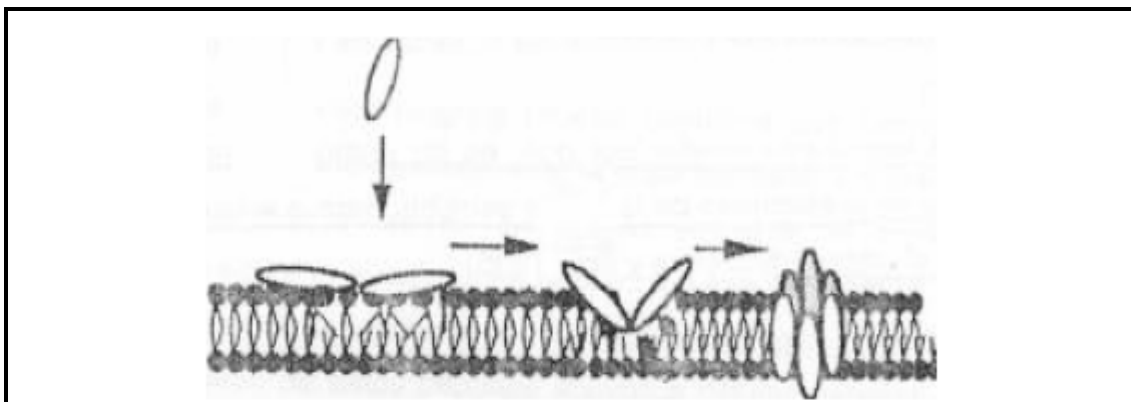


FIGURA 1 Interacción de los monómeros de bacteriocina con la membrana citoplasmática: modelo de complejo de poración. (Farías citado por NUÑEZ, 1996).

2.4 Barreras adicionales para inhibir desarrollo de *L. monocytogenes*

THURETTE *et al.* (1998), estudiaron *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115, enfrentada a diferentes temperaturas: 4 °C, 8 °C o 12 °C, concentraciones de NaCl 2 %, 3 % o 4 % y concentraciones de fenol 5 ppm, 12,5 ppm o 20 ppm. La cepa fue inoculada en 100 ml de LEB (caldo de preenriquecimiento para *Listeria*), para conseguir un nivel inicial 10^4 ufc/ml. A 4 °C no se observó crecimiento, ya que la combinación de bajas temperaturas y 20 ppm de fenol llevaron a una reducción de los recuentos bacteriano. A 8 °C con 3 % NaCl y 20 ppm de fenol, el microorganismo fue inhibido. Finalmente a 4 % NaCl, 4 °C, y 20 ppm de fenol inhibió completamente el desarrollo de *L. monocytogenes*.

2.5 Estudio de bacteriocinas aplicadas en alimentos

Las bacteriocinas de BAL presentan un gran interés para la industria alimentaria por su potencialidad para inhibir a microorganismos patógenos y alterantes de alimentos (YANG y RAY, 1994). La bacteriocina usada actualmente en la conservación y seguridad de alimentos es la nisina, péptido de 3500 daltons de peso molecular, producida por cepas de *Streptococcus lactis* subsp *lactis*. Su estructura en anillos le confiere una notable termorresistencia. Es muy inestable en medio básico y el punto isoeléctrico es superior a 10,5 (BOURGEOIS y LARPENT, 1994). Es eficaz contra bacterias Gram-positivas, pero no inhibe a hongos y bacterias Gram-negativas (JAY, 2000).

La actividad antilisterial de tres cepas productoras de bacteriocinas de *Carnobacterium* spp en contra de *L. monocytogenes*, fue estudiada por BRILLET **et al.** (2004). Todas las cepas de *Listeria* fueron inhibidas, sin embargo, *C. divergens* V41 tuvo el más alto efecto inhibitorio. La actividad antilisterial fue luego probada en salmón ahumado en frío, inoculados con una mezcla de cepas de *Listeria* y *Carnobacterium* spp. *C. divergens* V41 fue la cepa más efectiva, manteniendo los niveles de *L. monocytogenes* en < 50 ufc/g, durante 4 semanas de almacenamiento al vacío a 4 °C y 8 °C.

DE MARITNIS **et al.** (1997), aplicaron como factores antagonistas de *L. monocytogenes*, nisina junto a otros factores como T^o, pH y NaCl, este último fue agregado a 0 %, 1,5 % o 3,0 %, a un pH de 5,5, 6,0 y 6,5. De acuerdo a los resultados, *L. monocytogenes* fue más sensible a la nisina bajo condiciones de concentración de sal 0,5 %, pH 5,5 y a 10 °C.

2.6 Efecto de las bacteriocinas sobre *L. monocytogenes*

Las bacteriocinas de la clase I, a la cual pertenece nisina, comercialmente disponible como preservante de alimentos (DELVES-BROUGHTON **et al.**, 1996) y las bacteriocinas de clase IIa, son de especial interés como inhibidores de *Listeria* spp (RASCH y KNOCHHEL, 1998). HARRIS **et al.** (1991), evaluaron la sensibilidad de *L. monocytogenes* frente a una concentración de nisina entre 0 y 50 µg/ml. Se observó a 10 µg/ml de nisina, una reducción de dos ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes*, en comparación con el control (10⁹ ufc/ml).

La susceptibilidad de diferentes cepas de *L. monocytogenes* a las bacteriocinas nisina y pediocina, difiere (FERREIRA **et al.**, 1996; RASCH y KNOCHHEL, 1998). En el estudio de EIJSINK **et al.** (1998), compararon las actividades antimicrobianas de cuatro bacteriocinas de BAL clase IIa (pediocin PA-1, enterocin A, sakacin P, y curvacin A), frente a *L. monocytogenes*, siendo enterocin A la más efectiva al inhibir su crecimiento en un 50%, con una concentración necesaria entre 0,1 a 1,0 ng/ml (MICs). KATLA **et al.** (2003), también estudiaron la diferencia de susceptibilidad de 200 cepas de *L. monocytogenes* a las bacteriocinas clase IIa sakacin P, sakacin A y pediocin PA-1 y nisina, donde sakacin P alcanzó las concentraciones más bajas con un rango de 0,01 a 0,61 ng/ml (IC₅₀), requeridas para inhibir en un 50% el crecimiento de las cepas de *L. monocytogenes*.

Un nuevo tipo de bacteriocina sakacina G fue reportado por SIMON **et al.** (2002), con propiedad antilisterial, producida por *Lactobacillus sake* 2512. BRILLET **et al.** (2005), observaron el efecto de inocular *Carnobacterium divergens* V41 como biopreservante en contra de *L. monocytogenes*, en salmón ahumado en frío, donde *Listeria spp* disminuyó sus recuentos en menos de un ciclo logarítmico después de tres y cuatro semanas de almacenamiento.

En el estudio de la inhibición de *L. monocytogenes* por tres cepas de *Carnobacterium spp*, según DUFFES **et al.** (1999), *C. divergens* V41 y *C. piscicola* V1 fueron las cepas más efectivas en cocultivos, inhibiendo a *L. monocytogenes* al cuarto día, mientras que el efecto de inhibición de *C. piscicola* SF668 fue observado al día 13. LOESSNER **et al.** (2003), llegaron a la conclusión que la adición de un cultivo de *Lactobacillus plantarum* era una potente medida para reducir *Listeria* en una línea de queso.

2.7 Resistencia de *L. monocytogenes* frente a las bacteriocinas

BOUTTEFROY y MILLIERE (2000), observaron la resistencia a nisina en *L. monocytogenes* con un rango de frecuencia entre $< 10^{-9}$ a 10^{-5} . La resistencia a clase IIa y otras bacteriocinas ocurrió con una frecuencia de 10^{-6} a 10^{-3} en *L. monocytogenes* (VIGNOLO **et al.**, 2000 y DYKES y HASTINGS, 1998).

En un cocultivo de *L. monocytogenes* y *C. piscicola* A9B bac⁺, los recuentos de *Listeria* fueron 6 ciclos logarítmicos más bajos que el control, mientras que la bacteriocina semi-purificada carnobacteriocin B2, después de 6 días de incubación a 5 °C, causó una disminución de 5 ciclos logarítmico, comparado con el control de *L. monocytogenes*, lo cual indicó altos niveles de resistencia de las células de *L. monocytogenes* expuestas a carnobacteriocin B2 producida *in situ* y semi-purificada (NILSSON **et al.**, 2004).

GRAVESEN **et al.** (2002), estudiaron la resistencia de *L. monocytogenes* y observaron que el mecanismo para ello es debido a los dos cambios en la expresión del sistema fosfotransferasa (PTS).

2.8 Producción de la STB bajo distintas condiciones de NaCl y pH

El efecto de distintos factores físico-químicos sobre la actividad de una bacteriocina no sólo tiene un fin de caracterizarla, sino también sirve para inferir su posible aplicación industrial, ya que las altas temperaturas y las amplias variaciones de pH, son entre otras, algunas de las condiciones que debe resistir una bacteriocina para ser útil como potencial agente inhibidor de microorganismos que pudieran desarrollarse en el alimento (FARÍAS, 1996). VERLUYTEN **et al.** (2004), estudiaron el efecto de NaCl en la producción de curvacin A y observaron que a baja concentraciones de NaCl (2 % w/v), disminuyó la producción de bacteriocina, mientras el crecimiento de la bacteria no fue afectado. En cambio la inhibición de la cepa BAL aumentó linealmente al aumentar la concentración de sal. LEROY y DE VUYST (1999), observaron como el cloruro de sodio afectó la producción de sakacin k y el desarrollo de la cepa *Lactobacillus sakei* CTC 494 (biomasa). Según HIMELBLOOM **et al.** (2001), la producción de bacteriocina producida de *C. piscicola* no fue afectada a 1,0 % y 3,0 % NaCl.

Las mejores condiciones para la producción de bacteriocina por *L. plantarum*, fueron

encontrados con rangos de temperaturas entre 22 °C a 27 °C, con una concentración de sal de 2,3 % a 2,5 % (LEAL-SÁNCHEZ *et al.*, 2002). Con respecto al pH, LEROY y DE VUYST (1999), encontraron que el pH 6,0 fue óptimo para la tasa de crecimiento y formación de biomasa, pero no correspondió al pH óptimo para la producción de sakacin K. En la investigación de ESTRADA *et al.* (2006), trabajaron con dos cepas nativas de *L. plantarum* y *L. brevis*, y evaluaron el efecto bactericida contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*, a diferentes tiempo de almacenamiento, temperatura y pH. La mejor acción inhibitoria la obtuvieron los extractos crudos producidos por *L. plantarum*, a pH 5,5 y a la temperatura de 0 °C y 4 °C. La producción máxima de bacteriocina en jugo de pescado no fue afectada por 1,0 % a 3,0 % NaCl. Sin embargo, el máximo crecimiento fue dependiente de la concentración de sal y declinó inversamente con el aumento de la concentración de NaCl (HIMELBLOOM *et al.*, 2001).

2.9 Efecto de pH, NaCl y temperatura, sobre *L. monocytogenes*

Temperaturas de refrigeración, pH y concentraciones de NaCl son los factores comúnmente usados en la seguridad y vida útil de los productos alimenticios (RYSER y MARTH, 1991), es por ello que muchos autores investigan el efecto de estos factores sobre *L. monocytogenes*. BUCHANAN *et al.* (1989), indicaron que la cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* fue dependiente de la interacción de T^o, pH y cloruro de sodio, particularmente en relación a la fase exponencial y duración de la fase lag. Por otra parte, THURETHE *et al.* (1998), observaron el desarrollo de *L. monocytogenes* en productos ahumados, con diferentes concentraciones de sal y temperatura. Indicaron que a bajas temperaturas y a 4 % NaCl el desarrollo de *L. monocytogenes* fue inhibido.

HAN-SHIN y RASCO (2007), observaron el efecto del contenido de sal y la temperatura de almacenamiento sobre *L. monocytogenes* (ATCC 19114, 7644 Y 19113), las cepas fueron incorporadas en huevos de salmón a 2 niveles de inóculo (log 2,4 y 4,2 ufc/g) y almacenados a 3 °C y 7°C por 30 días. La adición de sal a los huevos de salmón a 3°C no entregó un control adicional en el crecimiento de *L. monocytogenes* durante el periodo de almacenamiento, similarmente, al aumentar la temperatura a 7°C no inhibió su desarrollo. En cambio, en la presencia de nisina con o sin sal, *L. monocytogenes* fue inhibida (BOZIARIS *et al.*, 2007).

BOUTTEFROY y MILLIERE (2000), estudiaron la influencia de pH (5,0 – 8,2), concentraciones de NaCl (0 – 6 % p/v) y el tiempo de incubación (0 – 24 h) sobre la actividad inhibitoria de nisina (0 -100 U.l/ml) en contra de *L. monocytogenes* ATCC 15313. Nisina tuvo un efecto bactericida dependiente del pH, éste efecto aumentó al disminuir los valores de pH y disminuyó en la presencia de NaCl (2 % a 4 %). THOMAS y WIMPENNY (1996), observaron que al aumentar la concentración de sal se potenció la acción de la nisina en contra de la bacteria.

3 MATERIAL Y MÉTODO

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL) y en el Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile Valdivia, entre Abril y Diciembre de 2006.

3.1 Etapas preliminares del estudio

3.1.1 Estandarización del recuento en placa de los recuentos de *Listeria monocytogenes* y la BAL productora de STB.

Para conocer la concentración inicial de las cepas de *Listeria*, se realizó un recuento en placa de un cultivo de 18 h en caldo ST y a las 24 h para la cepa láctica (ANEXO 1). Con el objetivo de estandarizar las concentraciones de las cepas en estudio para las pruebas posteriores de antagonismo y cocultivo.

3.1.2 Obtención sobrenadante de la cepa láctica (BAL-A). La cepa BAL-A (3.2.1) productora de la STB, fue inoculada en 10 ml de caldo ST con agitación a 25 °C por 24 h. Posteriormente este cultivo se centrifugó a 7700 g × 10 min. El sobrenadante se llevó a pH 6,5 con NaOH 0,1 N y fue esterilizado por filtración a través de filtros Acrodisc (0,22 µm) (Gelman Sciences, Inc., Ann Arbor, Mich) y congelado a -20 °C ± 1 °C.

3.1.3 Control positivo sobrenadante cepa BAL-B. Se trabajó con el sobrenadante neutralizado, esterilizado y congelado a -20 °C ± 1 °C de la bacteria ácido láctica BAL-B.

3.2 Cepas del estudio

3.2.1 Cepa ácido láctica productora de una sustancia tipo bacteriocina (STB).

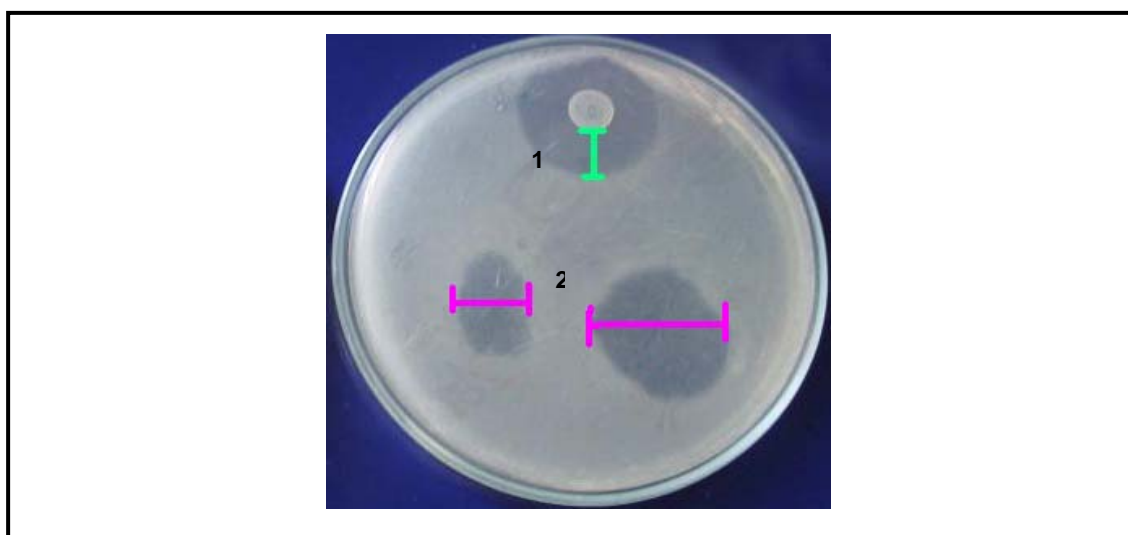
Se estudió la actividad antagónica, de una cepa de bacteria ácido láctica (BAL), aislada de salmón ahumado en frío, frente a distintas cepas de *L. monocytogenes*. La cepa láctica se mantuvo congelada a -20 °C ± 1 °C (freezer Whirlpool, Chile), en caldo Soya Trypticasa (ST), adicionado de glicerol al 1% (como crioprotector), hasta su uso.

3.2.2 Cepas de *L. monocytogenes*. Se trabajó con nueve cepas de *L. monocytogenes* y una de *L. innocua* las cuales fueron de diferentes orígenes: Lm 82 proporcionada por Food and Drug Administration (F.D.A); *Listeria innocua* proporcionada por el Instituto Medicina Preventiva Veterinaria (UACH); Lm ISP (Tecnolab), Lm ATCC 7644 proveniente del Centro de Análisis de Alimentos (Osorno, 2005); *L. cong C*, *L. cong 25* y *L. cong 22*, aisladas por Díaz (2004); Lm 4/00 aislada por Rodríguez (2002); Lm 1/00 y Lm 3/00 (Suazo, 2002). Las cepas se mantuvieron congeladas a -20 °C ± 1 °C, en caldo Soya Trypticasa (ST), adicionado de glicerol al 1%, hasta su uso.

3.3 Prueba de antagonismo indirecto y gota sobre césped: cepa BAL-A productora de STB y su sobrenadante frente a 10 cepas de *Listeria* (TAGG et al., 1976)

El estudio se realizó en triplicado y se efectuaron tres mediciones para la zona radial y el diámetro del halo (FIGURA 2). Para la prueba de antagonismo indirecto la cepa BAL-A productora de bacteriocina (3.2.1), fue incubada en caldo S.T (Becton, Dickinson and Company, USA) a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. A partir del cultivo se inocularon $5\text{ }\mu\text{L}$ en forma de puntos, en placas de agar MRS (FIGURA 3a). Las placas fueron incubadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Las cepas de *Listeria* (3.2.2) fueron incubadas en caldo ST a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 h. A partir de estos cultivos se realizaron 2 diluciones decimales en buffer fosfato (KH_2PO_4) pH 7,2 (APHA, 1992) y posteriormente se inoculó 0,7 ml en 7 ml de agar semisólido (caldo S.T con 0.75 % de agar), para obtener una concentración final de *Listeria* de 10^5 ufc/ml en el césped. Este cultivo fue vertido como césped sobre las placas de agar MRS, previamente inoculadas con la cepa láctica (FIGURA 3b). Las placas posteriormente fueron secadas por 15 min en la campana de flujo laminar (FACTOMET).

Para la técnica de gota sobre césped, fueron puestas gotas de $20\text{ }\mu\text{L}$ del sobrenadante neutralizado y esterilizado por filtración de la cepa láctica BAL-A (3.2.1) y $20\text{ }\mu\text{L}$ del control positivo de la cepa láctica BAL-B (3.1.3), sobre el césped de *Listeria* (FIGURA 3c). Las placas fueron incubadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Se observó presencia de halos de inhibición en el césped con las cepas de *Listeria*, alrededor del inóculo de la cepa láctica, cuyos halos se midieron con un pie de metro (zona radial), y en la zona de inoculación del sobrenadante de la cepa BAL-A que contenía la STB (diámetro del halo). Al finalizar la prueba se seleccionaron dos cepas de *L. monocytogenes*, con las cuales se hicieron las pruebas posteriores de resistencia y cocultivo.



¹ zona radial ² diámetro

FIGURA 2 Medición de la zona radial para pruebas de antagonismo indirecto y diámetro para técnica gota sobre césped.

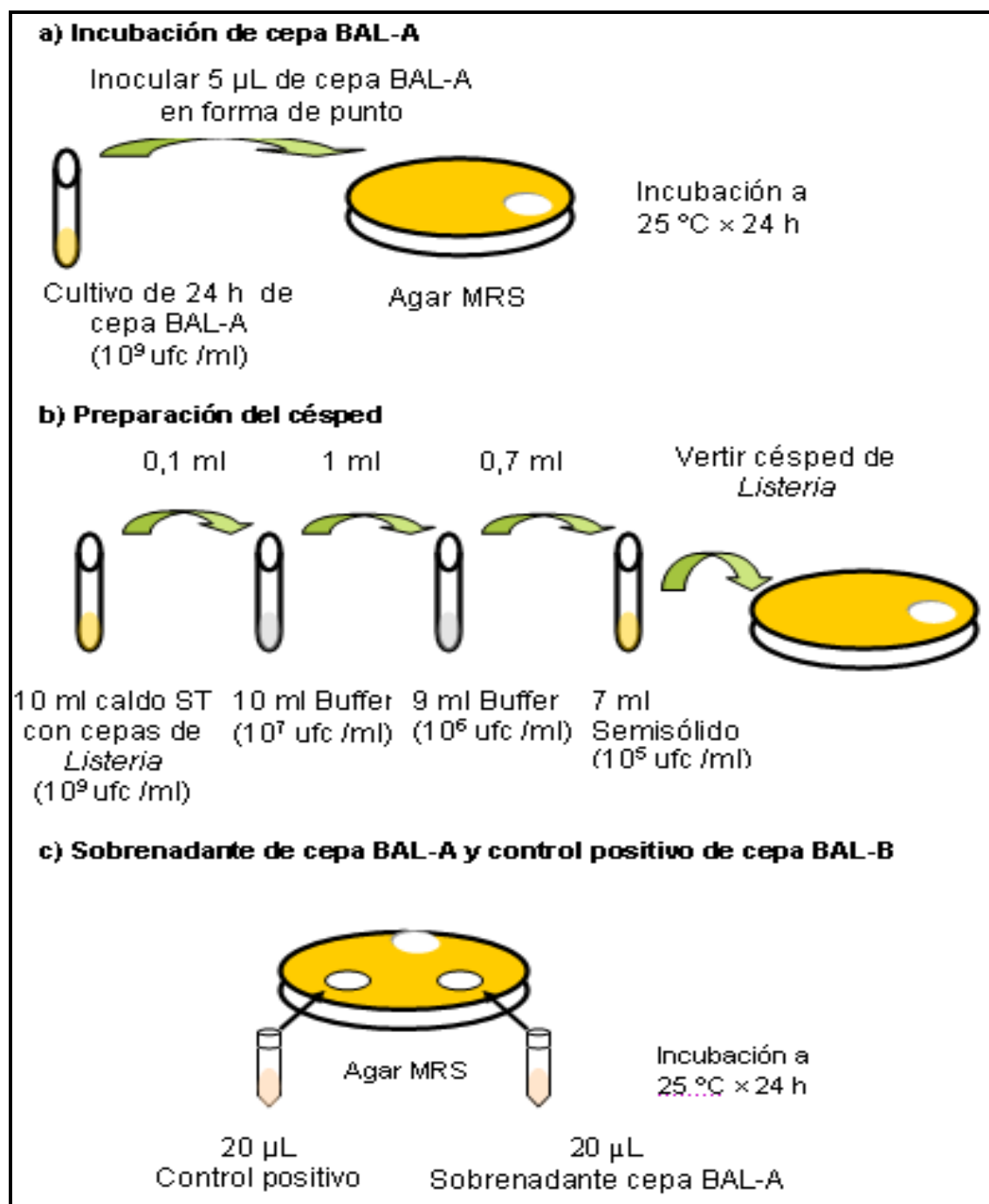


FIGURA 3 Prueba de antagonismo indirecto y gota sobre césped.

Análisis estadístico. Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante el análisis de varianza unifactorial con un nivel de confianza del 95 %. Al registrarse diferencias significativas entre las distintas cepas de *Listeria* se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey, para determinar la cepa más sensible a la acción antagonista de la cepa BAL-A. Se utilizó el software statgraphics 5.1 plus.

3.4 Desarrollo de cepas resistentes de *Listeria* a la STB de la cepa láctica, a 25°C

Al realizar la lectura de las placas (3.3), se observó en los halos de inhibición el desarrollo de colonias resistentes de *Listeria* frente a la STB de la cepa BAL-A. Por ello, se seleccionaron 5 colonias, de 2 cepas de *Listeria*: Lm 82 y Lm ISP, que presentaron resistencia en la prueba de antagonismo indirecto, las cuales se sembraron separadamente en tubos con caldo ST. Cada 24 h o cuando se observó turbidez en el caldo, se repicaron nuevamente en caldo ST, esto se realizó durante 5 días incubando a 25 °C con agitación mecánica (FIGURA 4).

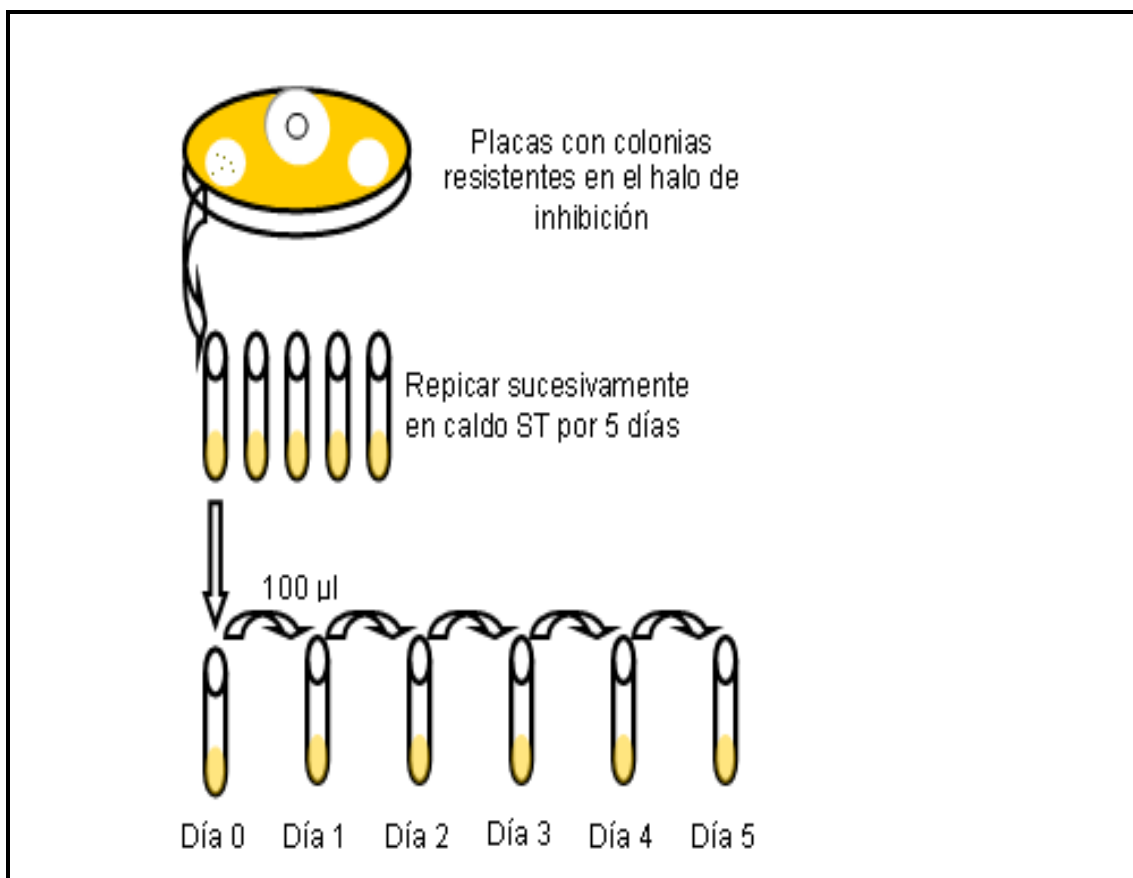


FIGURA 4 Siembras seriadas de cepas resistentes de *L. monocytogenes* frente a la cepa láctica productora de STB.

Posteriormente se realizó la prueba de antagonismo indirecto (3.3) a partir del cultivo del día 5 de ambas cepas de *Listeria* (FIGURA 5). Los halos de inhibición (zona radial) se midieron con un pie de metro (mm), Se realizaron tres mediciones por cada halo.

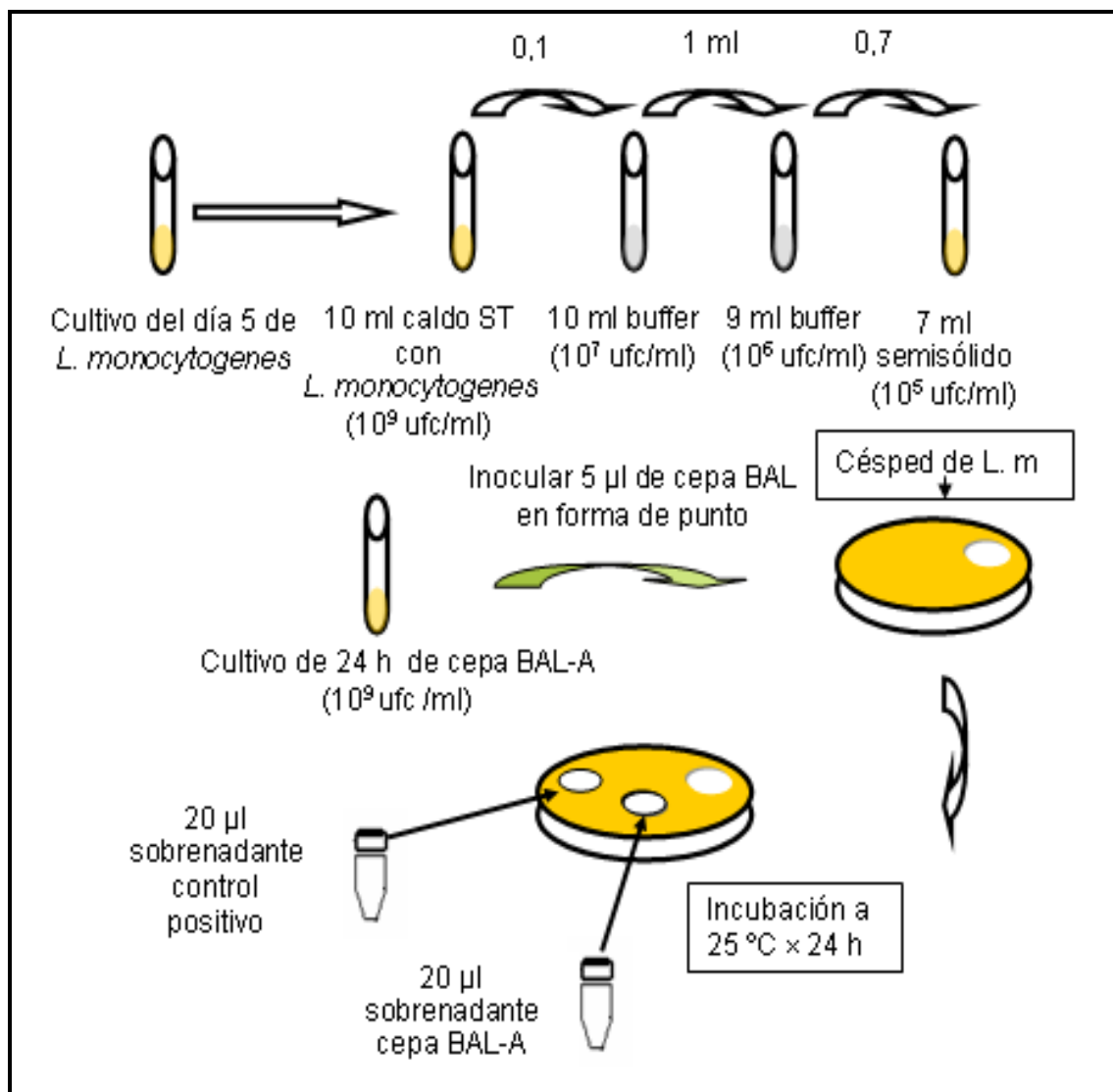


FIGURA 5 Prueba de antagonismo indirecto de colonias resistentes de *L. monocytogenes* a la STB de la cepa BAL-A.

3.5 Prueba de cocultivo en caldo ST, de dos cepas de *L. monocytogenes*, en forma separada frente a la cepa BAL-A productora de STB, con dos niveles de pH.

Se enfrentó en un cocultivo la cepa BAL-A, en forma separada con dos cepas de *L. monocytogenes* seleccionadas en la prueba de antagonismo indirecto. Para esta prueba se preparó caldo ST, y se reemplazó el agua destilada por una solución tampón de buffer fosfato 20mM ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$) ajustando el pH a 5,0, 5,5 y 6,5 (ANEXO 2.1). Para el cocultivo, se utilizó un cultivo de 18 h de *L. monocytogenes* y un cultivo de 24 h de la cepa BAL-A, ambas a una concentración de 10^9 ufc/ml. Se realizaron las diluciones como se indicó en la FIGURA 6. Los matraces fueron incubados en un agitador orbital (Barnstead Lab-Line), a $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 72 h. La viabilidad de *L.*

monocytogenes se midió cada 24 h mediante recuento en placa (FIGURA 7 y 8), en agar selectivo OXA para *L. monocytogenes* y en agar MRS para la cepa BAL-A. Las placas fueron incubadas a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h respectivamente. En cada recuento se verificó el pH del caldo con papel indicador (MERCK) de pH por posibles cambios de pH del medio de cultivo en el tiempo (ANEXO 2.2). El experimento se realizó en triplicado.

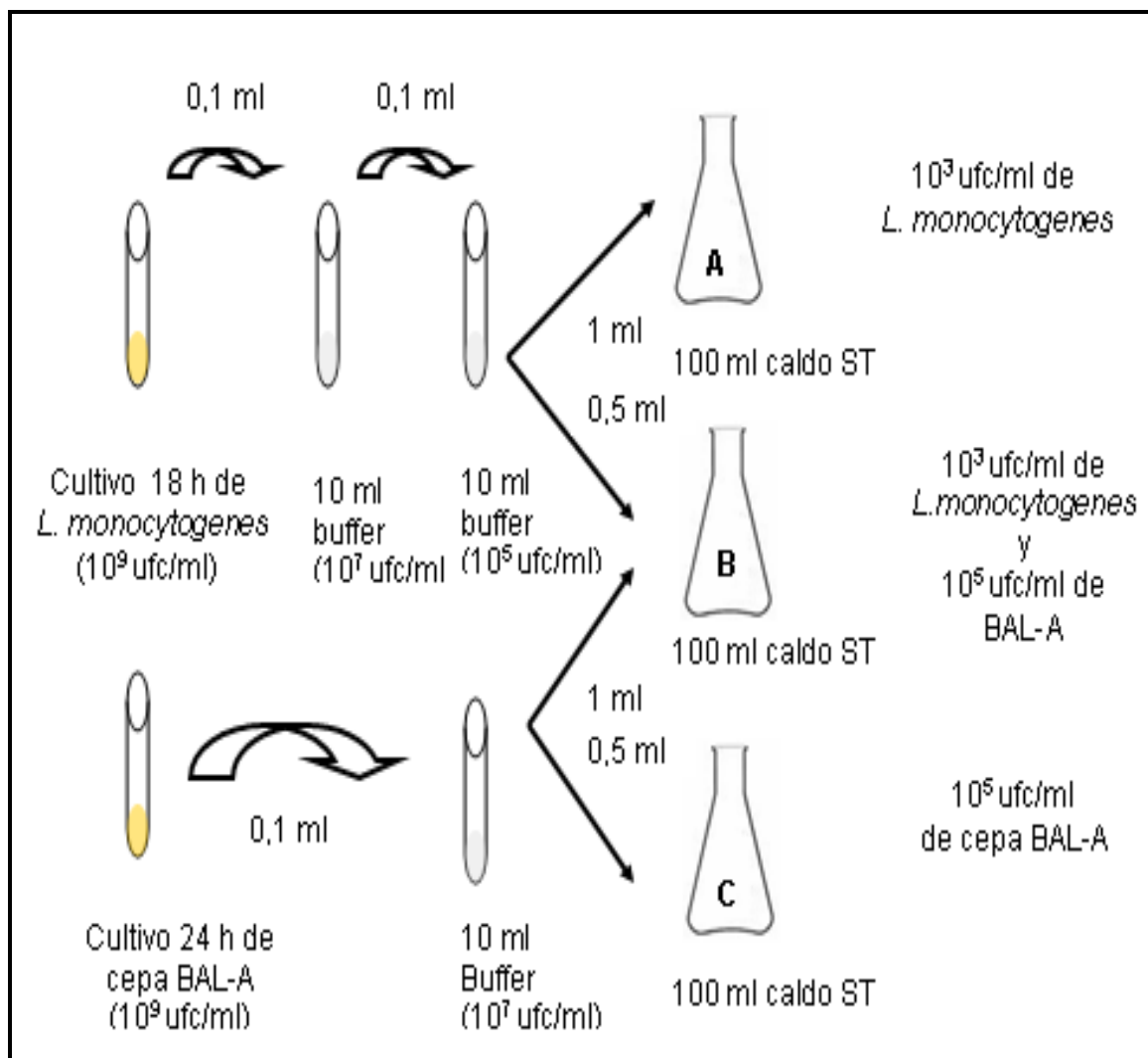


FIGURA 6 Esquema de inoculación para las pruebas de cocultivo de *L. monocytogenes* y la cepa BAL-A, a 25°C .

Análisis estadístico. Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante el análisis de varianza multifactorial con un nivel de confianza del 95 %. Se analizó el efecto antagonista de la cepa BAL-A frente a las dos cepas de *L. monocytogenes*, a pH 5,0, 5,5 y 6,5. Al registrarse diferencias significativas entre los recuentos de los tratamientos control y con cepa láctica (BAL-A) se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se utilizó el software statgraphics 5.1 plus para el análisis de los resultados.

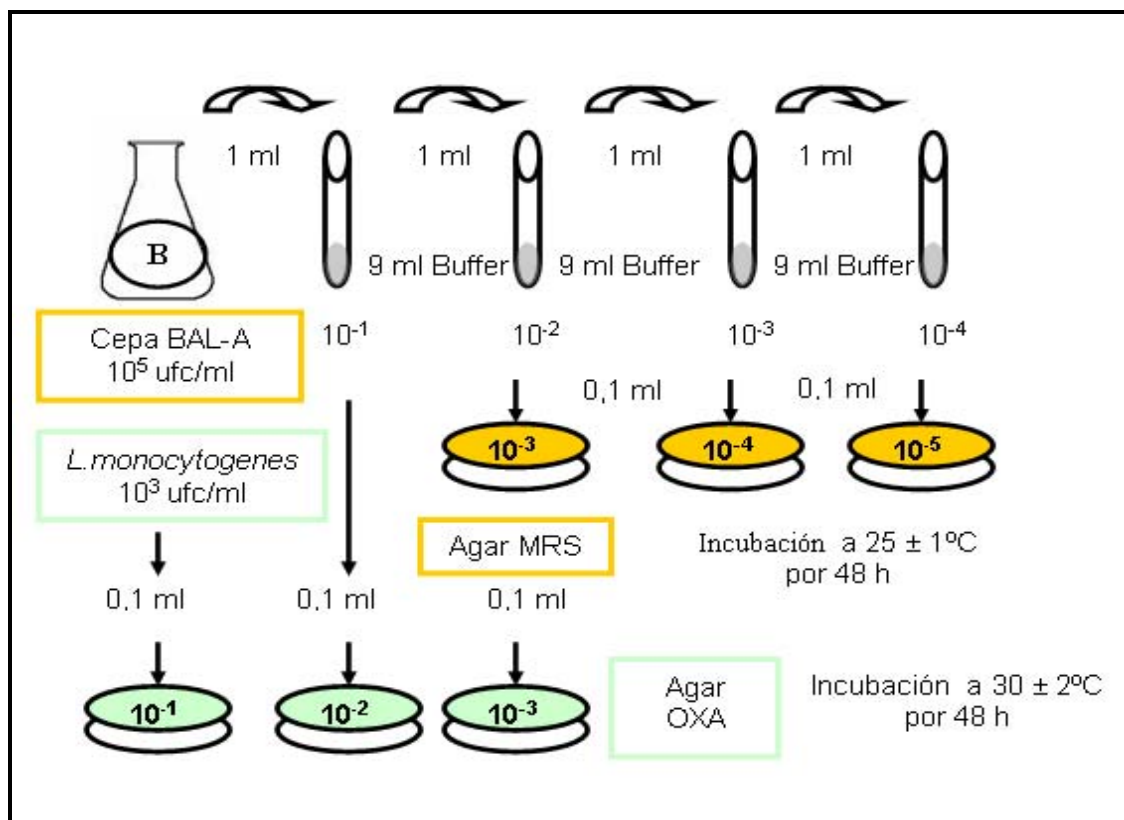


FIGURA 7 Esquema para el recuento en placa, de *L. monocytogenes* y la cepa BAL-A, del cocultivo al tiempo cero.

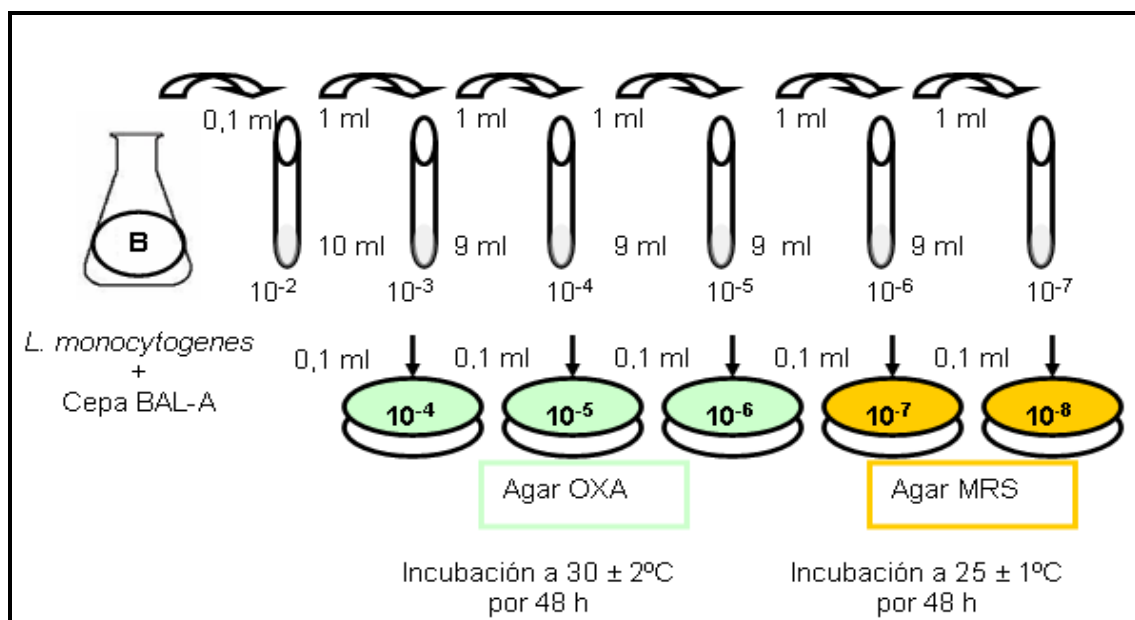


FIGURA 8 Esquema para el recuento en placa, de *L. monocytogenes* y la cepa BAL-A, del cocultivo a las 24, 48 y 72 h.

3.6 Cocultivo en caldo ST para dos cepas de *L. monocytogenes* con dos concentraciones de NaCl, a 25°C.

Para el estudio del efecto antagonista de la cepa BAL-A frente a *Listeria*, se preparó el medio del cocultivo con caldo ST, ajustando el pH a 6,0 con solución tampón de buffer fosfato 20mM ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$). Se ajustó a este pH para simular las condiciones del salmón ahumado en frío. Además se adicionó NaCl (1,5 %, 3,0 % y 6,0 % P/V) al medio de cultivo, concentraciones utilizadas en salmón ahumado en frío. Para la preparación de éste se tomó en cuenta la cantidad de NaCl del caldo Soya Trypticasa, para así obtener las concentraciones requeridas de sal (ANEXO 2.3). Se inocularon las cepas de *Listeria* y de cepa láctica, de un cultivo en caldo ST de 18 h y 24 h, respectivamente, en matraces con 100 ml de caldo ST a pH 6,0 (FIGURA 5) incubados en un agitador orbital a $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ y 110 rpm por 72 h. Para verificar las concentraciones iniciales se realizó el recuento en placa (FIGURA 7) en agar OXA para *Listeria* y en agar MRS para la cepa láctica, incubadas a $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y a $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Ambas cepas se incubaron por 48 h. Los recuentos se realizaron cada 24 h y en cada uno se verificó el pH de los matraces con papel indicador de pH. Cada experimento se realizó en triplicado.

CUADRO 1 Diseño experimental para dos pruebas de cocultivos (3.5 y 3.6)

Ensayo	Variables	Niveles	Respuesta estudiada
Diseño factorial 2^3	pH	3 niveles de pH	Recuento <i>L. monocytogenes</i>
	NaCl	3 niveles de sal (p/V)	
	<i>L. monocytogenes</i>	3 cepas	

Análisis estadístico. Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante el análisis de varianza multifactorial con un nivel de confianza del 95 %. Se analizó el efecto antagonista de la cepa BAL-A frente a las dos cepas de *L. monocytogenes*, a 1,5 %, 3,0 % y 6,0 % NaCl. Al registrarse diferencias significativas entre los recuentos de los tratamientos control y con cepa láctica (BAL-A) se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey, mediante el software statgraphics 5.1 plus.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Prueba de antagonismo indirecto: cepa BAL-A productora de STB frente a nueve cepas de *L. monocytogenes* y una de *L. innocua*

De las 10 cepas de *Listeria* estudiadas, todas presentaron sensibilidad frente a la STB de BAL-A al presentar halos de inhibición de diferentes tamaños (FIGURA 9 y ANEXO 3), lo que revela una actividad antagonista de la cepa BAL-A, frente a la cepa indicadora de *Listeria*. En el CUADRO 2, se presentan los halos de inhibición promedios obtenidos al medir la zona radial del halo (mm), donde la cepa de *L. monocytogenes* presentó el mayor halo de inhibición fue Lm ATCC 7644, con un promedio de $9,61 \pm 0,93$ mm, siendo la cepa más sensible junto a Lm ISP, la cual obtuvo un halo de inhibición promedio de $9,39 \pm 0,28$ mm. Entre las cepas de *Listeria* más resistentes se encuentran *L. innocua* con un halo promedio de $6,53 \pm 0,43$ mm y Lm 1/00 con un halo de inhibición promedio de $7,16 \pm 0,54$ mm.

Esta actividad antagonista de las bacteriocinas también fue estudiada por autores, como EIJSINK *et al.* (1998), quienes realizaron un estudio comparativo de cuatro bacteriocinas clase IIa (pediocin PA-1, enterocin A, sakacin P y curvacin A), donde *L. monocytogenes* fue sensible a las cuatro bacteriocinas y la sensibilidad fue diferente entre las 7 cepas de *L. monocytogenes*.

KATLA *et al.* (2003), también estudiaron la sensibilidad de 200 cepas de *L. monocytogenes*, siendo todas sensibles a las bacteriocinas estudiadas (sakacin P, sakacin A, pediocin PA-1 y nisina), aunque con diferencias en las susceptibilidades. BRILLET *et al.* (2004), demostraron la capacidad antagonista de cepas de *Carnobacterium* en contra de *L. monocytogenes*, las cuales fueron inhibidas por las tres bacteriocinas estudiadas (*C. divergens* V41, *C. piscícola* V1 y *C. piscícola* SF668), siendo *C. divergens* V41 la más eficiente en inhibir a *L. monocytogenes*. VIGNOLO *et al.* (2000), observaron que distintas cepas de *Listeria* difieren considerablemente en su sensibilidad a la nisina, lactocina 705 y enterocina CRL 35. Esta diferencia de sensibilidad entre cepas de *Listeria* también fue observada por SUAZO (2002), quien demostró que existían diferencias significativas entre cuatro cepas aisladas de salmón.

El análisis estadístico (ANDEVA) mostró diferencias significativa ($p < 0.05$) entre los halos de inhibición de las diferentes cepas de *Listeria* (ANEXO 4.1). La prueba de comparación múltiple de Tukey (ANEXO 4.2) arrojó que las cepas Lm ATCC 7644, Lm ISP, Lm 3/00 y Lm 82 fueron más sensibles que *L. innocua*, esto se ratifica al comparar las medias de la zona radial de los halos (ANEXO 4.3). En la FIGURA 11 se presentan a modo de ejemplo los halos de inhibición de Lm 82 frente a la STB de la cepa BAL-A.

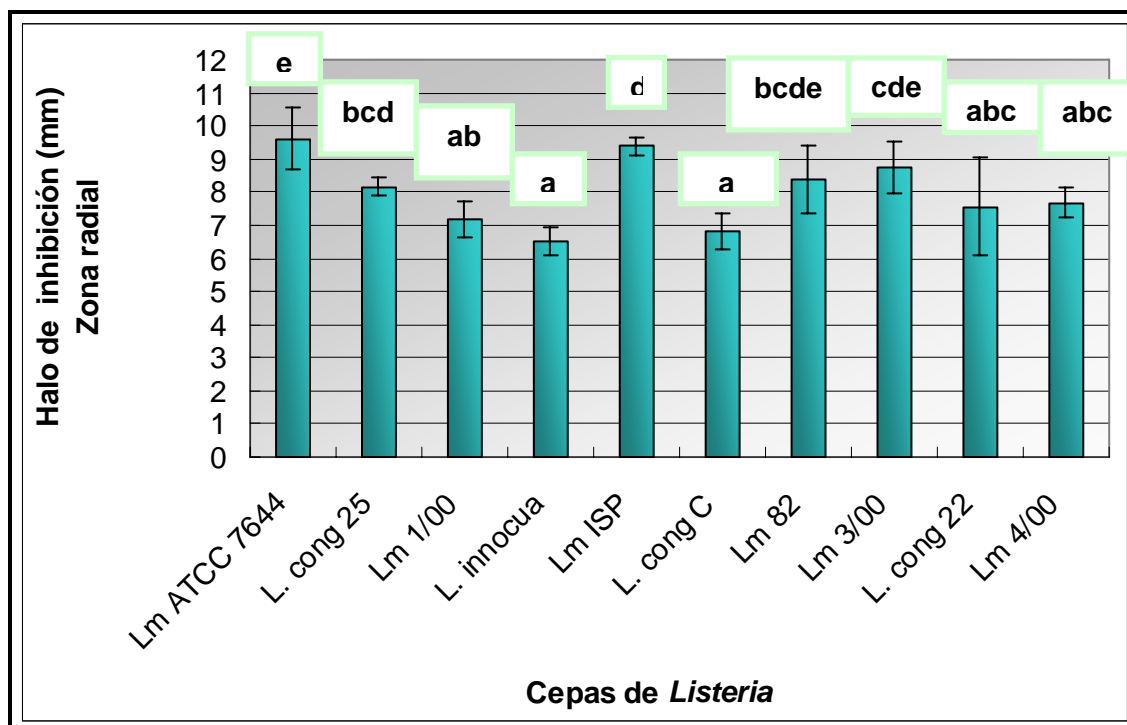


FIGURA 9 Prueba de antagonismo indirecto en agar MRS, con la cepa BAL-A frente a cepas de *Listeria*.

4.2 Prueba de gota sobre césped: sobrenadante de cepa BAL-A productora de STB frente a 10 cepas de *Listeria*

Al igual que el experimento anterior las 10 cepas de *Listeria* presentaron halos de inhibición al ser enfrentadas al sobrenadante de la cepa BAL-A (FIGURA 10). En el CUADRO 3 se presentan los halos de inhibición promedio obtenidos de tres mediciones del diámetro del halo (mm) (ANEXO 5). Las cepas más sensibles fue Lm 4/00 con un promedio de $18,72 \pm 0,65$ mm y Lm ISP con un halo promedio de $17,68 \pm 0,98$ mm. Esta última también fue la más sensible en la prueba de antagonismo indirecto, De acuerdo a este criterio se seleccionó la cepa Lm ISP y la cepa Lm 82 como cepas sensibles, para las pruebas posteriores.

En un estudio de CINTAS *et al.* (1998), *L. monocytogenes* fue inhibida por cuatro BAL productoras de bacteriocinas, aunque el mayor efecto antagonista fue obtenida por los extractos de *Pediococcus acidilactici* 2102 y *Enterococcus faecium* L50. GUYONNET *et al.* (2000), compararon las actividades de bacteriocinas clase IIa en contra de *Listeria* spp, siendo la cepa *L. ivanovii* BV6446 la más sensible. Esta diferencia en las actividades de las bacteriocinas en contra de *Listeria*, depende de la variedad estructural aminoacídica y orientación oblicua de la región C-terminal de las bacteriocinas (Bennik citado por ENNAHAR *et al.*, 2000), En el ANEXO 6.3 se comparan las medias de las zonas radiales de las 10 cepas de *Listeria* frente a la STB de la cepa BAL-A. El análisis estadístico (ANDEVA) mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los promedios de los halos de inhibición de las diferentes cepas (ANEXO 6.1). La prueba de comparación múltiple de Tukey (ANEXO 6.2) indicó que la cepa Lm

4/00, Lm ISP, L. con 22 y Lm ATCC 7644 fueron más sensible que L. cong 25, L. innocua, L. cong C, Lm 82, Lm 1/00 y Lm 3/00.

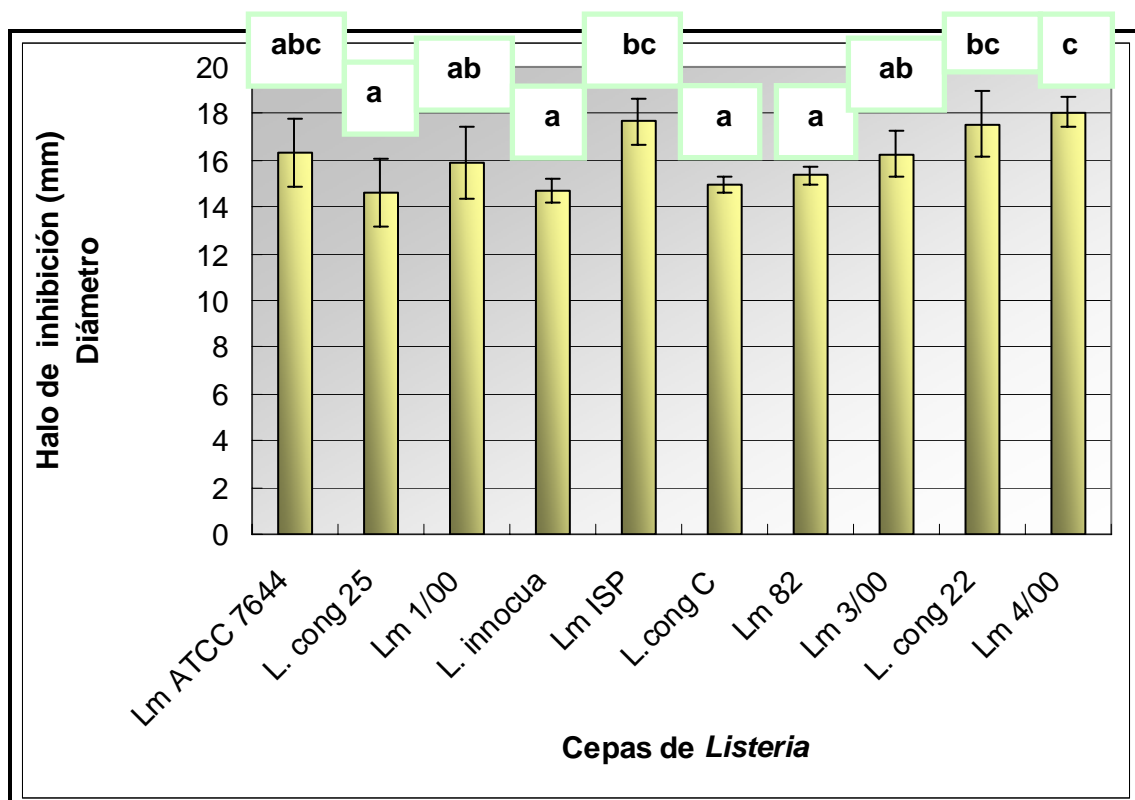


FIGURA 10 Prueba de la gota sobre césped sobre agar MRS del sobrenadante de la cepa BAL-A.

CUADRO 2 Prueba de antagonismo indirecto en agar MRS con la cepa BAL-A frente a 10 cepas de *Listeria*.

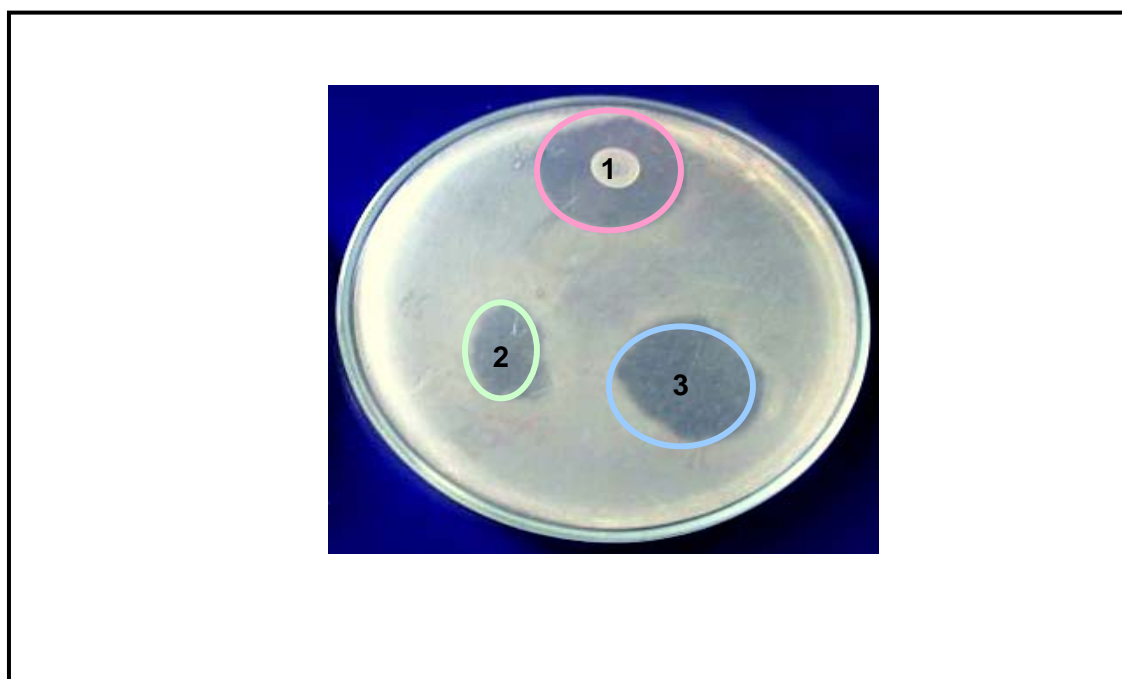
Cepas <i>Listerias</i>	Origen	Zona radial (mm)
Lm ATCC 7644	(Centro Análisis de Alimento, ULA, 2005)	9,61 ± 0,93 ¹
L. cong 25	(Díaz, 2004)	8,15 ± 0,26
Lm 1/00	(Suazo, 2002)	7,16 ± 0,54
L. innocua	(Inst. Med. Prev. Vet., UACH)	6,53 ± 0,43
Lm ISP	(Tecnolab)	9,39 ± 0,28
L. cong C	(Díaz, 2004)	6,80 ± 0,55
Lm 82	(Food and Drug Administration, EEUU)	8,40 ± 1,03
Lm 3/00	(Suazo, 2002)	8,74 ± 0,78
L. cong 22	(Díaz, 2004)	7,55 ± 1,48
Lm 4/00	(Rodríguez, 2002)	7,68 ± 0,44

¹⁾ Valor promedio del triplicado de tres repeticiones

CUADRO 3 Prueba de gota sobre césped en agar MRS con sobrenadante de la cepa BAL-A frente a 10 cepas de *Listeria*.

Cepas <i>Listerias</i>	Origen	Diámetro (mm)
Lm ATTC 7644	(Centro Análisis de Alimento, ULA, 2005)	16,33 ± 1,45 ¹
L. cong 25	(Díaz, 2004)	14,63 ± 1,47
Lm 1/00	(Suazo, 2002)	15,88 ± 1,56
L. innocua	(Inst. Med. Prev. Vet., UACH)	14,68 ± 0,52
Lm ISP	(Tecnolab)	17,68 ± 0,98
L. cong C	(Díaz, 2004)	14,96 ± 0,38
Lm 82	(Food and Drug Administration, EEUU)	15,37 ± 0,38
Lm 3/00	(Suazo, 2002)	16,22 ± 0,94
L. cong 22	(Díaz, 2004)	17,56 ± 1,42
Lm 4/00	(Rodríguez, 2002)	18,72 ± 0,65

¹) Valor promedio del triplicado de tres repeticiones



¹ Antagonismo indirecto

² Control BAL-A

³ Control BAL-B

FIGURA 11 Prueba de antagonismo indirecto y gota sobre césped de Lm 82.

4.3 Prueba de antagonismo indirecto y gota sobre césped: desarrollo de resistencia de Lm ISP y Lm 82 a la STB de la cepa láctica BAL-A

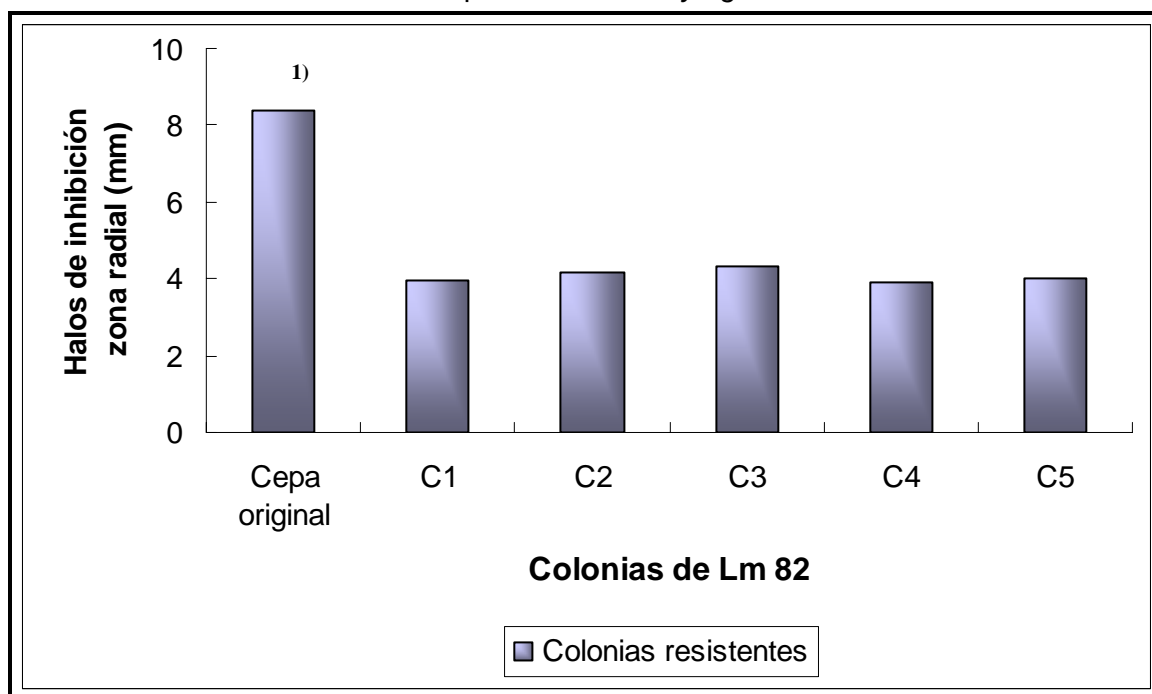
A partir de 5 colonias resistentes aisladas de los halos de inhibición formados por las cepas madres en las pruebas de antagonismo (4.1) se estudió la estabilidad de la resistencia frente a la STB de la cepa BAL-A. Después de 5 repiques en caldo ST de cada colonia resistente se realizó la prueba de antagonismo en placa y se midieron los halos de inhibición. Los resultados de esta prueba se presentan en el ANEXO 7,

donde se observa una alta sensibilidad de las cepas madres en las pruebas de antagonismo en placa (4.1), con zonas radiales de 8,40 y 9,39 mm para Lm 82 y Lm ISP, respectivamente. Los halos de inhibición en la prueba de gota sobre césped (4.2) fueron de 15,37 mm para Lm 82 y 17,68 mm para Lm ISP.

En la FIGURA 12 se observa el promedio del tamaño de los halos de inhibición formados por las colonias resistentes de Lm 82, las cuales tuvieron un promedio inferiores a los cultivos madres con $4,07 \pm 0,56$ mm de zona radial, en la prueba de antagonismo indirecto. Por el contrario en la prueba de gota sobre césped se observó presencia de halos de inhibición sólo en 2 colonias, con un promedio de $13,89 \pm 0,61$ mm de diámetro (FIGURA 13).

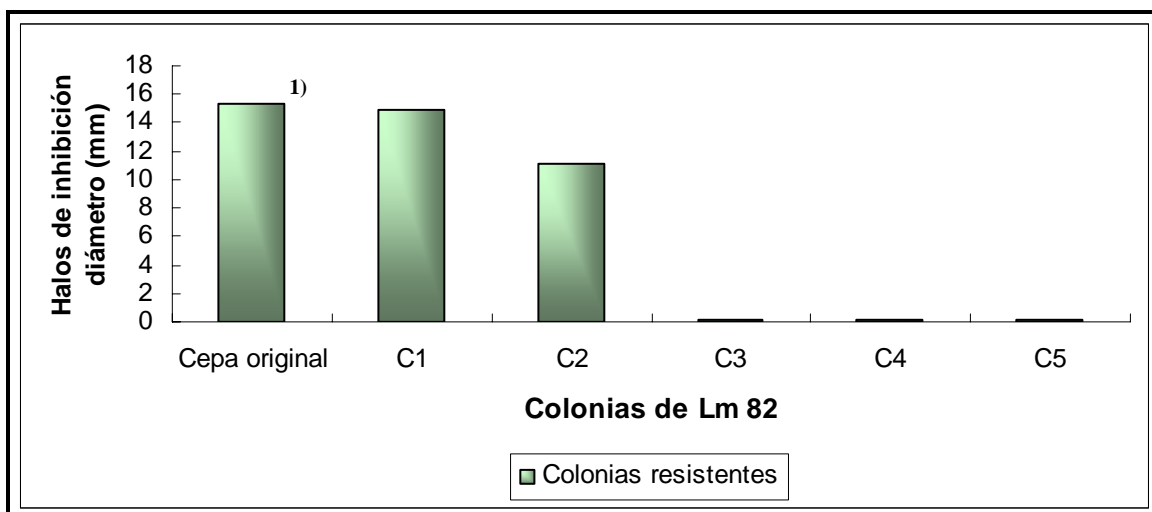
GRAVESEN *et al.* (2002), estudiaron la resistencia 8 mutantes de *L. monocytogenes* y observaron que el mecanismo para ello era debido a los 2 cambios en la expresión del sistema fosfotransferasa (PTS), mecanismo de transporte de nutrientes, específicamente de azúcares. RAMNATH *et al.* (2000), también correlacionaron los cambios en la expresión PTS con el desarrollo de resistencia de *L. monocytogenes* a la bacteriocina clase IIa. Otro mecanismo de resistencia sugerido por VADYVALOO *et al.* (2002), fue la adaptación de la membrana, por aumento de niveles de desaturación y de la cadena fosfatidilglycerol, lo que provoca la biosíntesis de fosfolípidos en la célula.

En el estudio de VIGNOLO *et al.* (2000), encontraron frecuencia relativamente alta a la resistencia de 10^{-4} a 10^{-3} en dos cepas de *L. monocytogenes*.



¹⁾ Valores corresponden al promedio de 3 repeticiones

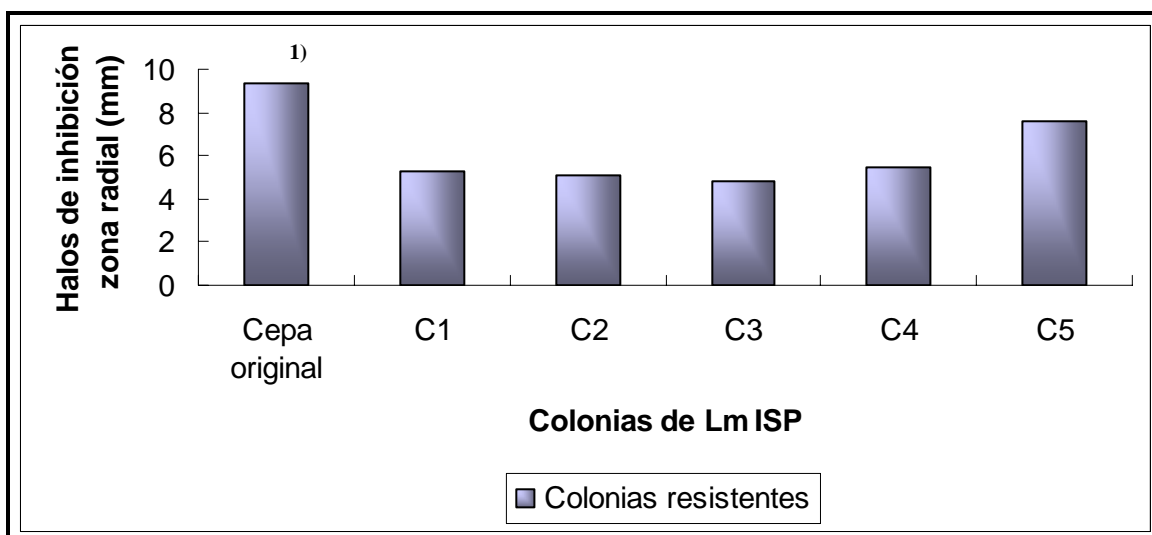
FIGURA 12 Prueba de antagonismo indirecto: cepa láctica productora de bacteriocina frente a cinco colonias resistentes de *Listeria* Lm 82, a $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.



¹⁾ Valores corresponden al promedio de 3 repeticiones

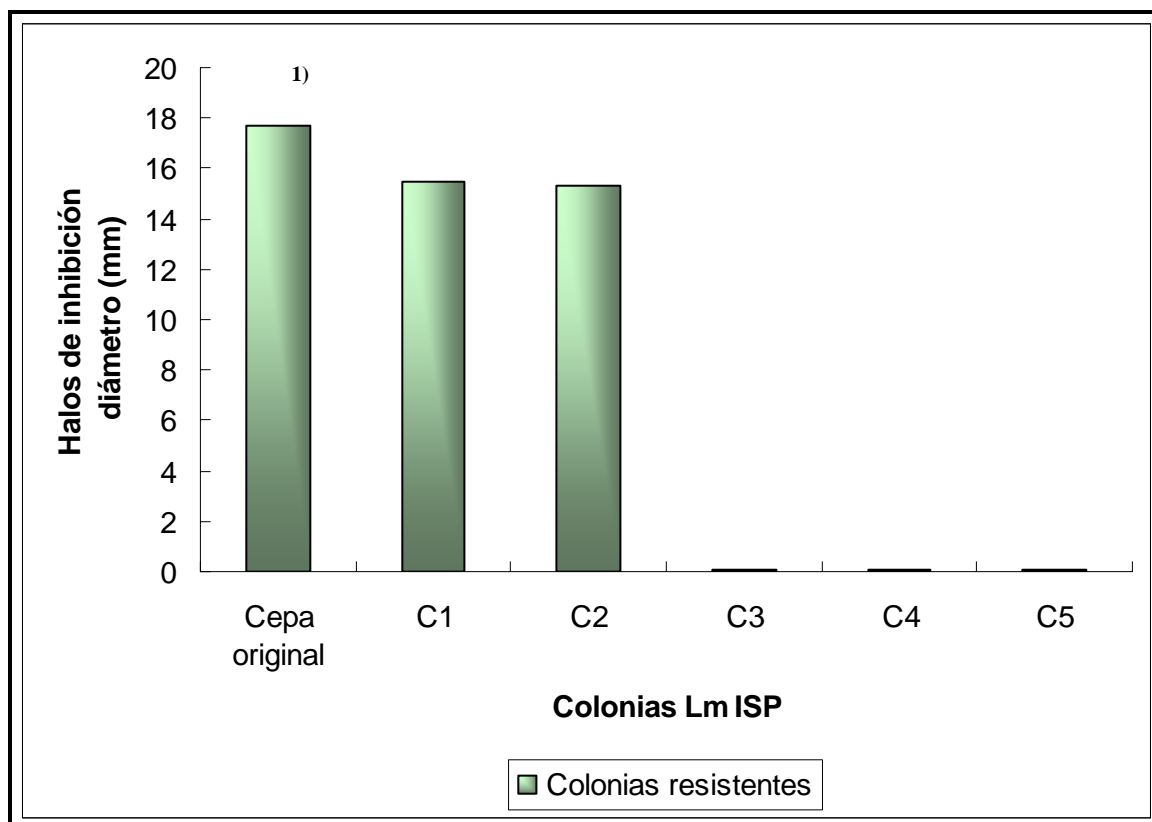
FIGURA 13 Prueba de gota sobre césped: sobrenadante neutralizado de cepa BAL-A frente a cinco colonias resistentes de *Listeria* Lm 82, a 25 °C ± 1 °C.

Con respecto a las 5 colonias resistentes de Lm ISP en la prueba de antagonismo indirecto, se observa presencia de halos de inhibición con un promedio 5,73 ± 0,61 mm de zona radial (FIGURA14), ésta prueba también mostró zonas radiales más pequeños que la cepa original. En la prueba de gota sobre césped se observó la resistencia de 3 colonias de Lm ISP (FIGURA 15) con un promedio de 15,44 ± 0,71 mm de diámetro. Por lo cual se puede señalar resistencia similar entre ambas cepas.



¹⁾ Valores corresponden al promedio de 3 repeticiones

FIGURA 14 Prueba de antagonismo indirecto: cepa láctica productora de bacteriocina frente a cinco colonias resistentes de *Listeria* Lm ISP, a 25 °C ± 1 °C.



¹⁾ Valores corresponden al promedio de 3 repeticiones

FIGURA 15 Prueba de gota sobre césped: sobrenadante neutralizado de cepa BAL-A frente a cinco colonias resistentes de *Listeria* Lm ISP, a 25 °C ± 1 °C.

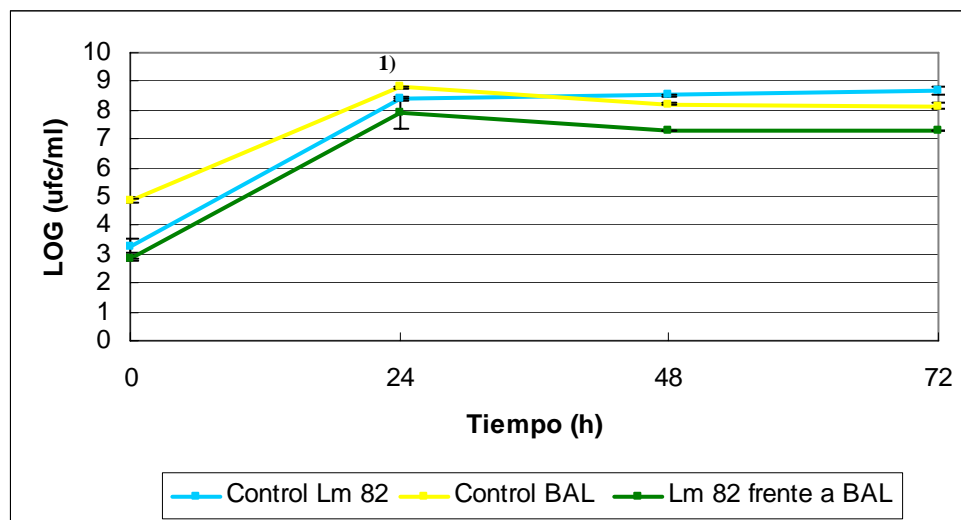
4.4 Prueba de cocultivo en caldo ST para Lm 82 y Lm ISP, frente a la cepa BAL-A a dos niveles de pH

La cepa láctica productora de bacteriocina fue cultivada con Lm 82 y Lm ISP, en forma separada, a dos condiciones de pH 5,5 y 6,5. Para determinar a cual pH las dos cepas de *L. monocytogenes* eran más sensibles (mayor inhibición) a la STB de la cepa BAL-A (cada 24 h) se realizó recuento en placa obteniéndose los resultados que se señalan a continuación.

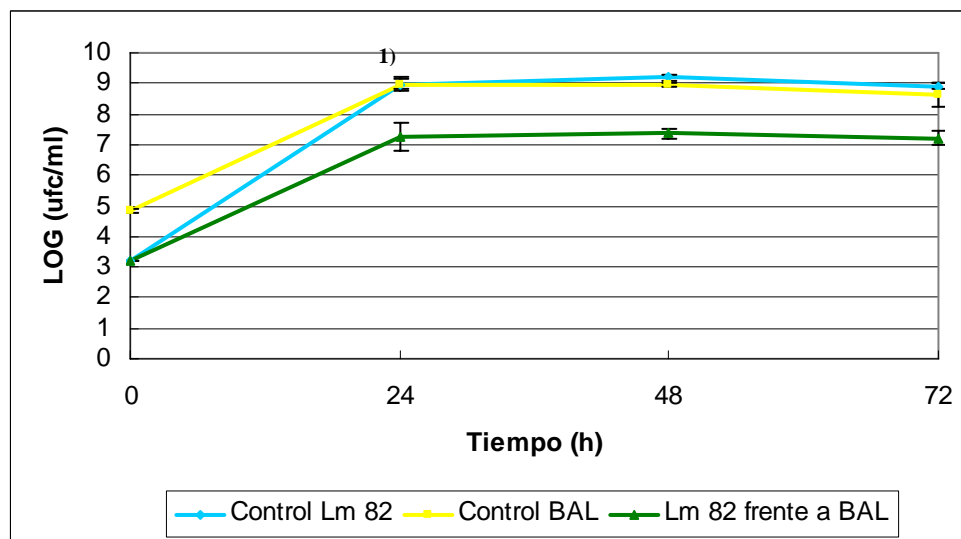
Lm 82 (FIGURA 16) y Lm ISP (FIGURA 17) tuvieron un aumento de 5 ciclos log entre 0 y 24 h, sin embargo, en los cocultivos no alcanzaron los recuentos de los controles de *L. monocytogenes*. Se puede señalar, por lo tanto, que la cepa BAL-A liberó suficiente sustancia antagonista al caldo para causar la inhibición de *L. monocytogenes*, a partir de las 24 h.

LAMA (2002), observó que la producción de la bacteriocina de *C. piscicola* L103 alcanzó su máxima actividad al inicio de la fase estacionaria en la curva de crecimiento, lo cual coincide con la etapa de inhibición observada en este trabajo.

a) pH 5,5



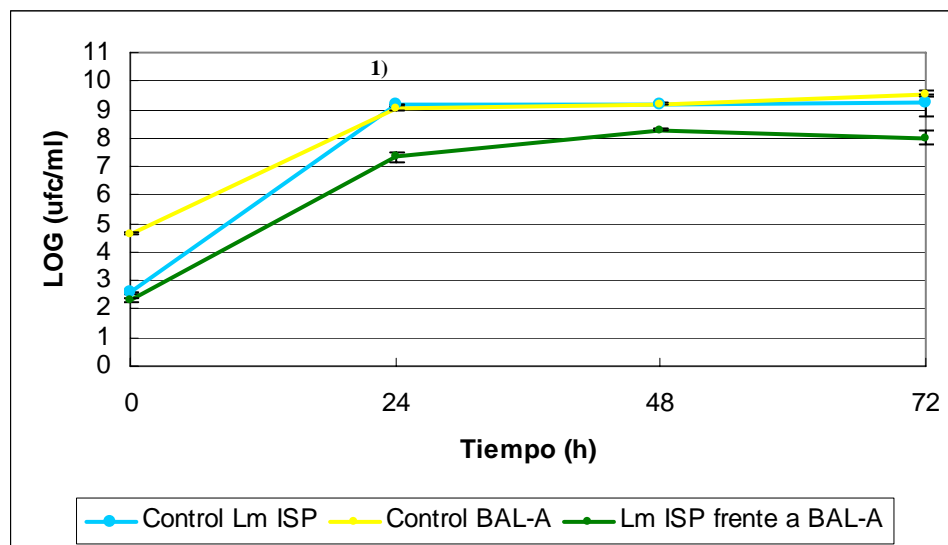
b) pH 6,5



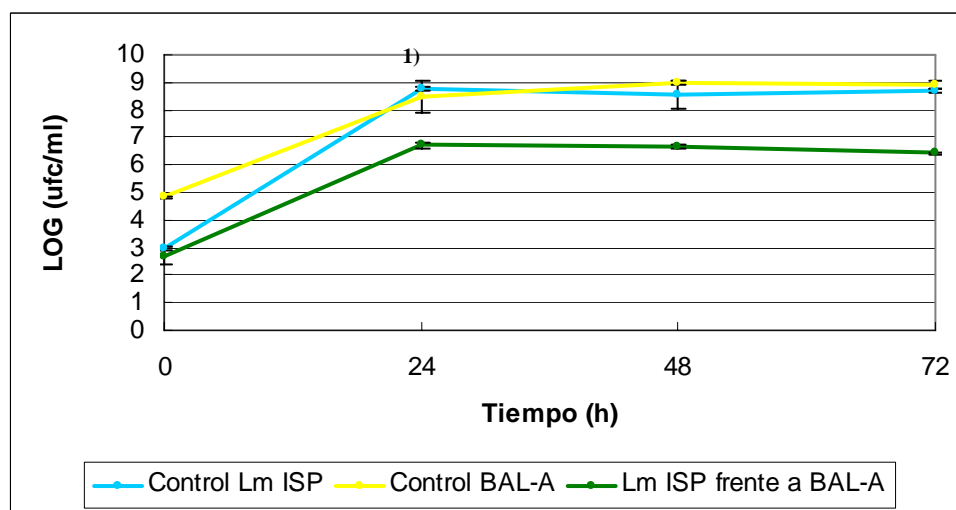
¹⁾ Valores corresponden al promedio de 3 repeticiones

FIGURA 16 Antagonismo de cepa BAL-A en cocultivo con Lm 82 a dos niveles de pH en caldo ST, a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

a) pH 5,5



b) pH 6,5



¹⁾ Valores corresponden al promedio de 3 repeticiones

FIGURA 17 Antagonismo de cepa BAL-A en cocultivo con Lm ISP a dos niveles de pH en caldo ST, a 25 °C ± 1°C.

El control de Lm 82 alcanzó su máximo desarrollo a las 48 h (ANEXO 8) a pH 6,5 de log 9,19 ufc/ml, en cambio a pH 5,5 llegó a log 8,67 ufc/ml a las 72 h. En el cocultivo se observó un mayor efecto antagonista a pH 6,5, que a pH 5,5 con 1,97 ciclos logarítmicos menos que la cepa control (ANEXO 9.4). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el control y el cocultivo para ambos pH a partir de las 24 h (ANEXO 9)

La cepa Lm ISP en el control tuvo mayor desarrollo a pH 5,5 que a pH 6,5 (FIGURA 17), alcanzando recuentos de log 9,22 ufc/ml a las 72 h (ANEXO 10). En el cocultivo también se observó un mayor efecto antagonista a pH 6,5 (ANEXO 11.4), tal como ocurrió para la cepa Lm 82. Sin embargo, sobre la cepa Lm ISP el efecto de la cepa BAL-A fue mayor, ya que hubo diferencias de 2,3 ciclos logarítmicos entre el control y el cocultivo a las 72 h de incubación. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los recuentos control y con cepa BAL-A para pH 5,5 y pH 6,5, a partir de las 24 h (ANEXO 11)

Para ambas cepas de *Listeria* el efecto en el cocultivo fue bacteriostático a partir de las 24 h de incubación. En el estudio de SILVA (2004), la STB de *Carnobacterium* también presentó un efecto bacteriostático sobre *L. monocytogenes*, de la misma forma VELÁZQUEZ (2006), observó que la cepa *Carnobacterium* tuvo un efecto bacteriostático sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* L4/00 a 2,0°C y a 4,6°C en salmón ahumado en frío envasado al vacío.

Se debe mencionar que en el cocultivo de la cepa Lm 82 a pH 5,0, no se observó crecimiento de ésta y tampoco de la cepa BAL-A en ninguno de los tratamientos, al no presentarse turbidez en los matraces. Además se realizó recuento en placa en el cual no hubo desarrollo para ambas cepas. Por otra parte el caldo ST no presentó variaciones de pH, permaneciendo en el rango permitido de cada pH estudiado. El pH del medio de cultivo es un factor importante de considerar, para obtener una mayor producción de bacteriocina. SCHILLINGER y STILES (1993), observaron que en un medio de cultivo a pH inicial de 5,0 no hubo producción de bacteriocina por parte de *C. piscicola* LV61, pero cuando el pH del medio fue modificado a 6,5 hubo presencia de niveles altos de bacteriocina.

NUÑEZ **et al.** (1996), observaron el efecto producido por el agregado de nisina sobre *Lactobacillus fructivorans*, con recuentos iniciales de $1,7 \times 10^8$ ufc/ml, a las 24 h el número de microorganismos presentes fue menor a 10^3 ufc/ml. El modo de acción de nisina según los autores fue bactericida, contrario a este experimento donde el modo de acción de BAL-A solo fue bacteriostático. LOESSNER **et al.** (2003), observaron una inhibición de *L. plantarum* sobre *L. monocytogenes* de dos ciclos logarítmicos. NILSSON **et al.** (2004) estudiaron la inhibición de *L. monocytogenes* en un cocultivo con *Carnobacterium piscicola* A9b, logrando una reducción de 6 ciclos logarítmicos comparado con el control de *Listeria*,

En la FIGURA 18 se muestran los recuentos de *L. monocytogenes* y la cepa BAL-A, en placas con agar OXA y placas con agar MRS respectivamente, en las pruebas de cocultivo.

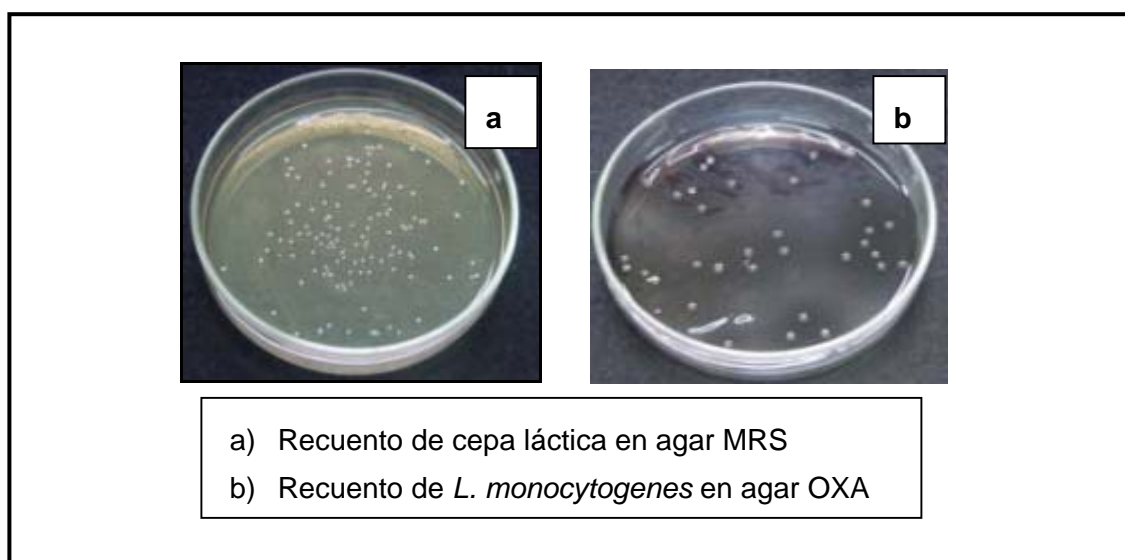


FIGURA 18 Recuentos en pruebas de cocultivo, a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

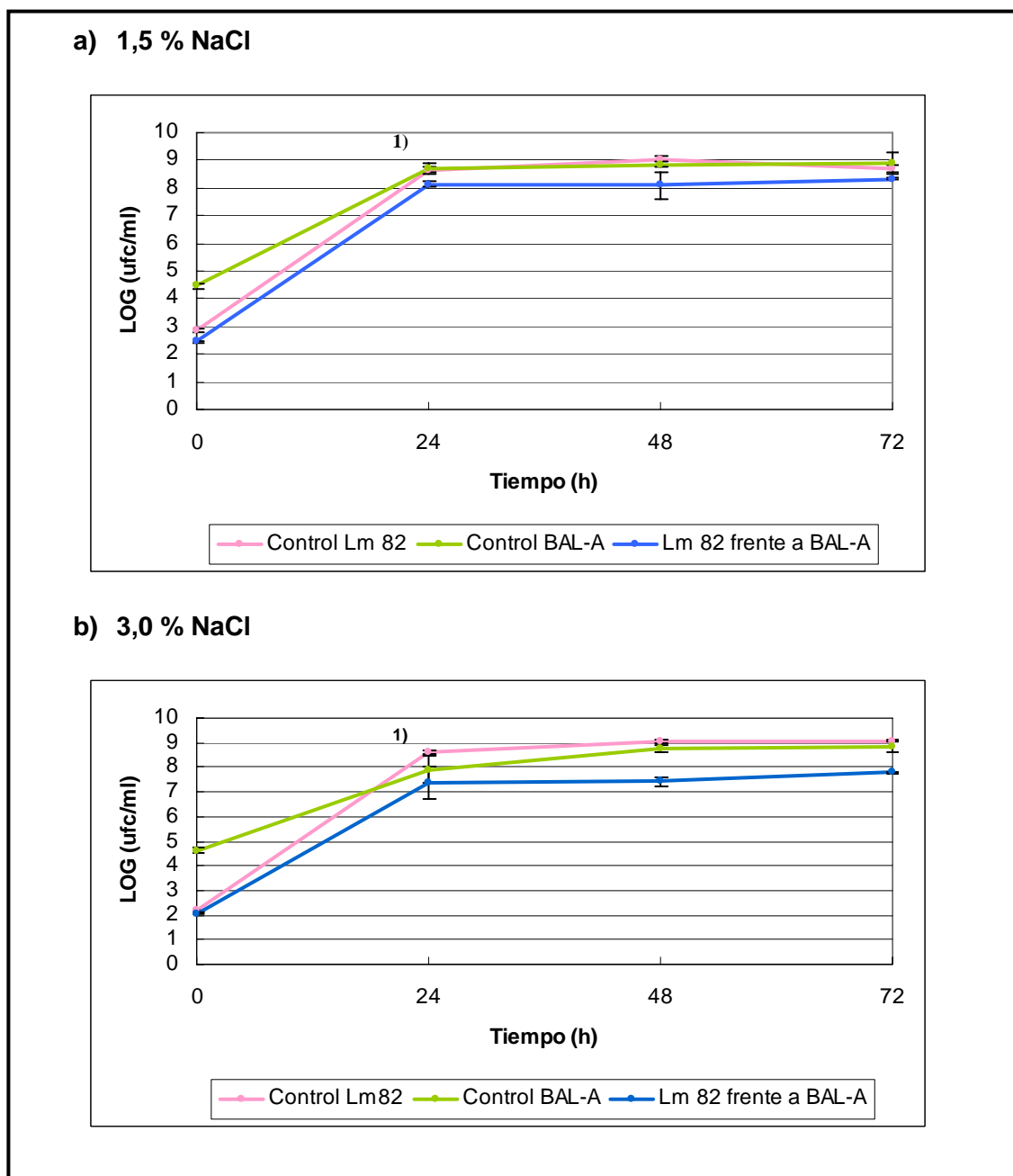
4.5 Prueba de cocultivo en caldo ST para Lm 82 y Lm ISP, frente a la cepa BAL-A a dos niveles de NaCl (1,5 % y 3,0%), a pH 6,0

Se agregó cloruro de sodio como una nueva barrera a *L. monocytogenes*, para potenciar el efecto bacteriostático de la STB de la cepa BAL-A. Se trabajó a pH 6,0, para simular las condiciones del salmón ahumado en frío.

Se observa en la FIGURA 19 que Lm 82 en el cocultivo no alcanzó el desarrollo obtenido en el control de $\log 9,02$ ufc/ml a las 48 h, llegando solo a un recuento, de $\log 7,38$ ufc/ml en presencia de 3 % NaCl, el cual fue menor que el alcanzado con 1,5 % NaCl (ANEXO 12). Ello indica un mejor efecto de la cepa BAL-A en el cocultivo con 3% NaCl (ANEXO 13.4). MARTIN (2002), observó que al aumentar la concentración de NaCl, el efecto antagonista de las STB sobre *L. monocytogenes* fue significativamente mayor, al igual que en esta investigación donde la reducción fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$), entre los recuentos control y con cepa BAL-A a 1,5 % NaCl y 3,0 % NaCl, a partir de las 24 h (ANEXO 13). GOMEZ (2002), también observó un efecto sinérgico favorable del cloruro de sodio con la STB de la cepa *C. piscicola* L103. Este efecto antagonista podría ser reforzado a temperaturas de refrigeración, como en el estudio de MARTIN (2002), quien observó que la combinación de NaCl y una STB, sobre *L. monocytogenes* fue significativamente mayor ($p < 0,05$) a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con respecto al obtenido a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. THURETTE *et al.* (1998), observaron que la combinación de 4 % NaCl y humo inhibió el desarrollo de *L. monoctogenes*.

En la FIGURA 20 se observa que para la cepa Lm ISP en el cocultivo tampoco se obtuvo los recuentos del control de $\log 8,84$ ufc/ml, a las 48 h llegando a un recuento de $\log 7,22$ ufc/ml en presencia de 1,5 % NaCl, lo cual fue inferior que los alcanzados en el cocultivo con 3,0 % NaCl (ANEXO 15.4). En el cocultivo con 1,5 % NaCl (ANEXO 14) al tiempo 24 h hubo una inhibición de 1,6 ciclos logarítmicos en la cepa Lm 82 con respecto a su control. Esta reducción fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre los recuentos control y con cepa BAL-A para 1,5 % NaCl y 3,0 % NaCl a partir de las 24 h (ANEXO 15). BOUTTEFROY *et al.* (2000), observaron que la acción de Nisina (50

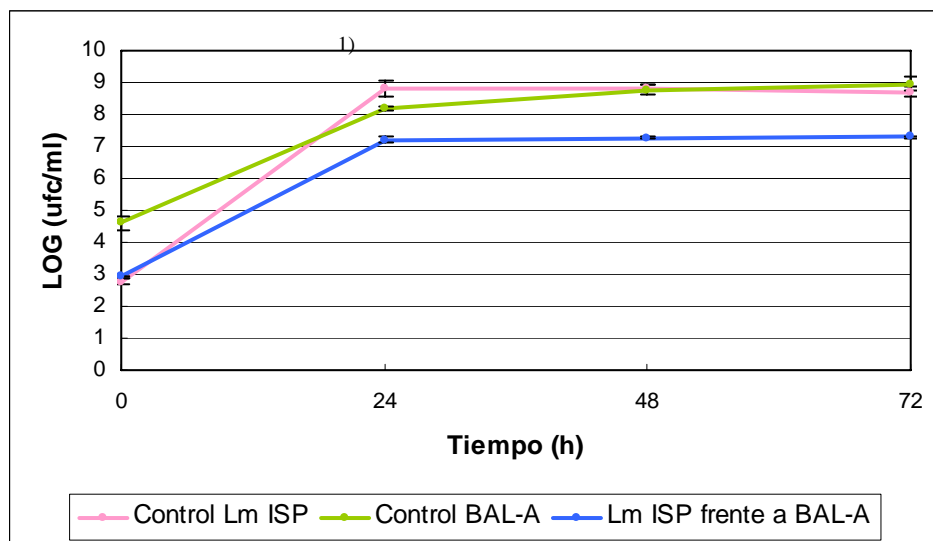
I.U./ml) disminuyó en presencia de 2 % y 4 % de NaCl. De la misma forma HAN-SHIN y RASCO (2007), observaron una disminución de 1,62 ciclos logarítmicos con respecto a la concentración inicial de *L. monocytogenes*, en presencia de bajos niveles de sal, siendo estadísticamente diferente ($p < 0,05$), respecto a niveles más altos de sal.



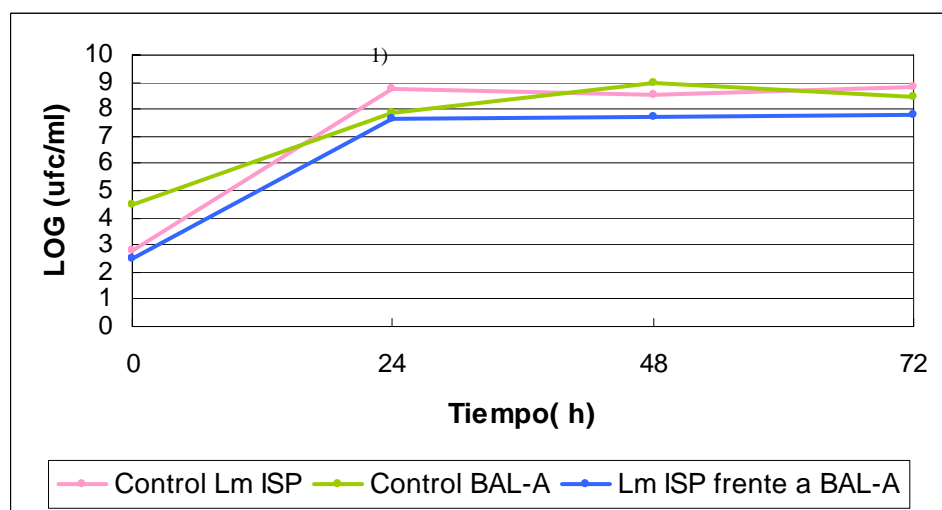
¹⁾ Valores corresponden al promedio de 3 repeticiones

FIGURA 19 Antagonismo de cepa BAL-A en cocultivo con Lm 82 a dos niveles de NaCl en caldo ST a 25 °C ± 1 °C y pH 6,0.

a) 1,5 % NaCl



b) 3,0 % NaCl



¹⁾ Valores corresponden al promedio de 3 repeticiones

FIGURA 20 Antagonismo de cepa BAL-A en cocultivo con Lm ISP a dos niveles de NaCl en caldo ST a 25 °C ± 1 °C y pH 6,0.

NILSSON **et al.** (2004), estudiaron la interacción entre *L. monocytogenes* y *C. piscicola* A9b en un cocultivo con 4 % NaCl a 5 °C, donde la presencia de una alta concentración inicial de *C. piscicola* A9b (10^6 ufc/ml) logró reducir los recuentos de *Listeria* en dos ciclos logarítmicos comparado, con su control después de 8 días de incubación.

LEROY y VUYST (1999), observaron que la presencia de sal redujo la producción de bacteriocina por *Lactobacillus sakei*. A medida que la concentración aumentó las células crecieron más lentamente y la producción de biomasa comenzó a bajar su eficiencia. De la misma forma Sakacin K disminuyó drásticamente su actividad en la presencia del aumento de las concentraciones de sal. En la investigación de HIMELBLOOM **et al.** (2001), también observaron que la producción de bacteriocina disminuyó inversamente con el aumento en la concentración de sal.

Cabe mencionar que en el cocultivo a 6 % NaCl, no hubo crecimiento de la cepa láctica y tampoco de *L. monocytogenes*. Según VIGNOLO **et al.** (1995), el crecimiento de bacterias ácido láctica aumentó en la presencia de bajas concentraciones de cloruro de sodio (1 % y 2 % p/v), pero fue claramente inhibido en presencia de concentraciones mayores a 3% NaCl.

HIMELBLOOM **et al.** (2001), observaron que la producción máxima de bacteriocina no fue afectada a 1 % y 3 % NaCl, pero el aumento de sal a 7 %, redujo la producción de bacteriocina de la cepa láctica *Carnobacterium piscicola* A9b.

Un similar efecto de inhibición de NaCl fue observado por VERLUYTEN **et al.** (2004), donde un 2 % (p/v) NaCl no presentó un efecto negativo sobre la producción de curvacin A, en cambio al aumentar la concentración de sal afectó tanto el crecimiento de *Lactobacillus curvatus* como la actividad de la bacteriocina.

5 CONCLUSIONES

- En las pruebas de antagonismo indirecto y gota sobre césped se observaron diferencias significativas en la inhibición ($p < 0,05$) entre las nueve cepas de *L. monocytogenes* y una de *L. innocua*, al ser enfrentadas a la sustancia tipo bacteriocina de la cepa BAL-A.
- Las cepas de *L. monocytogenes* desarrollaron resistencia frente a la STB de la cepa BAL-A. Esta resistencia se mantuvo después de cinco traspasos para ambas cepas.
- En el cocultivo de la cepa BAL-A frente a dos cepas de *L. monocytogenes*, seleccionadas por su mayor sensibilidad, se observó un efecto bacteriostático a partir de las 24 h, a pH 5,5 y 6,5.
- Se obtuvo un mejor efecto de la cepa BAL-A a pH 6,5, que a pH 5,5 sobre ambas cepas de *Listeria*, con diferencias ($p < 0,05$) en los recuentos entre los controles y los cocultivos.
- La concentración de sal hasta un 3 % no influyó en la producción de STB de BAL-A, y su efecto sobre *L. monocytogenes* dependió de la cepa y de la concentración de sal utilizada.
- El efecto de la concentración de sal (1,5 % o 3,0 %) sobre *L. monocytogenes*, dependió de la cepa estudiada.

6 RESUMEN

En esta investigación se trabajó con nueve cepas de *L. monocytogenes* y una *Listeria innocua*, además de la cepa BAL-A productora de una sustancia tipo bacteriocina (STB), las cuales fueron aisladas de salmón ahumado en frío.

Para conocer el efecto antagonista de la cepa BAL-A frente a distintas cepas de *Listeria*, se realizó la prueba de antagonismo indirecto y la técnica gota sobre césped. Las cepas de *Listeria* presentaron desarrollo de colonias resistentes en el interior de los halos de inhibición. Para verificar la persistencia de la resistencia, 5 colonias de cada cepa de *L. monocytogenes* se repicaron en caldo ST durante 5 días, y al quinto día se realizó la prueba de antagonismo indirecto y gota sobre césped. Se observó que un 40 % de las colonias de ambas cepas se mantuvieron resistentes. De las 10 cepas de *Listeria* se seleccionaron 2, Lm ISP y Lm 82 para las pruebas de cocultivos a tres pH (5,0, 5,5 y 6,5) y se controló su viabilidad cada 24 h mediante recuento en placa sobre agar OXA para *L. monocytogenes* y en agar MRS para la cepa BAL-A. A pH 5,0 no hubo crecimiento tanto para las cepas de *L. monocytogenes* como para la cepa BAL-A. A pH 6,5 se presentó un efecto bacteriostático mayor que a pH 5,5 para Lm 82 y Lm ISP, con recuentos de ambas cepas inferiores en dos ciclos logarítmicos a partir de las 24 h, con respecto al control de *L. monocytogenes*, tendencia que se mantuvo hasta las 72 h. Además se realizó un cocultivo de ambas cepas de *Listeria* en caldo ST en forma separada frente a la cepa BAL-A productora de STB, con 1,5 %; 3,0 % y 6,0 % NaCl. En la última concentración no hubo desarrollo microbiano. Los recuentos en el cocultivo de Lm 82 y BAL-A a 3,0 % NaCl, fueron inferiores que a 1,5% NaCl. Logrando dos ciclos logarítmicos menos que su control. Por el contrario, el efecto antagonista de la cepa BAL-A frente a Lm ISP fue mayor con 1,5 % NaCl.

Bajo las factores ambientales utilizados en la industria del salmón, las STB de la cepa BAL-A son capaces de inhibir a *L. monocytogenes*, aunque podrían desarrollarse células resistentes.

SUMMARY

In this investigation nine strains of *L. monocytogenes* and one *Listeria innocua*, were tested against of bacteriocina like substance (BLS) of the lactic acid bacteria LAB-A strain, isolated from cold smoked salmon.

For the test the indirect antagonism and spot on lawn techniques were used, where the strains of *Listeria* showed the development of colonies inside the inhibition zones. In order to verify the persistence of the resistance, 5 colonies of two strain of *L. monocytogenes* were cultured in tryptic soy broth (TSB) during 5 days, and the fifth day the indirect antagonism test and spot on lawn test, were performed. It was observed that 40% of the colonies of both strains maintained the resistant character. Of the 10 strains of *Listeria*, two were selected, Lm ISP and Lm 82, for the coculture test at three pH (5,0, 5,5 and 6,5), Every 24 h the viability of *Listeria* was controlled on OXA agar and on MRS agar for the LAB-A strain. At pH 5,0 there was no growth of *L. monocytogenes*, as well as for the strain LAB-A. At pH 6.5 a bacteriostatic effect was seen, which was greater than at pH 5.5 for Lm 82 and Lm ISP. Both strains had counts two logarithmic cycles lower at 24 h, with respect to the control of *L. monocytogenes*, this tendency was maintained over 72 h. Furthermore a coculture of both strains of *Listeria* in tryptic soy broth (TSB), with 1,5%; 3,0% and 6,0% NaCl, showed no microbial development at 6,0% NaCl. The counts of the coculture with Lm 82 and LAB-A with 3,0% NaCl, were lower than at 1,5% NaCl, obtaining two logarithmic cycles less than its control. On the contrary, the antagonistic effect of the strain LAB-A against Lm ISP was higher with 1,5% NaCl.

Under the experimental conditions used, to simulate industrial factors, the BLS of the LAB-A strain was able to inhibit *L. monocytogenes*, however the development of resistant cells was observed.

7 BIBLIOGRAFÍA

- (APHA) AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1992. MASHALL, R.T. (ed.) Standard Methods for the examination of dairy products. Washington, D.C. 546 p.
- ARIZCUN, C.; VASSEUR, C. y LABADIE, J.C. 1998. Effect of several Decontamination Procedures on *Listeria monocytogenes* Growing in Biofilms. Journal of Food Protection 61 (6): 731-734.
- BATT, C.A. 2000. *Listeria*. In: ROBINSON, R.K.; BATT, C.A y PATEL, P.D. (eds.) Encyclopedia of Food Microbiology. pp: 1197-1198.
- BENNIK, M.H.J.; VANLOO, V.; BRASSEUR, R.; GORRIS, L.G.M. y SMID, E.J. 1998. A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. Biochemistry Biophysics Acta 1373: 47-58.
- BERGEY, D.H. 2000. In: HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T. y WILLIAMS, S.T. (eds.) Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 th. ed. Philadelphia, EE.UU. 787 p.
- BLACKBURN, C.W. y MAcCLURE, P.J. 2002. Foodborne pathogens: hazards, risk analysis and control. Boca Ratón, CRC. 521 p.
- BLACKMAN, I.C. y FRANK, J.F. 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* an a biofilm on various food-processing surfaces. Journal of Food Protection 59: 827-831.
- BORUCKI, M.K.; PEPPIN, J.D.; WHITE, D.; LOGE.F. y CALL, D.R. 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. Journal Applied Environmental Microbiology 69: 7336-7342.
- BOUTTEFROY, A. y MILLIERE, J.B. 2000. Nisin-curvaticin combinations for avoiding the regrowth of bacteriocina resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. International Journal Food Microbiology 62: 65-75.
- BOZIARIS, I.S.; SKANDAMIS, P.N.; ANASTASIADI, M. y NYCHAS, J.E. 2007. Effect of NaCl and KCL on fate and growth/no growth interfaces of *Listeria monocytogenes* Scout A at different pH and nisin concentratrions. Journal of Applied Microbiology 102: 796-805.
- BOURGEOIS, C.M. y LARPENT, J.P. Microbiología alimentaria.1994. Volumen II: Fermentaciones alimentarias. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 366 p.

- BRILLET, A.; PILET, M.F.; PREVOST, H.; BOUTTEFROY y LEROI, F. 2004. Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocina-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology* 97: 1029-1037.
- BRILLET, A.; PILET, M.F.; PREVOST, H.; CARDINAL, M. y LEROI, F. 2005. Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* 104 (3): 309-324.
- BROTZ, H.; BIERBAUM, G.; LEOPOLD, K.; REINOLDS, P.E. y SAHL H-G. 1998. The lanthibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis by targeting lipid II. *Antimicrobiology Agents Chemother* 42:154-160.
- 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.
- CINTAS, L.M.; CASAUS, P.; FERNÁNDEZ, M.F y HERNÁNDEZ, P.E. 1998. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, Nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiology* 15: 289-298.
- DE MARITNIS, E.C.P.; CRANDALL, D.C.; MAZZOTTA., A. 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.
- DEL CAMINO, M. 1991. Microorganismos patógenos en el queso. *Revista española de lechería*. 26: 20-21.
- DELVES-BROUGHTON, J.P.; BLACKBURN, R.J. y HUGENHOLTS, J. 1996. Applications of the bacteriocina, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 193-202.
- DÍAZ, A. 2004. Presencia de bacterias saprofitas y patógenas en piel y branquias de pescado fresco. Tesis Lic. Ing. en Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 81 p.
- DYKES, G.A. y HASTINGS, J.W. 1998. Fitness cost associated with class IIa bacteriocina resistance in *Listeria monocytogenes*. *Letters Applied Microbiology* 26: 5-8.
- DUFFES, F.; LEROI, F. ; BOYAVAL, P. y DOUSSET, X. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. Strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4°C. *International Journal of Food Microbiology* 47 (1-2): 33-42.
- EIJSINK, V.G.H.; MIDDELHOVEN, M.S.P.H.; BRURBERG, M.B. y NES, I.F. 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied*

Environmental Microbiology 64: 3275-3281.

- EKLUND, M.W.; POYSKY, F.T.; PARANJPYE, R.N.; LASHBROOK, L.C.; PETERSON, M. y PELROY, G.A. 1994. Incidence and Sources of *Listeria monocytogenes* In Cold-Smoked Fishery Products and Processing Plants. Journal of Food Protection 58 (5): 502-508.
- ENNAHAR, S.; SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiology Reviews 24: 85-106.
- ESTRADA, A.; GUTIÉRREZ, L. y MONTOYA, G. 2006. Evaluación *in Vitro* del efecto Bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus sp.* contra *Salmonella sp.* y *Escherichia coli*. Mundo Lácteo y cárnico 1-10.
- FARÍAS, M.E. 1996. Estudios bioquímicos y genéticos de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. Tesis doctoral. Univ. Nacional de Tucumán.
- (FAO/OMS) ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN / ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2004. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Resumen interpretativo. Serie sobre Evaluación de Riesgos Microbiológicos. 54 p.
- FERREIRA, M.A.S.S. y LUND, B.M. 1996. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese. Letters Applied Microbiology 22: 433-438.
- FIGUERA, B.E.; CABELLO, A.M. y VILLALOBOS, L.V. 2005. Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en atún ahumado empacado al vacío. Zootecnia tropical. 23 (2): 171-181.
- 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.
- GOULD, G.W. 1996. Industry perspective on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. Journal of Food Protection. (Supl.) : 82-86.
- GRAVESEN, A.; JYDEGAARD AXELSEN, A.M.; MENDES DA SILVA, J.; HANSEN, T.B. y KNOCHÉL, S. 2002. Frequency of Bacteriocins Resistance Development and Associated Fitness Costs in *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology 68 (2): 756-764.
- GRAVESEN, A.; RAMNATH, M.; RECHINGER, B.; ANDERSEN, N.; JANSCH, L.; HÉCHARD, Y.; HASTINGS, J.W. y KNOCHÉL, S. 2002. High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. Microbiology 148:2361-2369.

- GUYONNET, D.; FREMAUX, C.; CENATIEMPO, Y. y BERJEAUD, J.M. 2000. Method for Rapid Purification of Class IIA Bacteriocins and Comparison of Their Activities. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (4): 1744-1748.
- HAN-SHIN, J. y RASCO, B. 2007. Effect of Water Phase SALT Content and Storage Temperature on *Listeria monocytogenes* Survival in Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) Roe and Caviar (Ikura). *Journal of Food Science* 72: M160-M165.
- HARRIS, L.J.; FLEMING, H.P. y KLAENHAMMER, T.R. 1991. Sensitivity and Resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 54 (11): 836-840.
- HEINITZ, M.L.; JOHNSON, J.M. 1998. The Incidence of *Listeria* spp., *Salmonella* spp., and *Clostridium botulinum* in smoked fish and shellfish. *Journal of Food Protection* 61 (3): 318-323.
- HIMELBLOOM, B.; NILSSON, L. y GRAM, L. 2001. Factors affecting production of an antilisterial bacteriocin by carnobacterium piscicola strain A9b in laboratory media and model fish systems. *Journal of Applied Microbiology* 91: 506-513.
- HOLAH, J.T.; TAYLOR, J.H.; DAWSON, D.J. y HALL, K.E. 2002. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Journal Applied Microbiology* 92:111S-120S.
- JAY, J. 2000. *Microbiología moderna de los alimentos*. 4ªed. Editorial Acribia, Zaragoza. España. 615 p.
- KARUNASAGAR, I. 1999. *Aquaculture and biotechnology*, Editorial Science Publishing. Enfield, USA. 186 p.
- KATHARIOU, S. 2002. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection* 65:1811-1829.
- KATLA, T.; NATERSTAD, K.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. y AXELSSON, L. 2003. Differences in Susceptibility of *Listeria monocytogenes* Strains to Sakacin P, Sakacin A, Pediocin PA-1, and Nisin. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (8): 4431-4437.
- KAYA, M. y SCHMIDT, U. 1993. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* sobre carne vacuna envasada al vacío. *Fleischwirtschaft* 1:29-32.
- KLAENHAMMER, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS. Microbiology Reviews* 12: 39-86.
- LAMA, P. 2002. Caracterización de una bacteriocina producida por una bacteria ácido láctica de carne envasada al vacío. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia.

Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 86 p.

- LAWRENCE, L.M. y GILMOUR, A. 1994. Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a Poultry Processing Environment and Poultry Products And Their Rapid Confirmation by Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (12): 4600-4604.
- LEAL-SÁNCHEZ, M.V.; JIMENÉZ-DÍAZ, R.; MALDONADO-BARRAGÁN, A.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A. y RUIZ-BARBA, J.L. 2002. Optimisation of Bacteriocin Production by Batch Fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (9): 4465-4471.
- LEROY, F. y DE VUYST, L. 1999. The presence of SALT and a Curing Agent Reduces Bacteriocin Production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a Potential Starter Culture for Sausage Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (12): 5350-5356.
- LEROY, F. y DE VUYST, L. 1999. Temperature and pH Conditions that prevail during Fermentation of Sausages Are Optimal for Production of the Antilisterial Bacteriocina Sakacin K. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(3):974-981.
- LINDGREN, S.E. y DOBROGOSZ, W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews* 87: 149-164.
- LOESSNER, M.; GUENTHER, S.; STEFFAN, S. y SCHERER, S. 2003. A Pediocin-Producing *Lactobacillus plantarum* Strain Inhibits *Listeria monocytogenes* in a Multispecies Cheese Surface Microbial Ripening Consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (3): 1854-1857.
- MARTIN, A. 2002. Capacidad antagonista frente a *Listeria monocytogenes* de dos sustancias tipo bacteriocina utilizadas en combinación con NaCl y CO₂. 2002. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 90 p.
- MARTÍN, S.E. y FISHER, C.W. 2000. *Listeria monocytogenes*. In: ROBINSON, R.K.; BATT, C.A y PATEL, P.D. (eds.) *Encyclopedia of Food Microbiology*. Londres, Gran Bretaña. pp:1228-1231.
- MONTVILLE, T.J. y BRUNO, M.E. 1994. Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial. *International Journal Food Microbiology* 24: 53-74.
- NILSSON, L.Y.; CHRISTIANSEN, J.N.; JORGENSEN, B.L.; GRÓTINUM, D. y GRAM, L. 2004. The contribution of bacteriocina to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *Journal of Applied Microbiology* 96 (1):133-143.

- NUÑEZ, G.A.; CAYRÉ, M.E.; CASTRO, M.P. y GARRO, O. 1996. Efectividad y modo de acción de nisina sobre *Lactobacillus fructivorans*. Cátedra Microbiología de Alimentos. Chaco. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Agroindustrias. 4 p.
- POYSKY, F.T.; PARANJPYE, R.N.; PETERSON, M.E.; PELROY, G.A.; GUTTMAN, A.E. y EKLUND, M.W. 1997. Inactivación of *Listeria monocytogenes* on Hot-smoked Salmon by the Interaction of heat and Smoke or Liquid Smoke. Journal of Food Protection 60 (6): 649-654.
- RAMNATH, M.; BEUKES, M.; TAMURA, K. y HASTINGS, J.W. 2000. Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology 66: 3098-3101.
- RASCH, M. y KNOCHER, S. 1998. Variations in tolerance of listeria monocytogenes to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A. Letters Applied Microbiology 27: 275-278.
- REQUENA, T. y PELÁEZ, C. 1995. Revisión: Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. Revista Ciencia y Tecnología en Alimentos 35: 19-44.
- ROBBINS, J.B. 2005. Elimination of *Listeria monocytogenes* Biofilms y Ozone, Chlorine, and Hydrogen Peroxide. Journal of Food Protection 57 (3): 494-498.
- RODAS-SUARÉZ, O.R.; FLORES-PEDROCHE, J.F.; BETANCOURT-RULE, J.M.; QUIÑONES-RAMÍREZ, E.I y VÁSQUEZ-SALINAS, C. 2006. Occurrence and Antibiotic Sensitivity of *Listeria monocytogenes* Strains isolated from Oysters, Fish, Estuarine Water. Applied and Environmental Microbiology 72 (11): 7410-7412.
- RODRÍGUEZ, C. 2002. Efecto de una bacteriocina de *Carnobacterium piscicola* con antagonismo en contra de *Listeria monocytogenes*, sobre la conservación de trucha ahumada. Tesis Lic. Ing. en Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 99 p.
- RØRVIK, L.M. 2000. *Listeria monocytogenes* in the Smoked salmon Industry. International Journal of Food Microbiology 62:183-190.
- RYSER, E.T. y MARTH, E.H. 1991. Listeria, listeriosis and food safety. Characteristics of *L. monocytogenes*, important to food processor. New York, EE.UU. 66 p.
- SAHL, H-G.; BIERBAUM, G. 1998. Lanthibiotics: Biosynthesis and biological of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. Annual Review of Microbiology 52: 41-79.
- SÁNCHEZ, V.F.; MATA, T.V.; ESPINOZA, M.A. y VILLAREAL, T.L. 2006. Incidencias

de especies de *Listeria* en una planta productora de alimentos congelados. *Ciencia Universidad Autónoma de Nuevo León* 9 (001): 51-56.

- SCHILLINGER, U. y STILES, M.E. 1993. bacteriocin production by *Carnobacterium piscicola* LV 61. *Journal of Food Microbiology* 20: 131-147.
- SILVA, R. 2004. Acción antimicrobiana de dos bacteriocinas lácticas sobre *Listeria monocytogenes* adherida a una superficie de acero inoxidable. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 100 p.
- SIMON, L.; FREMAUX, C.; CENATIEMPO, Y. y BERJEAUD, J.M. 2002. Sakacin G, a New Type of Antilisterial Bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (12): 6416-6420.
- SUAZO, V. 2002. Caracterización del antagonismo de una bacteriocina *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. y WANNAMARKER, L.W. 1976. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacteriology Review* 40: 722-756.
- TOMPKIN, R.B. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of Food Protection* 65:709-765.
- THOMAS, L.V. y WIMPENNY, J.W. 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.
- THURETTE, J.; MEMBRE, J.M.; HAN CHING, L.; TAILLIEZ, R. y CATTEAU, M. 1998. Behavior of *Listeria* spp. In Smoked Fish Products Affected by Liquid Smoke, NaCl Concentration, and Temperature. 1998. *Journal of Food Protection* 61(11):1475-1479.
- VADYVALOO, V.; HASTINGS, J.W.; VAN DE R MERWE, M.J. y RAUTENBACH, M. 2002. Membranes of class lia bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5223-5230.
- VELÁSQUEZ, J. 2006. Efecto antagonista de la cepa *Carnobacterium piscicola* sobre *Listeria monocytogenes* en salmón ahumado en frío. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 133 p.
- VERLUYTEN, J.; MESSENS, W. y DE VUYST, L. 2004. Sodium Chloride Reduces Production of Curvacin A, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus curvatus* Strain LTH 1174, Originating from Fermented Sausage. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (4): 2271-2278.

- VIGNOLO, G.; PALACIOS, J.; FARIAS, 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.
- VIGNOLO, G.; DE KAIRUZ, M.N.; FARIAS, M.E.; DE RUIZ HOLGADO, A.A.; y OLIVER, G. 1995. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *Journal of Applied Bacteriology* 78: 5-10.
- WALSH, D.; DUFFY, G.; SHERIDAN, J.J.; BLAIR, I.S. y MCDOWELL, D.A. 2001. Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. *Journal of Applied Microbiology* 90: 517-522.
- YANG, R. y RAY, B. 1994. Factors Influencing Production of Bacteriocins By Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Protection* 11: 281-291.
- YOON. K.S.; BURNETTE, C.N.; ABOU-ZEID, K.A. y WHITING, R.C. 2004. Control of Growth and Survival of *Listeria monocytogenes* on Smoked Salmon by Combined Potassium Lactate and Sodium Diacetate and Freezing Stress during Refrigeration and Frozen Storage. *Journal of Food Protection* 67 (11): 2465-2471.
- ZHENG, LU.; JOSEPH, G.SEBRANEK.; JAMES, S.DICKSON.; AUBREY, F.MENDONCA. y THEODORE, B.BAILEY. 2005. Inhibitory Effects of Organic Acid Salts for Control of *Listeria monocytogenes* on Frankfurters. *Journal of Food Protection* 68 (3): 499-506.

ANEXOS

ANEXO 1. RECUENTO EN PLACA DE UN CULTIVO DE 18 H EN CALDO ST, PARA CEPAS DE *LISTERIA* Y DE 24 H EN CALDO MRS, PARA LA CEPA LÁCTICA BAL-A.

CEPAS DE <i>LISTERIA</i>	RECUENTO (UFC/ML)
Lm ATTC 7644	$1,14 \times 10^9$
L. cong 25	$1,25 \times 10^9$
Lm 1/00	$1,56 \times 10^9$
<i>L. innocua</i>	$1,48 \times 10^9$
Lm ISP	$1,41 \times 10^9$
L. cong C	$1,24 \times 10^9$
Lm 82	$1,88 \times 10^9$
Lm 3/00	$1,49 \times 10^9$
L. cong 22	$2,04 \times 10^9$
Lm 4/00	$1,56 \times 10^9$
Cepa láctica	Recuento (ufc/ml)
BAL-A	$1,88 \times 10^9$

ANEXO 2. OPERACIONES REALIZADAS PARA LAS PRUEBAS DE COCULTIVO.

ANEXO 2.1. Solución tampón de buffer fosfato 20mM, utilizadas para la elaboración del medio de cultivo a dos niveles de pH (LAMA, 2002).

pH	NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O (g/L)	K ₂ HPO ₄ (g/L)
5,5	11,40	0,37
6,0	10,80	1,37
6,5	9,71	3,16

ANEXO 2.2. Rangos de pH para pruebas de cocultivo.

COCULTIVO	RANGO PH (PAPEL INDICADOR, MERCK)
6,5	6,4 - 6,7
5,5	5,4 - 5,8

ANEXO 2.3. Preparación del medio de cultivo caldo Soya Trypticasa (ST) adicionado de cloruro de sodio para cocultivos.

Para 1000 ml de solución:

%NACL (P/V)	CALDO ST (G/L)	NACL (G/L)
1.5*	30	10
3.0	30	25
6.0	30	55

*1.5 g de NaCl/ 100 ml de solución \implies 15 g de NaCl/1000 ml de solución

El caldo ST contiene:

0,5 g de NaCl/ 100 ml de solución \implies 5 g de NaCl/ 1000 ml de solución

Se resta los 5 g NaCl

ANEXO 3. PRUEBA DE ANTAGONISMO INDIRECTO EN AGAR MRS CON CEPA BAL-A FRENTE A 10 CEPAS DE *LISTERIA*.

CEPAS <i>LISTERIAS</i>	1° EXPERIMENTO	2° EXPERIMENTO	3° EXPERIMENTO	PROMEDIO ZONA RADIAL
Lm ATTC 7644	9,29	10,66	8,89	9,61 ± 0,93 ¹
L. cong 25	7,96	8,45	8,04	8,15 ± 0,26
Lm 1/00	6,75	7,77	6,95	7,16 ± 0,54
L. innocua	6,72	6,84	6,04	6,53 ± 0,43
Lm ISP	9,11	9,40	9,67	9,39 ± 0,28
L. cong C	7,19	6,17	7,05	6,80 ± 0,55
Lm 82	9,45	8,36	7,40	8,40 ± 1,03
Lm 3/00	7,84	9,16	9,23	8,74 ± 0,78
L. cong 22	6,86	9,25	6,55	7,55 ± 1,48
Lm 4/00	7,21	7,74	8,09	7,68 ± 0,44

¹⁾ Valores corresponden al promedio de tres repeticiones

ANEXO 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ZONA RADIAL DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN ENTRE LAS 10 CEPAS DE *LISTERIA* EN ANTAGONISMO INDIRECTO.

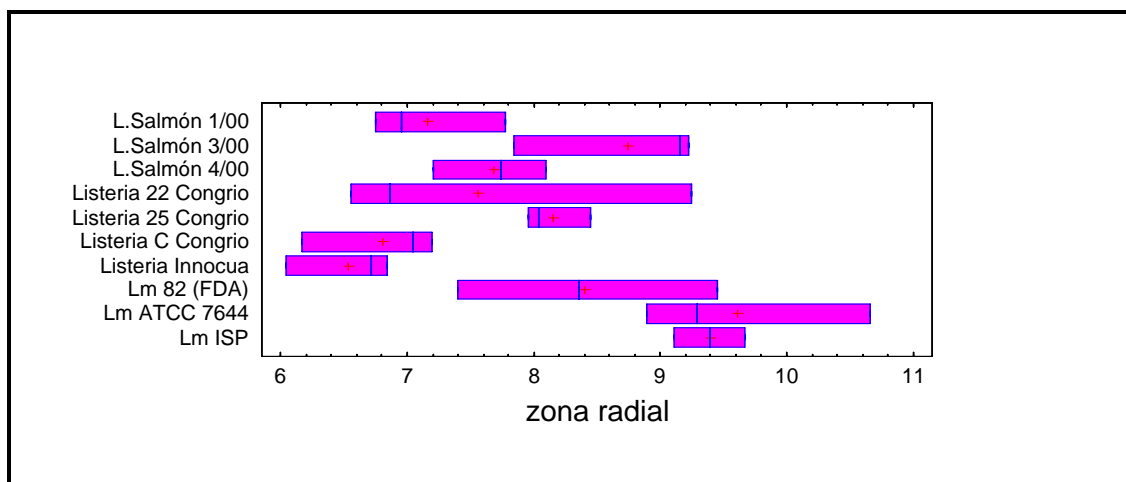
ANEXO 4.1. Análisis de varianza (ANDEVA).

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	29,6343	9	3,2927	5,64	0,0006
Within groups	11,6755	20	0,583777		
Total (Corr.)	41,3098	29			

ANEXO 4.2. Prueba de comparación múltiple de Tukey Method: 95.0 percent HSD.

cepas Listeria	Count	Mean	Homogeneous Groups
Listeria Innocu	3	6,53333	X
Listeria C Cong	3	6,80333	X
L.Salmón 1/00	3	7,15667	XX
Listeria 22 Con	3	7,55333	XXX
L.Salmón 4/00	3	7,68	XXX
Listeria 25 Con	3	8,15	XXX
Lm 82 (FDA)	3	8,40333	XXXX
L.Salmón 3/00	3	8,74333	XXX
Lm ISP	3	9,39333	XX
Lm ATCC 7644	3	9,61333	X

ANEXO 4.3. Comparación de medias de la zona radial frente a las 10 cepas de *Listeria*.



ANEXO 5. PRUEBA DE GOTA SOBRE CÉSPED EN AGAR MRS CON LA CEPAL BAL-A FRENTE A 10 CEPAS DE *LISTERIA*.

CEPAS <i>LISTERIAS</i>	1° EXPERIMENT O	2° EXPERIMENT O	3° EXPERIMENT O	PROMEDIO DIÁMETRO (MM)
Lm ATTC 7644	17,98	17,98	17,98	16,33 ± 1,45 ¹
L. cong 25	13,72	13,84	16,32	14,63 ± 1,47
Lm 1/00	17,60	15,45	14,60	15,88 ± 1,56
L. innocua	16,42	15,25	14,58	14,68 ± 0,52
Lm ISP	18,75	17,44	16,84	17,68 ± 0,98
L. cong C	14,94	15,35	14,60	14,96 ± 0,38
Lm 82	14,99	15,37	15,74	15,37 ± 0,38
Lm 3/00	16,22	15,29	17,26	16,22 ± 0,94
L. cong 22	17,17	17,03	16,48	17,56 ± 1,42
Lm 4/00	18,07	18,72	17,42	18,72 ± 0,65

¹⁾ Valores corresponden al promedio de tres repeticiones

ANEXO 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL DIÁMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN ENTRE LAS 10 CEPAS DE *LISTERIA* EN GOTA SOBRE CÉSPED.

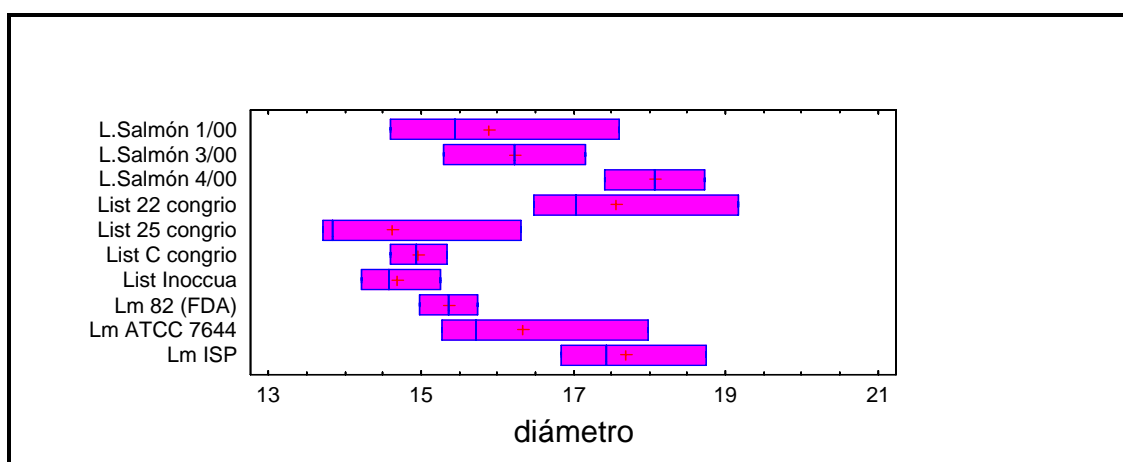
ANEXO 6.1. Análisis de varianza (ANDEVA).

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	43,8186	9	4,86873	4,25	0,0034
Within groups	22,9257	20	1,14628		
Total (Corr.)	66,7442	29			

ANEXO 6.2. Prueba de comparación múltiple de Tukey Method: 95.0 percent HSD.

cepa Listerias	Count	Mean	Homogeneous Groups
L.25 Congrio	3	14,6267	X
L. Innocua	3	14,6833	X
L.C Congrio	3	14,9633	X
Lm 82 (FDA)	3	15,3667	X
L.Salmón 1/00	3	15,8833	XX
L.Salmón 3/00	3	16,2233	XX
Lm ATCC	3	16,33	XXX
L.22 Congrio	3	17,56	XX
Lm ISP	3	17,6767	XX
L.Salmón 4/00	3	18,07	X

ANEXO 6.3. Comparación de medias del diámetro frente a las 10 cepas de *Listeria*.



ANEXO 7. PRUEBA DE ANTAGONISMO INDIRECTO EN AGAR MRS CON CEPA BAL-A Y SU CONTROL FRENTE A 10 CEPAS DE *LISTERIA*.

Colonias Lm ISP	Antagonismo indirecto (mm) (zona radial)	Gota sobre césped (mm) (diámetro)
Cepa original	9,39 ± 0,28	17,68 ± 0,98
Colonia 1	5,23 ± 0,30	15,52 ± 0,78
Colonia 2	5,09 ± 0,63	15,35 ± 0,64
Colonia 3	4,81 ± 0,97	AH
Colonia 4	5,42 ± 0,43	AH
Colonia 5	8,09 ± 0,75	AH

Colonias Lm 82	Antagonismo indirecto (mm) (zona radial)	Gota sobre césped (mm) (diámetro)
Cepa original	8,40 ± 1,03	15,37 ± 0,38
Colonia 1	3,97 ± 0,18	16,62 ± 1,01
Colonia 2	4,14 ± 0,35	11,16 ± 0,20
Colonia 3	4,32 ± 1,56	AH
Colonia 4	3,92 ± 0,38	AH
Colonia 5	4,02 ± 0,32	AH

AH: Ausencia de halo

ANEXO 8. RECUENTO EN PLACA DE *LISTERIA* Lm 82 Y CEPA BAL-A, EN AGAR OXA Y AGAR MRS, CORRESPONDIENTE, A pH 5,5 Y 6,5.

PH									
5,5					6,5				
Cocultivo									
Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)	Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)
	1º	2º	3º			1º	2º	3º	
0	2,8	2,8	2,7	2,81 ± 0,06 ¹	0	3,2	3,1	3,2	3,20 ± 0,02
24	8,2	8,2	7,3	7,93 ± 0,54	24	7,4	7,5	6,7	7,24 ± 0,45
48	7,2	7,2	7,3	7,28 ± 0,01	48	7,3	7,5	7,2	7,37 ± 0,17
72	7,2	7,3	7,2	7,29 ± 0,01	72	7,1	7,4	7,0	7,22 ± 0,21
Control Lm									
Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)	Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)
	1º	2º	3º			1º	2º	3º	
0	3,4	3,0	3,4	3,28 ± 0,24	0	3,2	3,2	3,2	3,22 ± 0,01
24	8,6	8,4	8,4	8,39 ± 0,03	24	8,9	9,1	8,7	8,96 ± 0,92
48	8,4	8,5	8,5	8,52 ± 0,03	48	9,0	9,2	9,2	9,19 ± 0,09
72	8,7	8,5	8,7	8,67 ± 0,12	72	8,8	8,8	9,0	8,91 ± 0,11
Control BAL									
Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)	Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)
	1º	2º	3º			1º	2º	3º	
0	4,8	4,9	4,8	4,86 ± 0,05	0	4,8	4,7	4,8	4,83 ± 0,06
24	8,7	8,7	8,8	8,79 ± 0,04	24	8,9	9,1	8,8	8,99 ± 0,18
48	8,3	8,0	8,1	8,23 ± 0,07	48	8,8	9,0	8,9	8,96 ± 0,07
72	8,2	8,0	8,1	8,15 ± 0,10	72	9,0	8,5	8,3	8,64 ± 0,38

¹ Valores corresponden al promedio del triplicado del experimento

ANEXO 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS PRUEBAS DE COCULTIVO DE LA CEPA Lm 82 A DOS NIVELES DE pH.

ANEXO 9.1. Análisis de varianza (ANDEVA) a pH 5,5

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:cepa BAL	4,7082	1	4,7082	100,76	0,0000
B:Tiempo	111,19	3	37,0633	793,15	0,0000
INTERACTIONS					
AB	1,09715	3	0,365715	7,83	0,0019
RESIDUAL	0,747667	16	0,0467292		
TOTAL (CORRECTED)	117,743	23			

ANEXO 9.2. Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica. Method: 95.0 percent HSD.

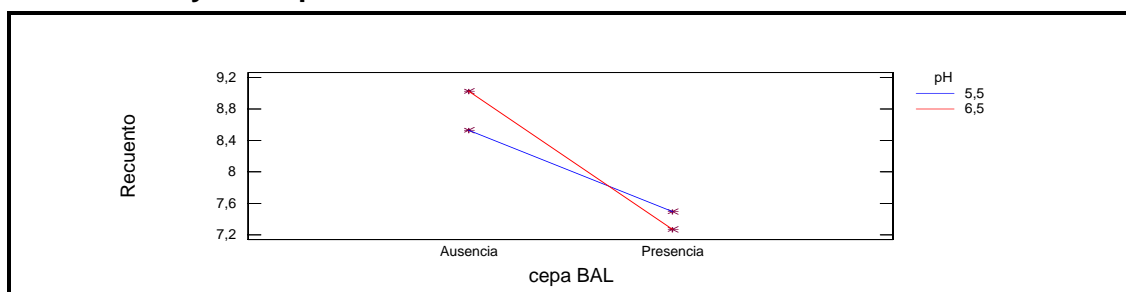
cepa BAL	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Presencia	12	6,32833	0,0624027	X
Ausencia	12	7,21417	0,0624027	X
Contrast		Difference		+/- Limits
Ausencia - Presencia		*0,885833		0,187084

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 9.3. Prueba de comparación múltiple de Tuckey para los recuentos por tiempo. Method: 95.0 percent HSD.

Tiempo	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	6	3,04667	0,0882507	X
48	6	7,9	0,0882507	X
72	6	7,98	0,0882507	X
24	6	8,15833	0,0882507	X

ANEXO 9.4. Prueba de interacciones para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica.



ANEXO 9.5. Análisis de varianza (ANDEVA) a pH 6,5.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:cepa BAL	10,4017	1	10,4017	236,20	0,0000
B:Tiempo	109,883	3	36,6277	831,74	0,0000
INTERACTIONS					
AB	3,3785	3	1,12617	25,57	0,0000
RESIDUAL	0,7046	16	0,0440375		
TOTAL (CORRECTED)	124,368	23			

ANEXO 9.6. Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica. Method: 95.0 percent HSD.

cepa BAL	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Presencia	12	6,255	0,0605788	X
Ausencia	12	7,57167	0,0605788	X
Contrast		Difference		+/- Limits
Ausencia - Presencia		*1,31667		0,181616

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 9.7. Prueba de comparación múltiple de Tuckey para los recuentos por tiempo. Method: 95.0 percent HSD.

Tiempo	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	6	3,21	0,0856714	X
72	6	8,06167	0,0856714	X
24	6	8,1	0,0856714	X
48	6	8,28167	0,0856714	X

ANEXO 10. RECUENTO EN PLACA DE *LISTERIA* Lm ISP Y CEPA BAL-A, EN AGAR OXA Y AGAR MRS, CORRESPONDIENTE, A pH 5,5 Y 6,5.

PH									
5,5					6,5				
Cocultivo									
Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)	Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)
	1º	2º	3º			1º	2º	3º	
0	2,3	2,4	2,3	2,34 ± 0.06 ¹	0	2,7	2,9	2,4	2,68 ± 0.27
24	7,2	7,2	7,5	7,35 ± 0.17	24	6,8	6,5	6,7	6,73 ± 0.12
48	8,2	8,3	8,2	8,30 ± 0.01	48	6,7	6,6	6,6	6,67 ± 0.06
72	8,1	8,1	7,7	8,01 ± 0.25	72	6,4	6,3	6,4	6,42 ± 0.07
Control Lm									
Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)	Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)
	1º	2º	3º			1º	2º	3º	
0	2,6	2,5	2,5	2,58 ± 0.03	0	3,0	2,9	2,9	2,97 ± 0.04
24	9,1	9,1	9,2	9,16 ± 0.03	24	8,7	8,8	8,8	8,79 ± 0.06
48	9,1	9,1	9,1	9,17 ± 0.02	48	8,0	8,8	8,8	8,56 ± 0.48
72	9,7	8,9	9,0	9,22 ± 0.47	72	8,7	8,6	8,6	8,68 ± 0.08
Control BAL									
Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)	Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)
	1º	2º	3º			1º	2º	3º	
0	4,6	4,7	4,6	4,65 ± 0.06	0	4,8	4,8	4,8	4,85 ± 0.03
24	9,0	9,1	8,9	9,06 ± 0.11	24	8,8	8,7	7,7	8,46 ± 0.57
48	9,2	9,1	9,2	9,20 ± 0.04	48	9,0	8,8	9,0	8,97 ± 0.08
72	9,5	9,4	9,4	9,50 ± 0.06	72	8,8	9,0	8,7	8,91 ± 0.16

¹ Valores corresponden al promedio del triplicado del experimento

ANEXO 11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS PRUEBAS DE COCULTIVO DE LAS CEPA Lm ISP A DOS NIVELES DE pH.

ANEXO 11.1. Análisis de varianza (ANDEVA) a pH 5,5.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:cepa BAL	6,3757	1	6,3757	158,35	0,0000
B:Tiempo	166,807	3	55,6022	1380,99	0,0000
INTERACTIONS					
AB	1,89795	3	0,632649	15,71	0,0000
RESIDUAL	0,6442	16	0,0402625		
TOTAL (CORRECTED)	175,724	23			

ANEXO 11.2. Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica. Method: 95.0 percent HSD.

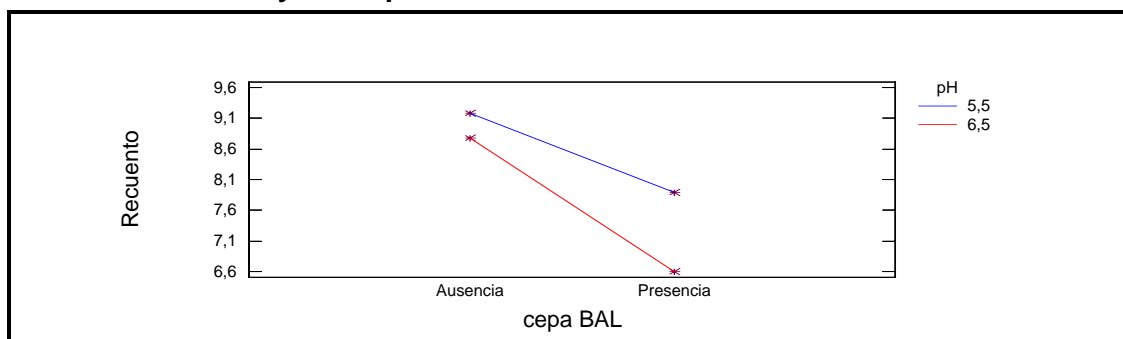
cepa BAL	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Presencia	12	6,49833	0,0579242	X
Ausencia	12	7,52917	0,0579242	X
Contrast		Difference		+/- Limits
Ausencia - Presencia		*1,03083		0,173657

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 11.3. Prueba de comparación múltiple de Tuckey para los recuentos por tiempo. Method: 95.0 percent HSD.

Tiempo	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	6	2,45833	0,0819171	X
24	6	8,24333	0,0819171	X
72	6	8,61833	0,0819171	X
48	6	8,735	0,0819171	X

ANEXO 11.4. Prueba de interacciones para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica.



ANEXO 11.5. Análisis de varianza (ANDEVA) a pH 6,5.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:cepa BAL	28,362	1	28,362	489,84	0,0000
B:Tiempo	69,4889	3	23,163	400,05	0,0000
INTERACTIONS					
AB	0,475146	3	0,158382	2,74	0,0779
RESIDUAL	0,9264	16	0,0579		
TOTAL (CORRECTED)	99,2525	23			

ANEXO 11.6. Prueba de comparación múltiple de Tuckey para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica. Method: 95.0 percent HSD.

cepa BAL	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Presencia	12	5,62333	0,0694622	X
Ausencia	12	7,7975	0,0694622	X
Contrast		Difference		+/- Limits
Ausencia - Presencia		*2,17417		0,208248

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 11.7. Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos por tiempo. Method: 95.0 percent HSD.

Tiempo	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	6	3,76667	0,0982344	X
24	6	7,59167	0,0982344	X
72	6	7,66333	0,0982344	X
48	6	7,82	0,0982344	X

ANEXO 12. RECUENTO EN PLACA DE *LISTERIA* Lm 82 Y CEPA BAL-A, EN AGAR OXA Y AGAR MRS, CORRESPONDIENTE, A 1,5% Y 3,0% NaCl Y pH 6,0.

% NaCl									
1,5					3,0				
Cocultivo									
Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)	Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)
	1º	2º	3º			1º	2º	3º	
0	2,4	2,4	2,4	2,45 ± 0,02 ¹	0	2,0	2,0	2,1	2,07 ± 0,04
24	8,0	8,1	8,1	8,14 ± 0,08	24	7,7	7,7	6,6	7,38 ± 0,63
48	8,3	8,4	7,5	8,10 ± 0,49	48	7,3	7,3	7,6	7,42 ± 0,20
72	8,3	8,3	8,3	8,33 ± 0,04	72	7,7	7,7	7,	7,78 ± 0,01
Control Lm									
Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)	Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)
	1º	2º	3º			1º	2º	3º	
0	2,8	2,8	2,9	2,87 ± 0,04	0	2,2	2,1	2,1	2,18 ± 0,03
24	8,6	8,7	8,6	8,66 ± 0,08	24	8,5	8,6	8,7	8,63 ± 0,08
48	8,8	9,1	9,0	9,02 ± 0,17	48	8,9	9,0	9,1	9,02 ± 0,11
72	8,5	8,7	8,8	8,70 ± 0,15	72	9,0	9,0	9,0	9,06 ± 0,02
Control BAL									
Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)	Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)
	1º	2º	3º			1º	2º	3º	
0	2,4	4,3	4,8	4,60 ± 0,23	0	4,5	4,7	4,5	4,63 ± 0,09
24	8,2	8,7	8,6	8,19 ± 0,08	24	7,5	8,5	7,5	7,91 ± 0,57
48	8,9	8,7	8,6	8,76 ± 0,14	48	8,7	8,5	8,9	8,77 ± 0,19
72	9,0	9,1	8,7	8,96 ± 0,23	72	9,0	8,5	8,9	8,85 ± 0,24

¹ Valores corresponden al promedio del triplicado del experimento

ANEXO 13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS PRUEBAS DE COCULTIVO DE LAS CEPA Lm 82 A DOS NIVELES DE % NaCl.

ANEXO 13.1. Análisis de varianza (ANDEVA) a 1,5 % NaCl.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:cepa BAL	1,8205	1	1,8205	46,59	0,0000
B:Tiempo	153,119	3	51,0397	1306,20	0,0000
INTERACTIONS					
AB	0,282446	3	0,0941486	2,41	0,1050
RESIDUAL	0,6252	16	0,039075		
TOTAL (CORRECTED)	155,847	23			

ANEXO 13.2 Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica. Method: 95.0 percent HSD.

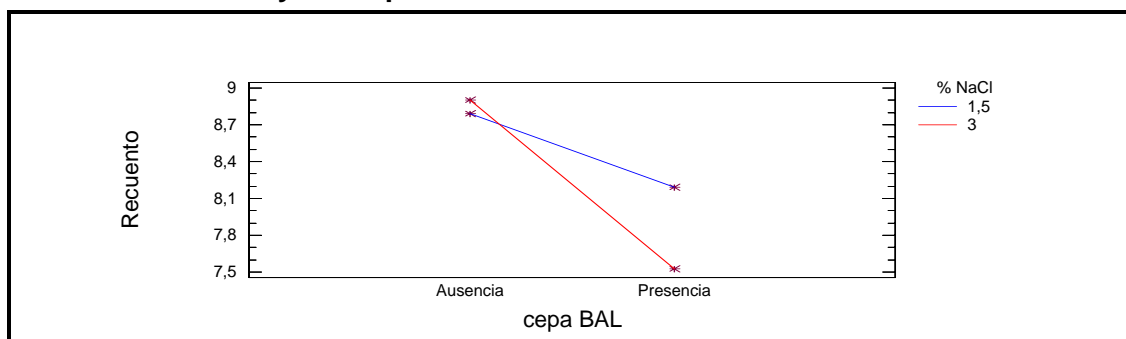
cepa BAL	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Presencia	12	6,75833	0,0570636	X
Ausencia	12	7,30917	0,0570636	X
Contrast		Difference		+/- Limits
Ausencia - Presencia		*0,550833		0,171077

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 13.3. Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos por tiempo. Method: 95.0 percent HSD.

Tiempo	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	6	2,66	0,0807001	X
24	6	8,4	0,0807001	X
72	6	8,515	0,0807001	X
48	6	8,56	0,0807001	X

ANEXO 13.4. Prueba de interacciones para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica.



ANEXO 13.5. Análisis de varianza (ANDEVA) A 3,0% NaCl.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:cepa BAL	6,77344	1	6,77344	117,09	0,0000
B:Tiempo	167,618	3	55,8728	965,82	0,0000
INTERACTIONS					
AB	1,91925	3	0,639749	11,06	0,0004
RESIDUAL	0,9256	16	0,05785		
TOTAL (CORRECTED)	177,237	23			

ANEXO 13.6. Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica. Method: 95.0 percent HSD.

cepa BAL	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Presencia	12	6,15917	0,0694322	X
Ausencia	12	7,22167	0,0694322	X
Contrast		Difference		+/- Limits
Ausencia - Presencia		*1,0625		0,208158

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 13.7. Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos por tiempo. Method: 95.0 percent HSD.

Tiempo	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	6	2,12	0,098192	X
24	6	8,005	0,098192	X
48	6	8,22	0,098192	XX
72	6	8,41667	0,098192	X

ANEXO 14. RECUENTO EN PLACA DE *LISTERIA* Lm ISP Y CEPA BAL-A, EN AGAR OXA Y AGAR MRS, CORRESPONDIENTE, A 1,5% Y 3,0% NaCl Y pH 6,0.

% NaCl									
1,5					3,0				
Cocultivo									
Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)	Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)
	1º	2º	3º			1º	2º	3º	
0	2,9	2,9	2,9	$2,92 \pm 0,02^1$	0	2,3	2,4	2,7	$2,52 \pm 0,24$
24	7,2	7,1	7,2	$7,22 \pm 0,09$	24	7,6	7,6	7,7	$7,66 \pm 0,05$
48	7,2	7,2	7,3	$7,26 \pm 0,03$	48	7,7	7,6	7,7	$7,75 \pm 0,06$
72	7,3	7,3	7,2	$7,29 \pm 0,01$	72	7,7	7,7	7,7	$7,76 \pm 0,01$
Control Lm									
Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)	Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)
	1º	2º	3º			1º	2º	3º	
0	2,7	2,6	2,8	$2,76 \pm 0,10$	0	3,0	2,3	3,0	$2,82 \pm 0,45$
24	8,6	8,7	9,1	$8,84 \pm 0,25$	24	8,4	9,0	8,9	$8,77 \pm 0,31$
48	8,8	8,7	8,9	$8,84 \pm 0,11$	48	9,3	8,0	8,3	$8,56 \pm 0,67$
72	8,6	8,6	8,8	$8,71 \pm 0,15$	72	8,7	8,7	8,9	$8,80 \pm 0,10$
Control BAL									
Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)	Tiempo (h)	Ensayos			Recuentos log(ufc/ml)
	1º	2º	3º			1º	2º	3º	
0	4,6	4,3	4,8	$4,60 \pm 0,23$	0	4,5	4,7	4,	$4,63 \pm 0,09$
24	8,2	8,1	8,1	$8,19 \pm 0,08$	24	5,3	5,3	5,3	$5,32 \pm 0,02$
48	8,9	8,7	8,6	$8,76 \pm 0,14$	48	6,3	6,3	6,2	$6,29 \pm 0,01$
72	9,0	9,1	8,7	$8,96 \pm 0,23$	72	7,3	7,3	7,3	$7,34 \pm 0,03$

¹ Valores corresponden al promedio del triplicado del experimento

ANEXO 15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS PRUEBAS DE COCULTIVO DE LA CEPA Lm ISP A DOS NIVELES DE % NaCl

ANEXO 15.1. Análisis de varianza (ANDEVA) A 1,5% NaCl.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:cepa BAL	7,4037	1	7,4037	507,68	0,0000
B:Tiempo	121,04	3	40,3467	2766,63	0,0000
INTERACTIONS					
AB	3,28435	3	1,09478	75,07	0,0000
RESIDUAL	0,233333	16	0,0145833		
TOTAL (CORRECTED)	131,961	23			

ANEXO 15.2. Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica. Method: 95.0 percent HSD.

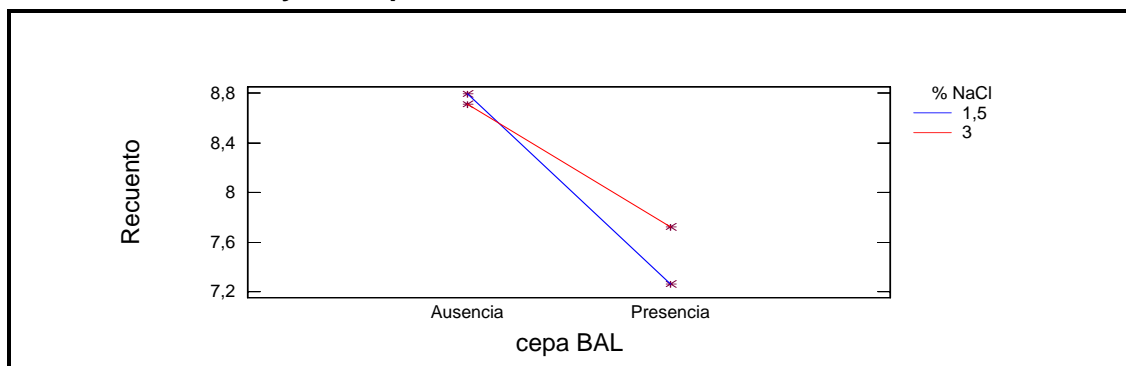
cepa BAL	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Presencia	12	6,17583	0,0348608	X
Ausencia	12	7,28667	0,0348608	X
Contrast		Difference		+/- Limits
Ausencia - Presencia		*1,11083		0,104513

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 15.3. Prueba de comparación múltiple de Tuckey para los recuentos por tiempo. Method: 95.0 percent HSD.

Tiempo	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	6	2,84167	0,0493007	X
72	6	7,99833	0,0493007	X
24	6	8,03167	0,0493007	X
48	6	8,05333	0,0493007	X

ANEXO 15.4. Prueba de interacciones para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica.



ANEXO 15.5. Análisis de varianza (ANDEVA) A 3,0% NaCl.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:cepa BAL	3,96094	1	3,96094	38,59	0,0000
B:Tiempo	138,473	3	46,1577	449,72	0,0000
INTERACTIONS					
AB	0,607046	3	0,202349	1,97	0,1589
RESIDUAL	1,6422	16	0,102638		
TOTAL (CORRECTED)	144,683	23			

ANEXO 15.6. Prueba de comparación múltiple de Tukey para los recuentos de los tratamientos con y sin cepa láctica. Method: 95.0 percent HSD.

cepa BAL	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Presencia	12	6,42333	0,0924831	X
Ausencia	12	7,23583	0,0924831	X
Contrast		Difference		+/- Limits
Ausencia - Presencia		*0,8125		0,277265

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 15.7. Prueba de comparación múltiple de Tuckey para los recuentos por tiempo. Method: 95.0 percent HSD.

Tiempo	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	6	2,67	0,130791	X
48	6	8,14833	0,130791	X
24	6	8,215	0,130791	X
72	6	8,285	0,130791	X