



Universidad Austral de Chile

---

Escuela de Ingeniería en Alimentos

**Aplicación por Aspersión de Bacteriocinas  
Lácticas sobre un Biofilm de *Listeria  
monocytogenes* en Acero Inoxidable**

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

**Angela José Alday Aguilera**

VALDIVIA – CHILE

2008

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:

---

Sra. Marcia Costa Lobo  
Ingeniero Civil Bioquímico  
Instituto de Ciencia y Tecnología de los  
Alimentos

---

Sr. Bernardo Carrillo López  
Ingeniero Agrónomo, M. Sc. e Ingeniería de  
Alimentos  
Instituto de Ciencia 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.

## ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Biofilm o biopelículas	3
2.1.1	Características generales	3
2.1.2	Estructura del biofilm	4
2.1.3	Etapas de desarrollo	4
2.1.3.1	Deteccion superficial y formación de estructuras reversibles	4
2.1.3.2	Maduración del biofilm	5
2.1.3.3	Propagación del biofilm	6
2.1.4	Biofilm como mecanismo de protección de microorganismo	7
2.1.5	Formación del biofilm en la industria alimentaria	7
2.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	8
2.2.1	Características generales	8
2.2.2	Listeriosis	8
2.2.3	<i>L. monocytogenes</i> como problema para la industria alimentaria	9
2.3	Bacterias ácido lácticas (BAL)	10
2.3.1	Características generales de las bacteriocinas	11
2.3.1.1	Clasificación de las bacteriocinas	11
2.3.1.2	Mecanismo de acción	12
2.3.2	Usos de las bacteriocinas	12
2.3.3	Ventajas y limitantes del uso de bacteriocinas	13
2.3.4	Aplicación de bacteriocinas en superficies y aspersion	14

Capítulo		Página
3	MATERIAL Y MÉTODO	15
3.1	Materiales y reactivos	15
3.2	Cepas de bacterias y medios de cultivo	15
3.3	Propagación de las cepas de bacterias ácido lácticas (BAL)	16
3.4	Obtención del extracto crudo de las tres bacteriocinas	16
3.4.1	Determinación de la actividad de las sustancias tipo bacteriocinas	16
3.5	Preparación de las probetas de acero para su inoculación	16
3.5.1	Limpieza de las probetas de acero inoxidable	17
3.6	Formación del biofilm de <i>Listeria monocytogenes</i> sobre las probetas de acero inoxidable	17
3.7	Visualización del biofilm de <i>Listeria monocytogenes</i>	18
3.8	Tratamiento del biofilm con STB	19
3.8.1	Aplicación de la mezcla de extractos crudos de la STB	19
3.8.2	Inactivación de las STB	20
3.8.3	Sonicado	20
3.9	Análisis de resultados	20
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1	Cultivo de las cepas BAL para la obtención de las STB	22
4.2	Formación de biofilm de <i>Listeria monocytogenes</i> con variación en las condiciones de tiempo y temperatura	23
4.3	Determinación del tiempo de sonicado	27
4.4	Desarrollo de un método para la aplicación de los tratamientos con STB por aspersión	28
4.4.1	Selección del asperjador para la aplicación de las STB	28
4.4.2	Diseño de un mecanismo de fijación de las probeta en soportes de acero durante su incubación	29

Capítulo		Página
4.4.3	Método de aplicación de las STB incorporando el asperjador y el mecanismo de fijación	29
4.5	Antagonismo de tres STB aplicadas por aspersión sobre un biofilm de <i>L. monocytogenes</i> 4/00 desarrollado sobre probetas de acero inoxidable.	31
4.5.1	STB aplicadas individualmente	31
4.5.2	Aplicación de una combinación de las tres STB	33
5	CONCLUSIONES	36
6	RESUMEN- SUMMARY	37
7	BIBLIOGRAFIA	39
	ANEXOS	48

**ÍNDICE DE CUADROS**

Cuadro		Página
1	Actividad de los extractos crudos de las tres cepas BAL desarrolladas en medios de cultivo con y sin tamponar	22
2	Recuento (log ufc/ml) de <i>L. monocytogenes</i> obtenido al incubar en CST a dos temperaturas en diferentes tiempos	23
3	Recuperación de células de <i>L. monocytogenes</i> después de aplicados los tratamientos con la mezcla de tres STB	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Etapas de desarrollo del biofilm sobre una superficie	5
2	Probetas de acero utilizadas para la formación del biofilm de <i>Listeria monocytogenes</i>	17
3	Observación por MEB de biofilm de <i>L.monocytogenes</i> desarrollado bajo distintas condiciones: a) 72 h a 10°C; b) 72 h a 10°C e incubado con una cubierta de AST a 25°C por 24 h ; c) 25°C por 72h	25
4	Visualización de biofilm formado a 25°C durante 72 h mediante microscopía de epifluorescencia (aumento de 100x)	26
5	Recuentos de <i>L. monocytogenes</i> obtenidos a partir de biofilm formados en probetas a 10 y 25°C e incubados durante 72 h	28
6	Aplicación de tratamientos sobre las probetas. (a) aspersores evaluados. (b) aspersor seleccionado para la aplicación de las STB. (c) asperjado de las STB. (d y e) montaje sobre el soporte. (f)Trípode con las probetas, incubadas en estufa a 10°C.	30
7	Recuento de <i>L. monocytogenes</i> (log ufc/cm <sup>2</sup> ) tratadas con las STBs individualmente durante 0,5h a 10°C sobre un biofilm formado a 25°C por 72h	31
8	Antagonismo de una combinación de tres bacteriocinas aplicadas a diferentes tiempos a 10°C sobre un biofilm de <i>L. monocytogenes</i> formada a 25°C por 72 h.	33

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Recuento de <i>L. monocytogenes</i> 4/00 en caldo (logufc/ml), obtenido al incubar a dos temperaturas en diferentes tiempos.	49
2	Recuperación de células de <i>L. monocytogenes</i> obtenido en un biofilm formado a 25°C por 72 h y luego incubado en agar a 25°C por 24 h y después de aplicados los tratamientos con la mezcla de tres STB.	49
3	Visualización del desarrollo de colonias de <i>L. monocytogenes</i> desarrolladas en la probeta control (sin tratamiento), la cual se cubrió con AST semisólido y se incubó por 48 h a 25°C	50
4	Análisis estadístico para el recuento de <i>L. monocytogenes</i> obtenido sobre las probetas incubadas a distinta temperatura y sonicadas a diferente tiempo	50
5	Recuento de <i>L. monocytogenes</i> obtenido al aplicar tres STB por aspersión sobre un biofilm desarrollado sobre probetas de acero inoxidable	52

## 1 INTRODUCCIÓN

La formación de biofilm por parte de bacterias patógenas es una problemática para las industrias de alimentos, ya que en condiciones adecuadas, es posible formar grandes comunidades de microorganismos, con una estructura y composición variada.

Una de las bacterias formadoras de biofilm en la industria es *Listeria monocytogenes*, la cual, una vez que ingresa, comienza una etapa de colonización en la que se adhiere a superficies, formando biofilm, imposible de detectar a simple vista, ocurriendo con frecuencia sobre materiales como: acero, vidrio, teflón o goma, elementos que forman parte de los accesorios y estructuras, dando origen a focos de contaminación.

Las bacterias que se ubican en las superficies entran en contacto con el alimento, contaminándolo, provocando infecciones bacterianas como la listeriosis, que puede llegar incluso a causar la muerte en poblaciones de riesgo.

En los últimos años se han intensificado las investigaciones en materia del biofilm, aumentando los estudios sobre métodos biológicos de inhibición de bacterias, contribuyendo con tecnología de gran potencial, que es posible utilizar en beneficio de la industria alimentaria. Uno de estos métodos es la utilización de bacterias ácido lácticas (BAL) y sus antagonistas que inhiben el desarrollo de *L. monocytogenes*, siendo las BAL reconocidas como seguras (GRAS) para la utilización en alimentos.

## HIPÓTESIS

La aplicación de una combinación de bacteriocinas, en proporciones iguales, a través, de un método por aspersión, permite observar un efecto inhibitor sobre un biofilm de *Listeria monocytogenes*, desarrollado sobre probetas de acero inoxidable.

## Objetivo general

Aplicar por aspersión, tres sustancias tipo bacteriocinas de bacterias ácido lácticas, sobre un biofilm de *Listeria monocytogenes* desarrollado sobre probetas de acero inoxidable.

## Objetivos específicos

- Lograr el desarrollo de un biofilm de *Listeria monocytogenes* sobre probetas de acero inoxidable.
- Desarrollar un método para la aplicación de las bacteriocinas por aspersión sobre una superficie de acero inoxidable.
- Evaluar la efectividad de tres sustancias tipo bacteriocinas para destruir *L. monocytogenes* aplicadas por aspersión sobre un biofilm, desarrollado en probetas de acero inoxidable.

## 2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biofilm o biopelículas

Los biofilm son comunidades de microorganismos adheridos a una superficie, (O'TOOLE **et al.**, 2000). DONLAN (2002), define a los biofilm como una serie de células microbianas unidas a una superficie, encerradas en una matriz extracelular amorfa. La asociación de distintos microorganismos le brinda heterogeneidad estructural y diversidad genética. Estos microorganismos pueden ser: bacterias, archaea, protozoos y algas. Cada uno con funciones metabólicas especializadas.

En la naturaleza, estos microorganismos pueden formar biofilm sobre distintos tipos de superficies, lo cual ocurre con frecuencia en el medio ambiente. Por ejemplo: sobre los dientes de las personas, piedras de riveras de ríos, hojas de plantas, suelos, sedimentos marinos y de agua dulce, tuberías de agua, cascos de barcos, etc.

**2.1.1 Características generales.** Las bacterias se ven beneficiadas al vivir en biofilm, ya que la matriz proporciona una barrera protectora contra fuerzas físicas y productos químicos tales como peróxido de hidrógeno y cloro, brindándole una ventaja competitiva sobre el medio que colonizan (NORWOOD y GILMOUR, 2000). La formación de los biofilm dependerá del tipo de bacteria, disponibilidad de nutrientes, las características del ambiente a colonizar (vidrio, PVC, teflón etc.), y de las condiciones ambientales adecuadas o microambientes que pueda generar (pH, tensión de O<sub>2</sub>, temperatura, concentración de iones, carbono, nitrógeno etc.). Si estas condiciones no son favorables y la bacteria ya formó biofilm, le permitirá permanecer en una forma latente por años e incluso promover la colonización de otras bacterias que se desarrollan en ambientes anaerobios. En las industrias elaboradoras de alimentos la bacteria puede estar expuesta a diversos nutrientes, lo que puede ocasionar la formación del biofilm en diversas superficies. (DJORDJEVIC **et al.**, 2002).

Los biofilm poseen una amplia capacidad de resistencia a la defensa del hospedero y en medicina humana las bacterias que se agrupan en biofilm son responsables de una serie de enfermedades que habitualmente no consiguen ser eliminadas completamente, como infecciones urinarias o problemas en el oído medio lo que lleva a la aparición de cuadros clínicos recurrentes pero no graves que hacen cada vez más difícil aislarla y eliminarla (MAH **et al.**, 2003; STEWART y COSTERTON, 2001).

**2.1.2 Estructura del biofilm.** Los mecanismos de desarrollo del biofilm han sido estudiados ampliamente en el área microbiológica, lo que permite indicar que el biofilm no es una estructura frágil, está formado básicamente de tres componentes: la primera, es una masa de células bacteriana constituida por un tipo o varios tipos de bacterias; la segunda, constituida por canales o espacios intracelulares, y la tercera, es la matriz extracelular compuesta por exopolisacáridos (EPS) que son secretados por las propias células, y en menor cantidad por proteínas, ácidos nucleicos, productos de la lisis de las bacterias y agua (KIEPEK-PEARSON y KARATAN, 2005).

La cercanía que existen entre las células de los biofilm y las interacciones de éstas con la superficie, facilitan una comunicación horizontal entre ellas y un intercambio de plásmidos, fagos o genes que tienen efecto sobre la densidad del biofilm y la fuerza de unión, según lo señalado por Vieira *et al.* (2003) citado por KIEPEK-PEARSON y KARATAN (2005).

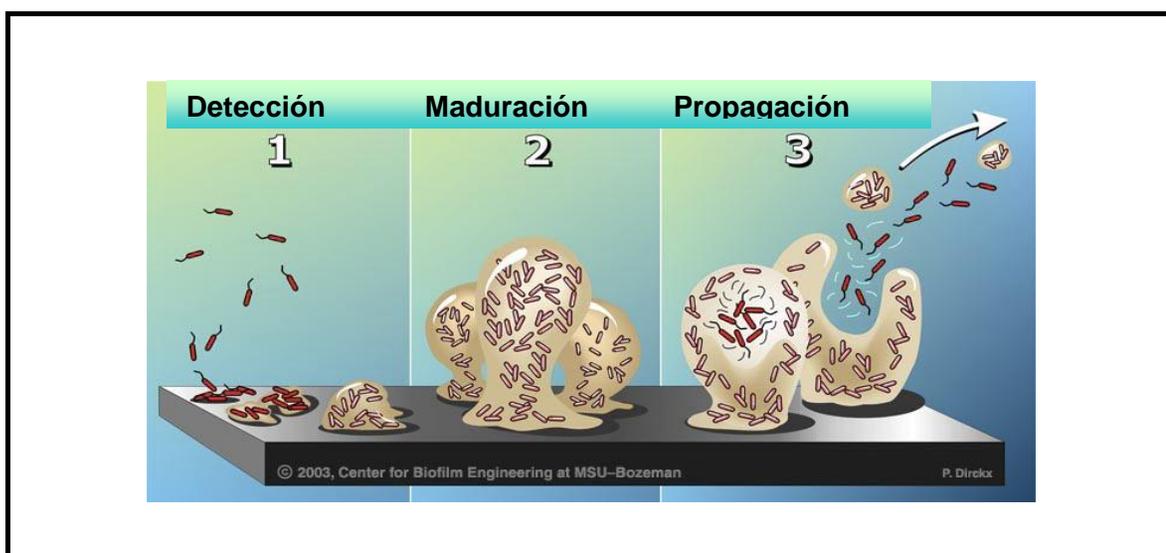
Las estructuras del biofilm pueden ser visualizadas utilizando una variedad de métodos microscópicos tales como: microscopía óptica, microscopía electrónica de transmisión (MET), microscopía láser, microscopía de fluorescencia, y microscopía de exploración confocal láser (SCLM), ésta última permite una visualización tridimensional no invasora.

**2.1.3 Etapa de desarrollo de biofilm.** El desarrollo del biofilm es un proceso complejo que aún no es completamente conocido. Existen autores que dividen el desarrollo en tres etapas, otros hasta cinco etapas (DAVEY y O`TOOLE, 2000; WATNICK y KOLTER, 2000). Según KIEPEK-PEARSON y KARATAN (2005), el desarrollo del biofilm se ha dividido en tres etapas como se muestra en la FIGURA 1. La primera es la etapa de detección superficial, en la cual la bacteria detecta las condiciones ambientales adecuadas para colonizar, aquí también comienza la formación de estructuras reversibles. La segunda etapa es la maduración del biofilm y la formación de microcolonias, dando paso a la etapa irreversible que dependerá de la formación de un exopolisacárido (EPS). La tercera etapa es la propagación del biofilm, en la cual las bacterias comienzan a expandirse y colonizar nuevas superficies.

Una de las propiedades del biofilm es su variabilidad fenotípica. Cuando las bacterias se desarrollan en el biofilm de una forma sésil, es decir, como organismo sujeto al sustrato, manifiestan un fenotipo diferente respecto del que manifiestan cuando crecen en forma planctónica. Los fenotipos desarrollados por las bacterias en forma sésil son mucho más resistentes a agentes antimicrobianos que los fenotipos de las bacterias en forma planctónicas (KIEPEK-PEARSON y KARATAN, 2005).

**2.1.3.1 Detección superficial y formación de estructuras reversibles.** En la etapa inicial los microorganismos se encuentran en una forma planctónica, es decir, nadan en un medio líquido en forma libre e independiente, con una determinada transcripción génica.

Cuando las bacterias encuentran una superficie apta para su desarrollo y las condiciones ambientales son favorables, comienzan a transportarse a través de estructuras en dos dimensiones y a desarrollarse de una forma débil, transitoria y reversible. Estas estructuras dependerán de la movilidad o inmovilidad de la bacteria. En el caso de las bacterias móviles, las estructuras son flagelos, pili y fimbriae. Los flagelos son necesarios para acelerar la etapa inicial de formación del biofilm, teniendo en cuenta que el tiempo de aceleración dependerá de la bacteria formadora del flagelo. El pili constituido por proteínas llamadas pilinas y fimbriae lo utilizan las bacterias para moverse y adherirse a las superficies bióticas o abióticas. Por otro lado, las bacterias inmóviles, requieren proteínas para la adhesión de superficies y algunos termoplásticos, como poliestireno (KIEPEK-PEARSON y KARATAN, 2005). Éstos, a pesar de no poseer flagelos, colonizan de una forma similar a las bacterias móviles, gracias al pili, que permite que las andesinas se adhieran a las superficies (STEPANOVIC *et al.*, 2004).



**FIGURA 1 Etapas de desarrollo de biofilm sobre una superficie.**

FUENTE: Center for biofilm engineering (2003). Disponible en <[http://sterilex.com/biofilm/the\\_science .asp](http://sterilex.com/biofilm/the_science.asp)>

**2.1.3.2 Maduración del biofilm.** Durante la etapa de maduración, las células experimentan cambios irreversibles en su estructura, los que se manifiestan, a través, de la formación de una monocapa con forma de hongo con canales de agua y poros que se adhieren fuertemente a las superficies, permitiendo el desarrollo de una microcolonia. Para mantener estas estructuras, se requiere una interacción estable entre las células (DANHORN y FUQUA, 2007). Para lograr esa estabilidad se produce una maduración y duplicación de células del biofilm, en la cual se sintetiza y secreta una matriz de exopolisacáridos (EPS).

Los EPS están compuestos por polisacáridos como alginatos o glicoproteínas de diversos azúcares como glucosa, fructosa, manosa, N-acetilglucosamina, entre otras. También pueden contener proteínas libres, fosfolípidos y ácidos nucleicos. Esta cápsula de polisacáridos, es la que cimienta la estructura del biofilm (KIEPEK-PEARSON y KARATAN, 2005)

Los EPS son muy importantes en la producción del biofilm, ya que el desarrollo y la maduración de éste están asociados con la producción de EPS. Además, facilitan la adherencia a las superficies y son responsables de la protección de las células bacterianas contra bacteriófagos (WEINER *et al.*, 1997). Actúan también como mecanismo almacenador de agua y nutrientes, encargándose de regular la entrada de oxígeno a las células.

La síntesis de EPS se relaciona con la disponibilidad de nutrientes que tenga la bacteria como: carbono, nitrógeno, potasio o fosfato. La limitación de ellos, provocará una disminución en la tasa de crecimiento bacteriano, lo que favorecerá el desarrollo de los EPS (AHIMOU, 2007). Estudios indican además, que la composición de los EPS es diferente para cada bacteria, como por ejemplo la bacteria *P. Aeruginosa* que secreta alginato, *S. typhimurium* que secreta celulosa y *S. aureus* que secreta Poly-N-acetilglucosamina, determinando incluso que una misma bacteria puede producir diferentes EPS como componente de su matriz *LASA et al.* (2005). Además, poseen la característica que una vez secretado, inhiben la formación del flagelo para evitar una desestabilización de la estructura del biofilm (KIEPEK-PEARSON y KARATAN, 2005).

Las células bacterianas secretoras de EPS se ubican en el interior del glicocalix en forma de cápsulas formando la cara externa. El glicocalix esta compuesto, además de los EPS por polímeros de azúcares, sustancias exógenas que puede encontrar en el ambiente y material de la pared celular (DUNNE, 2002). El glicocalix, por su parte, ayuda a la resistencia de células contra la desecación, ya que las cápsulas en sí, poseen muchos grupos polares, que al retener moléculas de agua, protegen a la célula, ayudando a detectar y concentrar minerales y alimentos esenciales del ambiente circundante, a través de un intercambio iónico (DUNNE, 2002).

La arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida, presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso en las zonas más profundas en el interior del biofilm. Este hecho no evita que en el interior del biofilm existan microambientes con pH, concentración de nutrientes y oxígeno diferentes, lo que termina por formar una gran comunidad de bacterias que conviven en diversos ambientes (KIEPEK-PEARSON y KARATAN, 2005).

**2.1.3.3 Propagación del biofilm.** Bajo condiciones favorables, la bacteria manifiesta un sistema de fosfotransferencia de dos componentes, es decir, proteínas específicas que se encargan de emitir señales químicas que se difunden, y otras proteínas que participan como reguladoras de respuestas, lo que permite una modificación de la

expresión de los genes y que, ayudan a la separación del biofilm. Las células vuelven a desarrollar cualidades planctónicas o de libre natación, usando estas cualidades como mecanismo para desplazarse de una superficie a otra, permitiendo colonizar nuevas superficies y asegurando la supervivencia a largo plazo de las bacterias y la nueva formación de un biofilm. Esta etapa, en la cual las células se separan del biofilm inicial, es por lo tanto, una etapa crítica en el ciclo vital de los biofilm (STOODLEY **et al.**, 2002).

**2.1.4 Biofilm como mecanismo de protección de los microorganismos.** Las bacterias pueden reaccionar a una serie de fluctuaciones ambientales tales como: la variación de temperatura, oxidación, baja disponibilidad de oxígeno, etc. Al asociarse entre ellas y formar biofilm, son mucho más resistentes a las fluctuaciones ambientales y a agentes antimicrobianos que en sus cualidades planctónica (HERRERA, 2004).

Los biofilm alojan una gran cantidad de microorganismos patógenos, brindando protección en contra de la acción de desinfectantes. Cuando el biofilm genera diferentes capas y se vuelve muy denso, el nivel de oxígeno en las capas internas de los biofilm disminuye, promoviendo el crecimiento de bacterias anaeróbicas (MARTINEZ **et al.**, 2004).

Existen diversos mecanismos que hacen de los biofilm un excelente medio de supervivencia de las bacterias, siendo una de ellas, la resistencia que presentan a los tratamientos con antibióticos. Los biofilm en su interior contienen agua y solutos de un tamaño similar al de los antibióticos, lo que permite que se difundan fácilmente a través de éste, pero no asegura que el antibiótico penetre y tenga algún efecto sobre los microorganismos, ya que la matriz de EPS limita el ingreso de nutrientes y sustancias, obstaculizando su difusión, a través, de las células. Además los biofilm una vez formados requieren de una baja disponibilidad de nutrientes para la mantención de los microorganismos, lo que permite una baja tasa de crecimiento en su interior. Este crecimiento lento es, a la vez, un mecanismo de resistencia en contra de los antibióticos, ya que éstos atacan las células de las bacterias cuando se encuentran en crecimiento exponencial (KIEPEK-PEARSON y KARATAN, 2005; HERRERA, 2004).

**2.1.5 Formación del biofilm en la industria alimentaria.** Existen en la naturaleza una gran cantidad de bacterias formadoras de biofilm (COSTERTON **et al.**, 1999). Muchas de éstas se transmiten, a través, de los alimentos y forman biofilm al interior de las industrias (DAESA, 2005). Algunas bacterias formadoras de biofilm en la industria de alimentos, son *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y especies de *Pseudomonas* spp. como por ejemplo: *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa*. (SHARMA y ANAND, 2002).

Otra bacteria patógena que forma biofilm en la industria alimentaria es *L. monocytogenes*, que a través de numerosos estudios se ha comprobado que posee la capacidad de adherirse y formar biofilm en metal, cristal y superficies de goma

(JOSEPH *et al.*, 2001). Es importante mencionar que la listeriosis se considera una enfermedad de transmisión alimentaria (ETA).

La formación de biofilm genera en muchos casos una problemática para las industrias, figurando como responsable de la corrosión de metales que se ve favorecida aún más, en superficies contaminadas. La corrosión ocurre cuando se daña el revestimiento de óxido, o cuando el oxígeno es eliminado de la superficie del metal por los microorganismos que habitan en el biofilm, destruyendo la superficie protectora del acero. El agotamiento del oxígeno en la superficie de acero, proporciona una condición para el crecimiento de los microorganismos anaerobios como las bacterias sulfato reductoras y las bacterias reductoras de hierro (MARTINEZ *et al.*, 2004).

Los biofilm son también causantes de una disminución de eficacia en los procesos de transferencia de calor, principalmente en los sistemas de enfriamiento, ocasionando pérdidas en la producción e incrementando los costos de mantenimiento, obligando a las industrias a detener sus procesos y organizar limpiezas periódicas a lo largo del día (MARTINEZ *et al.*, 2004). En la industria alimentaria, es posible ejercer un control del biofilm sobre las áreas de producción de alimentos, pero no es posible eliminarlo completamente.

## **2.2 *Listeria monocytogenes***

Su descubrimiento ocurrió en 1926, pero comenzó a surgir en la década del 80 como un microorganismo patógeno encontrado en alimentos.

**2.2.1 Características generales.** Es un bacilo corto Gram-positivo, no esporulado. Esta bacteria es un parásito intracelular facultativo, psicótrofa y móvil que se multiplica en un amplio rango de temperatura 3,0 a 45°C, siendo la óptima para su desarrollo entre los 30 a 37°C. El pH de su crecimiento varía entre los 5,0-9,6, con un pH óptimo de 7,5. Muere a los 75°C (FARBER y PETERKIN, 1991). Es posible aislarla desde la tierra, polvo, abono, agua estancada, agua cristalina, plantas, materias primas o alimentos procesados, que son almacenados a bajas temperaturas. Además *L. monocytogenes* posee la capacidad de sobrevivir a procesos que implican cambios de temperatura y actividad de agua como la congelación, calentamiento y secado.

**2.2.2. Listeriosis.** Los primeros métodos de aislamiento de *Listeria* spp. estaban generalmente basados en cultivos sobre agar plate count. Con el tiempo, a través, de medios de cultivo más selectivos se determinó que existían seis especies dentro del género *Listeria*: *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayii* y *L. monocytogenes*. Actualmente se ha comprobado que sólo *L. monocytogenes* es patógena para el ser humano y los animales (BEUMER y HAZELEGER, 2003).

La infección en humanos por *L. monocytogenes* ocurre principalmente por el consumo de alimentos contaminados. La bacteria ingresa al organismo por vía oral, sobrevive la digestión del estómago, en el tubo digestivo, produce endotoxinas y difunde desde los capilares a la sangre. Esta bacteria patógena provoca en humanos una tasa de mortalidad de un 20%. Está estimado que el 1% de los alimentos contaminados se encuentran infectados por *L. monocytogenes*, y que, aproximadamente 500 personas mueren al año por listeriosis (MEAD *et al.*, 1999; ANON, 2007).

Listeriosis es el término utilizado para referirse a una infección invasiva provocada por la bacteria *L. monocytogenes*. En adultos produce septicemia, meningitis (o meningoencefalitis), encefalitis, bacteremia, infecciones intrauterinas o cervicales. Se considera un patógeno oportunista, que afecta principalmente a recién nacidos y mujeres embarazadas, comprometiendo su sistema inmune y provocando aborto espontáneo (GELLIN y BROOME, 1989).

La listeriosis es declarada clínicamente, una vez que el microorganismo es aislado de algún medio que normalmente se encuentra estéril como: la sangre, el líquido cerebroespinal, o la placenta. La dosis requerida para infectar y enfermar es desconocida y dependerá de la cepa y la susceptibilidad del organismo para desarrollar la enfermedad, al igual que la manifestación de los primeros síntomas, que puede variar desde tres días hasta tres semanas FOOD DRUG ADMINISTRATION (FDA), 2006.

Los brotes de listeriosis se asocian a menudo en alimentos que se consideran microbiológicamente seguros, por su almacenaje a bajas temperaturas, o por su pH ácido, que inhibe el crecimiento de muchas bacterias e impide la supervivencia de microorganismos patógenos. En el caso de *L. monocytogenes* es capaz de adaptarse a estas condiciones, gracias a su capacidad de formar biofilm (GAHAN *et al.*, 1996).

**2.2.3 *L. monocytogenes* como problema para la industria alimentaria.** *L. monocytogenes* constituye una gran preocupación para la industria alimentaria por su amplia distribución, su capacidad de vivir a temperaturas de refrigeración (4°C), su tolerancia a altas concentraciones de sal (10 - 20%) y su resistencia a temperaturas de pasteurización (WALKER *et al.*, 1990; McCLURE *et al.*, 1991).

Esta bacteria se puede aislar de alimentos conservados en frío como: leche cruda, paté, pescado, carne, quesos y alimentos con un tratamiento térmico que se han contaminado posteriormente como: salchichas, hamburguesas, alimentos preparados, entre otros. La presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos procesados es generalmente el resultado de contaminación cruzada (BEUMER y HAZELEGER, 2003).

La formación de biofilm de *L. monocytogenes* en superficies es otro problema que ha sido investigado, encontrando que posee un espesor y composición variada ya que puede interactuar con otras bacterias formadoras de biofilm modificando su fenotipo, permitiendo adaptarse a diferentes superficies. Se tiene en conocimiento que la bacteria forma biofilm en vidrio, PVC, poliuretano, cerámica, teflón, acero y plásticos. Estos materiales, sobre todo los materiales plásticos y acero son muy utilizados en la industria alimentaria para la construcción de tanques, accesorios y superficies de corte. (DJORDJEVIC *et al.*, 2002; STEPANOVIC *et al.*, 2004). Por su parte, MORETRO *et al.*, (2000), indicaron que existe una mayor formación de biofilm de *L. monocytogenes* sobre acero inoxidable a 25°C por 24 h que en poliestireno, a 37°C por 24 h, favoreciendo el desarrollo del biofilm la adición de cloruro de sodio (5,4%) y de glucosa (entre 0,3 y 1,3%).

Se ha establecido una dosis mínima infectante de *L. monocytogenes*, y en muchos países la reglamentación alimentaria exige la ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g de alimentos listos para su consumo. (BEUMER y HAZELEGER, 2003). Es por esto, que al elaborar alimentos se debe evitar la contaminación de *L. monocytogenes* y asegurar la destrucción de los patógenos en caso de que se produzca contaminación, y así incrementar la calidad y vida útil de los productos.

Existen diversos métodos biológicos de eliminación de *L. monocytogenes* en la industria alimentaria, como por ejemplo, la aplicación de sustancias de origen orgánico que presentan un rol bactericida. MUÑOZ *et al.* (2006), estudiaron la efectividad antimicrobiana de extractos de romero y orégano en contra de *L. monocytogenes*, consiguiendo que al aplicar ambos, durante 6 h, redujeran la población casi totalmente de *L. monocytogenes* para ambos extractos, mostrando un efecto bactericida en contra de *L. monocytogenes*. XIE *et al.* (2003), por otra parte, estudiaron la actividad antimicrobiana del extracto de la hoja de *Ginkgo biloba*, a distintas concentraciones, en contra de *L. monocytogenes*, demostrando capacidad antagonista en contra de *L. monocytogenes*. Sin embargo, una buena alternativa biológica, que ha sido estudiada ampliamente, es el uso de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas, las cuales han sido efectivas en contra de *L. monocytogenes*, pudiendo incluso, reemplazar en un futuro antibióticos y conservadores químicos.

### **2.3 Bacterias ácido lácticas (BAL)**

Las bacterias ácido lácticas actúan inhibiendo el desarrollo de otros microorganismos, ya que compiten por los nutrientes, liberando al medio productos metabólicos como: bacteriocinas, ácidos orgánicos, amonio y peróxido de hidrógeno (Vandenbergh 1993 citado por THOMAS *et al.*, 1997). Las BAL poseen la capacidad de producir una o más bacteriocinas, dentro de una misma especie (CAROLISSEN-MACKAY *et al.*, 1997), y han sido estudiadas por producir bacteriocinas con actividad antimicrobiana en contra de bacterias patógenas, especialmente *L. monocytogenes* (SCHILLINGER *et al.*, 1993).

**2.3.1 Características generales de las bacteriocinas.** Las bacteriocinas son metabolitos bacterianos. JOERGER *et al.* (2000), las definieron como polipéptidos sintetizados ribozomalmente, con gran poder bactericida y/o bacteriostático, altamente específicos contra cepas de la misma especie o relacionadas.

Las bacteriocinas poseen una composición química muy variada y su biosíntesis ocurre en la fase logarítmica del desarrollo bacteriano, es por esto que se considera como un metabolito primario (PIARD y DESMAZEAUD, 1992). BÓRQUEZ (2000), por su parte, detectó que la actividad de las bacteriocinas fue aumentando a medida que se multiplicaba la cepa productora.

Las cepas productoras de bacteriocinas requieren de diversos factores para su crecimiento, siendo los más importantes el pH y la temperatura. Estudios de MATARAGAS *et al.* (2003), han demostrado que una producción mayor de bacteriocinas se obtiene, por lo general, a valores de pH y temperatura cercanas a las óptimas, y éstas dependerán de la bacteria productora de bacteriocinas. Además, su producción se ve favorecida en medios de cultivo enriquecidos con extracto de levaduras (MORETRO *et al.*, 2000).

Por otra parte, el comportamiento que presentan bajo condiciones extremas se puede manifestar con una reducción parcial o total de su actividad. Estudios de JACK *et al.* (1996), sometieron diferentes bacteriocinas a condiciones extremas de pH y temperatura, descubriendo que un aumento de temperatura a 40°C por 2 h a pH 2,0 y 3,0 no afecta la actividad bactericida, sin embargo, un aumento de temperatura sobre 100°C por 15 min a pH 4,0 o 5,0 redujo su actividad en un 50%. LARSEN *et al.* (1993), descubrieron que la bacteriocina bavaricin-A era muy estable entre pH 2,0 a 9,0, pero su almacenamiento a 4°C y pH 12,5 produjo una completa pérdida de actividad en 4 horas.

Otra característica que poseen las bacteriocinas, es su sensibilidad a las enzimas proteolíticas como la tripsina, quimotripsina y pepsina, las cuales degradan los constituyentes proteicos de las bacteriocinas, permitiendo ser digeridas fácilmente por el tracto digestivo (CHEN y HOOVER, 2003).

**2.3.1.1 Clasificación de las bacteriocinas.** Existen diversos tipos de bacteriocinas que provienen de diferentes BAL, lo que permite diferenciarlas y clasificarlas. Las bacteriocinas fueron divididas en dos grandes grupos, bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas. Las primeras, presentan un espectro antimicrobiano muy amplio, se caracterizan por ser termoestables, poseen mecanismos de transporte para la liberación de bacteriocinas y su producción no es necesariamente letal, teniendo un efecto generalmente bacteriostático, y en algunos casos bactericida. En cambio, las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram-

negativas producen lisis celular y dependen de su hospedero, presentando un efecto bactericida (CHEN y HOOVER, 2003).

Las BAL poseen, además, la capacidad de producir distintos tipos de bacteriocinas, las cuales fueron clasificadas como clase I, clase II y clase III.

- a) La clase I, recibe el nombre de lantibióticos ya que contiene aminoácidos como la lantionina. Éstos además, se subdividen en clase IA y IB diferenciándose por su estructura química y actividad antimicrobiana. Su tamaño fluctúa entre los 2 a 5 kDa.
- b) La clase II, por su parte, se subdivide en clase IIa, IIb y IIc. Se caracterizan por no contener aminoácidos lantibióticos, a ella pertenecen la mayoría de las bacteriocinas producidas por *Enterococcus*, los que se denominan como enterocinas. Además poseen amplia capacidad de inhibición de *L. monocytogenes*. Su tamaño es <10 KDa.
- c) La clase III que no posee subdivisiones, no se encuentra completamente caracterizadas, pero se conoce por tener un tamaño >30 kDa (CHEN y HOOVER, 2003).

Un ejemplo del grupo IA son las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas como *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* s. Producen la bacteriocina nisina que es ampliamente utilizada en los alimentos, por sus propiedades antimicrobianas. Inhibe el desarrollo de bacterias Gram-positivas y previene la formación de endosporas. Además, ha sido utilizada como iniciadora de cultivos fermentadores de carne y otros productos (THOMAS *et al.*, 1997).

Ejemplo del grupo II es la bacteriocinas de la bacteria *Carnobacterium piscicola* CS526 que produce la bacteriocina carnobacteriocin A. Estudios de YAMAZAKI *et al.* (2005), indican que la bacteria aislada de surími congelado posee una fuerte capacidad de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* sobre la superficie de salmones ahumados en frío.

**2.3.1.2 Mecanismo de acción.** Las bacteriocinas poseen diversos mecanismos de acción, pero tienen en común que para actuar, se deben fijar sobre un receptor específico de la célula. Según PUMAROLA *et al.* (1987), el mecanismo de acción se desarrolla en dos fases. En la primera, se produce una absorción sobre los receptores de la superficie bacteriana, seguida por una acción sobre el componente lipoprotéico de la membrana citoplasmática. En la segunda fase, se produce la lesión irreversible de la célula por acción sobre procesos como el metabolismo del ADN o la síntesis de proteínas y ARN.

**2.3.2 Usos de las bacteriocinas.** Existen diversos usos de las bacteriocinas. Desde 1988 la FDA aprobó en EE.UU. la comercialización de nisina, la primera bacteriocinas empleada como aditivo alimentario, utilizándola para prevenir la germinación de esporas de *Clostridium botulinum* en quesos. Desde entonces, otras bacteriocinas han

sido desarrolladas y caracterizadas con el fin de aprobar su uso (CHEN y HOOVER, 2003), empleándolas para realzar los sabores, y como método natural para la preservación de alimentos. Se ha incentivado la utilización de bacteriocinas en la industria alimentaria, con el fin de reducir el uso de preservantes químicos en alimentos y por esta razón se han denominado “los biopreservantes antimicrobianos naturales”. Las bacteriocinas también han sido usadas en alimentos como: carne curada, leche, embutidos, queso y pasta de soya (RILEY y WERTZ, 2002); y en otras áreas como medicina veterinaria, utilizando las bacteriocinas como tratamientos terapéuticos alternativos en reemplazo de los antibióticos.

**2.3.3 Ventajas y limitantes del uso de bacteriocinas.** Está comprobado que la utilización de las BAL en alimentos, es una forma segura de prevención de patógenos que se desarrollan en ellos. Durante años, las bacteriocinas han sido utilizadas en comidas fermentadas, sin una previa aprobación, es por esto que la FDA, considera su uso como seguro. Además, no causan riesgo a las personas como los antibióticos, ya que no son absorbidas como compuestos activos por el organismo (FDA, 2006).

Las bacteriocinas producidas por BAL, son estudiadas para aprovechar al máximo su uso y actualmente son utilizadas de las formas más diversas. SILVA **et al.** (2002), por ejemplo, utilizaron el sistema de secado en spray para tres bacterias ácido lácticas: *Carnobacterium divergens*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus sakei*. Estas fueron inoculadas en caldo y luego secadas por aspersión transformándose en polvo seco. Luego fueron rehidratadas, y con éstas, fueron producidas bacteriocinas que se aplicaron sobre *L. monocytogenes* incubada a 37°C por 24 h, demostrando que el sistema de secado en spray, no afecta la actividad antagonista de las bacteriocinas, hasta después de tres meses de almacenamiento a 4°C.

Existen algunas desventajas que obligan a limitar su uso, la principal, es la formación de resistencias, que ocurren naturalmente con la aparición de cepas mutantes que son resistentes a los componentes antagonistas, los cuales, pueden incluso producir diferencias en la formación de biofilm de *L. monocytogenes*. GRAVESEN **et al.** (2002), examinaron la respuesta que presentaban las bacteriocinas nisina y pediocin PA-1 sobre un cultivo de *L. monocytogenes*, encontrando resistencia por parte de las dos bacteriocinas. Por otra parte, BORUCKI **et al.** (2003), realizaron un estudio para conocer la formación de biofilm de *L. monocytogenes* en acero inoxidable y otras superficies, encontrando diferencias en la formación de biofilm en cepas de muestras aisladas de leche a granel, que se mostraron resistentes o sensibles frente a la utilización de bacteriocinas, demostrando una mayor formación de biofilm en aquellas con resistencias, las cuales se manifestaron como un biofilm denso y tridimensional. En cambio, las cepas que se manifestaron sensibles, produjeron un biofilm delgado e irregular.

Otra desventaja es la formación de metabolitos. NILSSON **et al.** (1999) y YAMAZAKI **et al.** (2005), indican que con frecuencia se ven afectados el sabor y la textura al utilizar altas dosis de bacteriocinas, debido a sus metabolitos, produciendo acidificación

en los alimentos. Además, se menciona el alto costo de producción, que sigue siendo un obstáculo muy relevante para el uso de bacteriocinas como aditivo alimentario, es por ello que existe una búsqueda constante de nuevas bacteriocinas y el desarrollo de la optimización de las existentes.

**2.3.4 Aplicación de bacteriocinas en superficies y aspersión.** Existen diversos estudios en los cuales se aplican bacteriocinas sobre *L. monocytogenes*, cultivada en superficies de acero inoxidable, caucho, teflón y vidrio. Estudios de SILVA (2004), fueron desarrollados utilizando placas de acero inoxidable, para incubar un biofilm de *L. monocytogenes*, luego de esto se le aplicó una combinación de STB. Los resultados indican que al utilizar las STB sobre superficies de acero inoxidable, es posible conseguir una efectiva inhibición de *L. monocytogenes* por 24 h y una reducción del desarrollo de células resistentes.

Por otro lado, el sistema de aspersión es empleado en la industria alimentaria para la utilización de desinfectantes como cloro u otros detergentes. WADE **et al.** (2003), por su parte, utilizó ozono (agente antimicrobiano con aplicación en alimentos en estado acuoso y gaseoso), en aspersión, como agua ozonificada, reduciendo significativamente *L. monocytogenes* inoculada semillas de alfalfa germinadas. Es por esto, que se investiga la utilización de bacteriocinas aplicadas por aspersión, sobre probetas de acero inoxidable cultivadas con un biofilm de *L. monocytogenes*, para utilizarla a futuro como un método para inhibir el crecimiento de ésta y evitar la formación de biofilm en los equipos y superficies de proceso industrial.

### 3 MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo consistió en aplicar una combinación de tres STB sobre un biofilm de *L. monocytogenes*, formado sobre probetas de acero inoxidable. Fue realizado en el Laboratorio de Fitopatología y Bacteriología del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile, en la ciudad de Valdivia, entre de agosto de 2007 y enero de 2008.

#### 3.1 Materiales y reactivos

Los materiales utilizados consistieron en material de laboratorio de uso común como: placas Petri, tubos de ensayo, frascos Schott de 100 ml, matraces, gradillas, pipetas, alcohol de 95<sup>o</sup>, agua destilada, etc. Los reactivos utilizados fueron: colorante naranja de acridina para la microscopía de epifluorescencia, glutaraldehído al 3% para la microscopia electrónica de barrido y buffer fosfato AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA).1992, para el lavado de las probetas.

#### 3.2 Cepas de bacterias y medios de cultivo

Se utilizó la cepa *L. monocytogenes* Lm 4/00 como cepa indicadora, aislada de salmón ahumado en frío (cepario ICYTAL, UACH). Ésta cepa se conservó congelada a  $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$  (freezer, Whirpool duplex 470) en caldo soya tripticasa (Becton, Dickinson and company) adicionado de un 1% de glicerol, como crioprotector. Para el cultivo inicial se inocularon 100  $\mu\text{L}$  de *L. monocytogenes* en 10 ml de caldo soya tripticasa (CST) y se cultivó por 18 h a  $25^{\circ}\text{C}$ .

Las cepas productoras de STB utilizadas fueron las bacterias ácido lácticas BAL-A aislada a partir de salmón ahumado en frío, BAL-B aislada a partir de carne envasada al vacío y BAL-C aislada a partir de salmón ahumado en frío, todas pertenecientes al cepario ICYTAL- UACH, las cuales se encontraban liofilizadas y almacenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Las cepas BAL-A y BAL-B fueron cultivadas en el caldo D-MRS (SCHILLINGER **et al.**, 1993; ZUÑIGA, 2002), basado en el caldo MRS (de Man Rogosa Sharpe), sin acetato, con 20 g/L de sacarosa, en reemplazo de la dextrosa). La preparación del inóculo inicial, fue realizada mediante la inoculación en 10 mL de caldo D-MRS, de una asada de la cepa liofilizada, hasta el desarrollo de turbidez. A partir de este cultivo, se realizó

una nueva inoculación de 100  $\mu\text{L}$  en 10 ml de CST, el cual se incubó a 25°C en aerobiosis por 24 h.

La cepa BAL-C fue cultivada en el caldo MRS, ajustada a pH a 6,5 y esterilizada a 121°C por 15 min y almacenada a  $4,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$  (Refrigerador Whirpool duplex 470). El cultivo inicial de BAL-C fue realizado del mismo modo que las otras dos cepas BAL, pero en caldo MRS, y se incubó a 30°C por 24 h.

### **3.3 Propagación de las cepas de bacterias ácido lácticas (BAL)**

Para la propagación masiva de las tres cepas BAL, fueron preparados, el inóculo inicial y los caldos respectivos para cada BAL (3.2). Cada matraz con 50 ml del caldo fue tamponado con buffer fosfato de sodio 20 mM ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  9,71 g/L+  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3,16 g/L), obteniendo un pH 6,5. Posteriormente fue inoculado al 1% (500  $\mu\text{L}$ ) e incubados en agitación a 100 rpm (agitador orbital, Barnstead Lab-line, Internacional). El propósito del cultivo masivo de bacterias fue obtener la cantidad necesaria de STB para el trabajo posterior, a partir de los sobrenadantes.

### **3.4 Obtención del extracto crudo de las tres bacteriocinas**

Una vez desarrollados los cultivos se obtuvo el sobrenadante de las tres cepas centrifugando a 7690 x g (9000 rpm) (Hettich, modelo D-78535) por 10 min a 4°C. Al sobrenadante se le ajustó pH a  $6,5 \pm 0,2$  con NaOH 1 N, y posteriormente fue esterilizado por filtración (0,22  $\mu\text{m}$ , Millipore Corporation Bedford, MA). Al extracto crudo se le determinó la actividad (UA/mL) (3.4.1), y se almacenó a -18°C.

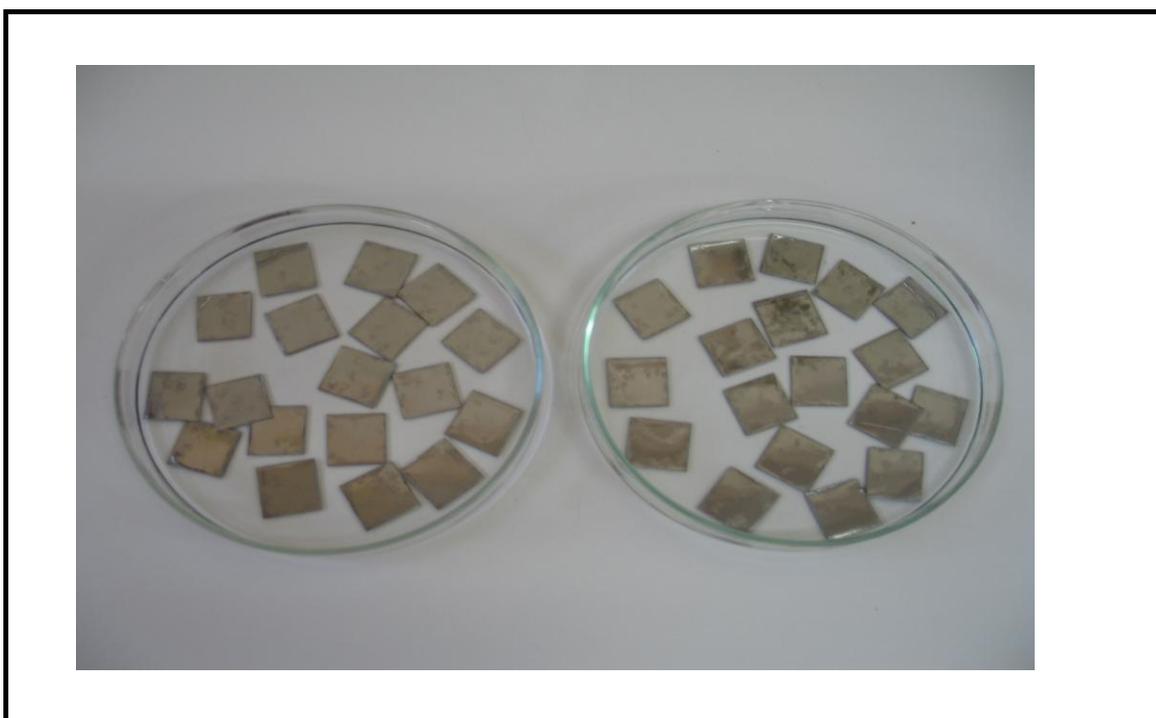
**3.4.1 Determinación de la actividad de las sustancias tipo bacteriocinas.** Se determinó la actividad (UA/mL) de las tres bacteriocinas (BAL-A, BAL-B, BAL-C), y de la mezcla (A+B+C) (1:1:1), mediante la técnica de “gota sobre césped” (BAREFOOT y KLAENHAMMER, 1983), que fue descrita por GONZALES (2004). Para la prueba se realizan diluciones seriadas (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, etc.), con el sobrenadante de las STB en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,0 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  +  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ). Éstos fueron colocados sobre un césped de *L. monocytogenes* e incubadas a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 h y posteriormente a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 h. Las unidades de actividad fueron determinadas, calculando el recíproco de la última dilución con halo, considerando positivos los halos transparentes y delimitados.

### **3.5 Preparación de las probetas de acero para su inoculación**

Para la formación del biofilm se utilizaron probetas de acero inoxidable N° 304 de dimensiones 20X20 mm y de espesor 4,0 mm. Como características generales tenían

en su composición >10,5% de cromo, que es austenítico, es decir, contiene >7,0% de níquel y no es magnético en estado recocido, posee un bajo contenido de carbono, con respecto a otras aleaciones, lo que le brinda una mejor resistencia a la corrosión (WIKIPEDIA, 2007). Estas probetas fueron previamente limpiadas y lavadas (3.5.1). En la FIGURA 2 se muestran las probetas de acero que fueron utilizadas para la formación de biofilm de *L. monocytogenes*.

**3.5.1 Limpieza de probetas de acero inoxidable.** Para la limpieza de las probetas se utilizó el método de HOOD y ZOTTOLA (1997), descrito por SILVA (2002). Este fue modificado, adicionándole un lavado inicial con detergente líquido comercial (Quix, Lever S.A., Santiago, Chile), un posterior enjuague con abundante agua y un escobillado manual, con el fin de retirar cualquier suciedad adherida. Luego, se continuó con el método descrito originalmente.



**FIGURA 2** Probetas de acero utilizadas para la formación de biofilm de *L. monocytogenes*.

### **3.6 Formación de biofilm de *L. monocytogenes* sobre las probetas de acero inoxidable**

Para la formación de biofilm de *L. monocytogenes* sobre probetas de acero inoxidable se evaluaron diversos tiempos y temperaturas, con el objetivo de encontrar la

formación de biofilm adecuada, para la utilización de los tratamientos con STB. Los tiempos y las temperaturas evaluados fueron:

- tiempo 72, 96 y 120 h en agitación a 60 rpm y 10°C
- tiempo 72 h a 10°C en agitación a 60 rpm y una posterior incubación de las placas a 25°C por 24 h
- tiempo 72 h en agitación a 60 rpm y 25 °C

Los resultados obtenidos se presentan en la sección (4.2), fijando finalmente como el tiempo más adecuado las 72 h, con agitación a 25°C. El procedimiento realizado fue el siguiente: 10 ml de CST fueron inoculados con 100 µL de un cultivo de 18 h de *L. monocytogenes* (3.2) e incubados a 25°C por 18 h, obteniéndose un recuento inicial de *L. monocytogenes* 4/00 de  $1,0 \times 10^8$  ufc/ml. De este cultivo fueron extraídos 2 ml que se inocularon en frascos Schott que contenía 20 ml de CST, con bajo contenido de nutrientes, (10 g/L en lugar de la formulación original que requiere de 30 g/L) (JEONG y FRANK, 1994). Posteriormente, se incorporó la probeta de acero inoxidable con una pinza y se incubaron los frascos por 72 h en un agitador orbital a 60 rpm (Barnstead Lab-line Internacional), a una temperatura de 25°C. También se realizó el recuento inicial de bacterias inoculadas en el caldo, utilizando la técnica de recuento en superficies en agar soya tripticasa (AST), INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). 1988.

Las probetas con el biofilm de *L. monocytogenes* ya adherido, fueron sacadas del medio de cultivo (CST) con pinzas y lavadas, para remover las células no adheridas. Para este lavado fueron colocadas en frascos Schott con 40ml de solución de sal triptona (triptona al 0,1 % y NaCl al 0,85 %, pH 7,2), en agitador orbital (Stuart, orbital shaker, modelo N° SSL1, UK), a 100 rpm por 2 min (CHAVANT *et al.*, 2002). Se realizaron 3 lavados consecutivos, posteriormente las probetas fueron secadas en una cámara de flujo laminar por 15 min (Labconco Corporation).

### **3.7 Visualización del biofilm de *L. monocytogenes***

El biofilm fue observado a través de la técnica de desarrollo en agar, microscopía electrónica de barrido y microscopía de epifluorescencia.

a) Desarrollo en agar: para visualizar el desarrollo de colonias del biofilm de *L. monocytogenes*, se colocó la probeta cultivada sobre una placa con AST, se cubrió con 7 ml de AST semisólido y se incubó por 48 h a 25°C.

b) Microscopía electrónica de barrido (MEB). Trabajo realizado por el profesor Ricardo Silva, encargado del Laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto de Histología

de la Facultad de Medicina, de la Universidad Austral de Chile. Para observar el biofilm una vez formado (3.6) se continuó con el siguiente protocolo:

- la muestra fue colocada en glutaraldehído al 3%
- almacenada a 4°C por un tiempo mínimo de 6 h, (mientras mayor el tiempo de fijación del glutaraldehído, mejor es su visualización)
- posteriormente se realizaron 2 lavados con buffer (APHA, 1992) para retirar el fijador
- se aplicó una batería alcohol-etanol por 5 min, en el siguiente orden: 15°, 30°, 50°, 70°, 96° y 100°, cada lavado se realizó 2 veces
- las muestras fueron colocadas en un porta muestra y sombreados con oro palado de 10 A°
- finalmente las muestras fueron observadas al microscopio (Zeiss Electron Optic, modelo LEO 420).

c) Microscopía de Epifluorescencia: la muestra se tiñó con naranja de acridina. Esta técnica permite la visualización del biofilm y células de *L. monocytogenes*. Se realizó una vez incubadas las placas como se describe en (3.6), modificando un lavado con sal triptona. El protocolo fue el siguiente:

- lavado de las probetas con 50 ml de buffer (APHA, 1992), para retirar células no adheridas a la placa
- aplicación de metanol (Merck, 99.9% de concentración) por 5 min sobre las probetas de acero, con el fin de fijar las bacterias adheridas
- secado al aire por 3 min en oscuridad
- tinción de las placas con naranja de acridina (Merck), 20 mg disueltos en 190 mg de Buffer Acetato de Sodio 1 M, por 2 min.

Finalmente las muestras fueron observadas bajo un microscopio de epifluorescencia (ZEISS, Germany) en el Instituto de Microbiología Clínica de la Facultad de Medicina, de la Universidad Austral de Chile, con aumento de 100 x/0,65 usando un filtro azul.

### **3.8 Tratamiento del biofilm con las STB**

La aplicación de los tratamientos se realizó a través de un sistema de asperjado y un soporte, que mantuvo las probetas en forma horizontal.

**3.8.1 Aplicación de la mezcla de extractos crudos de la STB.** Para la aplicación por aspersión de las STB sobre las probetas con el biofilm, fue necesario seleccionar el asperjador adecuado para la aplicación de las STB (4.4.1), y se diseñó un soporte para probetas, que permitiese aplicar el producto de manera similar a la que se aplicaría en

superficies de acero de una industria de alimentos (4.4.2), por lo tanto, esta etapa será descrita como parte de los resultados (4.4.3).

- Los tiempos de acción de las STB fueron: tiempo 0 (control); 0,5; 1,0; 6,0 y 24 h.

- Control. La probeta con el biofilm de *L. monocytogenes* formado (3.6) sin tratamiento de STB se utilizó como control. De acuerdo a los tiempos, éstas fueron incubadas en la estufa a 10°C (4.4.3) y fueron colocados directamente en un frasco Schott que contenía 20 ml de sal triptona estéril pH 7,2. Posteriormente fue sonificado 3,5 min y se realizó recuento en placa sobre AST incubando a 25°C ± 2°C por 48 h. La probeta también fue colocada en una placa con AST y sobre ésta se colocaron 7 ml de AST semisólido e incubados a 25°C ± 2°C por 48 h.

**3.8.2 Inactivación de las STB.** Una vez transcurridos los tiempos de acción, las probetas de acero que fueron tratadas con STB fueron inactivadas utilizando la enzima papaína, la cual se encontraba en tabletas (Pfizer, papaenzima M.R. 1 mg/mL). Cada tableta contenía 5 mg de la enzima, la cual fue diluida en 5 ml de buffer fosfato 0,1 N, pH 7,0 (APHA, 1992), según lo descrito por ZAMBRANO (2008). Para la inactivación, se sumergió la probeta en la enzima disuelta en frasco Schott y se agitó por 3 minutos a 20°C, en un agitador orbital (Stuart, orbital shaker, modelo N° SSL1, UK). Luego se realizó un lavado con 40 ml de sal triptona pH 7,2, el que tuvo como fin eliminar la enzima remanente.

**3.8.3 Sonificado.** El siguiente paso tuvo por objetivo desprender el biofilm, para el recuento de células viables remanentes después del tratamiento con las STB. Para ello, las probetas se colocaron en frascos Schott que contenían 20 ml de sal triptona pH 7,2, y se realizó un sonificado por 3,5 min (Sonicador Modelo Ultrasonik 2 QT/H, 220V 50/60 HZ), según los parámetros de SILVA, (2004) y CHAVANT **et al.** (2002). Previamente se realizaron experimentos, a fin de determinar el tiempo de sonificado necesario para que las células se desprendiesen sin ser destruidas (4.3), el cual resultó a los 3,5 min (ZAMBRANO 2008). El recuento de células viables desprendidas, se realizó en placa por la técnica de superficie (ICMSF, 1988), sobre AST, las placas se incubaron a 25°C ± 2°C por 48 h. Para verificar si aún habían células adheridas, las probetas fueron colocadas en placas cubiertas con AST (semisólido) (3.7). Finalmente se incubaron a 25°C ± 2°C por 48 h.

### 3.9 Análisis de resultados

Para la prueba de antagonismo de la mezcla se utilizó un diseño factorial 2x5x3x3, es decir, 2 tratamientos (con mezcla de STB y sin STB); 5 tiempos de exposición y 3 repeticiones realizadas en 3 observaciones.

Para la prueba de antagonismo de las STB aplicadas individualmente, se utilizó un diseño factorial 4x2x3, es decir, 4 tratamientos (STB individuales y control), 2 repeticiones y 3 observaciones.

Para ambas pruebas la variable de respuesta fue recuento en placa de *L. monocytogenes*. Mediante el programa estadístico Statgraphics 5,1 plus. Se realizó el análisis de los resultados obtenidos, a través, de análisis de varianza y el Test de Comparación Múltiple de Tukey DHS, con un intervalo del 95 % de confianza para verificar la efectividad de los tratamientos en relación al recuento inicial, y determinar si la reducción de colonias de *L. monocytogenes* fue o no significativa para ambos casos.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Cultivo de las cepas BAL para la obtención de las STB

Las cepas BAL fueron cultivadas en los caldos D-MRS y MRS, los que fueron preparados en dos modalidades: con buffer fosfato de sodio (3.2), logrando un pH 6,5, y con agua destilada. El objetivo era determinar si existían variaciones en la actividad de las STB al utilizar uno de los dos métodos. Los resultados obtenidos se describen en el CUADRO 1.

**CUADRO 1 Actividad de los extractos crudos de las tres cepas BAL desarrolladas en medios de cultivo con y sin tamponar.**

Tratamientos	Medio de cultivo	Cultivo cepa en caldo con agua destilada UA/ml*	Cultivo cepa en caldo con buffer UA/ml*
STB-A	D-MRS	400	800
STB-B	D-MRS	200	400
STB-C	MRS	3200	25600
STB-A+B+C	MRS y DMRS	1600	12800

\* Valores obtenidos en dos experimentos con idénticos resultados

Es posible observar que al utilizar buffer fosfato resultó más efectivo, ya que se obtuvo un incremento de la actividad para las tres STB. Este incremento fue mayor para el caso la cepa STB-C. Esta prueba permitió determinar que la actividad de la mezcla STB A+B+C, la cual también fue ocho veces mayor en comparación con los valores obtenidos con agua destilada. Al preparar el medio de cultivo con una solución tampón, permite que el pH del medio se mantenga constante en el tiempo ya que se neutraliza el posible efecto inhibitor de los ácidos orgánicos, producidos por la bacteria. Con agua destilada, en cambio, ocurre una baja del pH lo que se traduce finalmente en una

disminución de la actividad. Estudios realizados por LAMA (2002), permitieron establecer la relación existente entre el pH y la producción de STB, a través, del desarrollo de *C. piscicola* L103, en caldo D-MRS tamponado. La autora determinó que el pH óptimo de crecimiento fue de 6,5 y que el medio tamponado permitió mantener el pH constante, aumentando los niveles de actividad de la STB.

#### 4.2 Formación de biofilm de *L. monocytogenes* con variación en las condiciones de tiempo y temperatura

Para la formación de biofilm, fueron realizados experimentos preeliminares que permitieron determinar el crecimiento de *L. monocytogenes* en CST, en agitación a diferentes tiempos y temperaturas, 72, 96 y 120 h a 10°C y 72 h a 25°C. Los resultados obtenidos se presentan en el CUADRO 2 y en el ANEXO 1, donde se observa que existió un aumento en los recuentos de *L. monocytogenes* en el caldo para ambas temperaturas. Se optó por formar biofilm incubando las placas de acero inoxidable a 10°C durante 72 h, ya que se buscaba incubarlas en un tiempo similar al que se podría formar un biofilm en una industria de alimentos, sin aplicar un programa de limpieza sobre superficies.

Por otra parte, se comprobó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), que la formación del biofilm era muy débil ya que a esta temperatura la bacteria recién iniciaba su adhesión a la probeta de acero, como se indica en la FIGURA 3a.

**CUADRO 2 Recuento de *L. monocytogenes* (log ufc/ml) obtenido al incubar en CST a dos temperaturas en diferentes tiempos.**

Tiempo \ Temperatura	inicial	72 h	96 h	120 h
10°C*	7,7 ± 0,3	8,8 ± 0,4	9,6 ± 0,4	9,5 ± 0,6
25°C**	8,2 ± 0,4	11,5 ± 0,5	NR***	NR

\* Los valores corresponden al promedio de 12 determinaciones (dos repeticiones, con seis observaciones cada uno)

\*\* Los valores corresponden al promedio de seis determinaciones (dos repeticiones, con tres observaciones cada uno)

\*\*\* Indica no realizado

Estudios de JEONG y FRANK (1994), señalaron que *L. monocytogenes* puede desarrollar biofilm a 10°C. CHAVANT *et al.* (2002) por su parte, analizaron el crecimiento de biofilm a 8, 10, 20 y 37°C, comprobando una notoria reducción en la tasa de crecimiento a 8 y 10°C, en comparación con las dos temperaturas más altas. Por lo tanto, se modificó el protocolo para estudiar la formación de biofilm incubando a

mayor temperatura, y se cubrió la probeta con agar con el fin de favorecer el desarrollo de éste. Finalmente, el protocolo se estructuró de la siguiente manera:

- formación de biofilm por 72 h a 10°C en agitación a 60 rpm
- tres lavados en agitación a 100 rpm x 2 min para eliminar células no adheridas
- recubrimiento de la probeta de acero con AST (semisólido)
- incubación de las placas a 25°C por 24 h
- retiro de la probeta del agar aplicación del tratamiento con las STB por 0,5 h

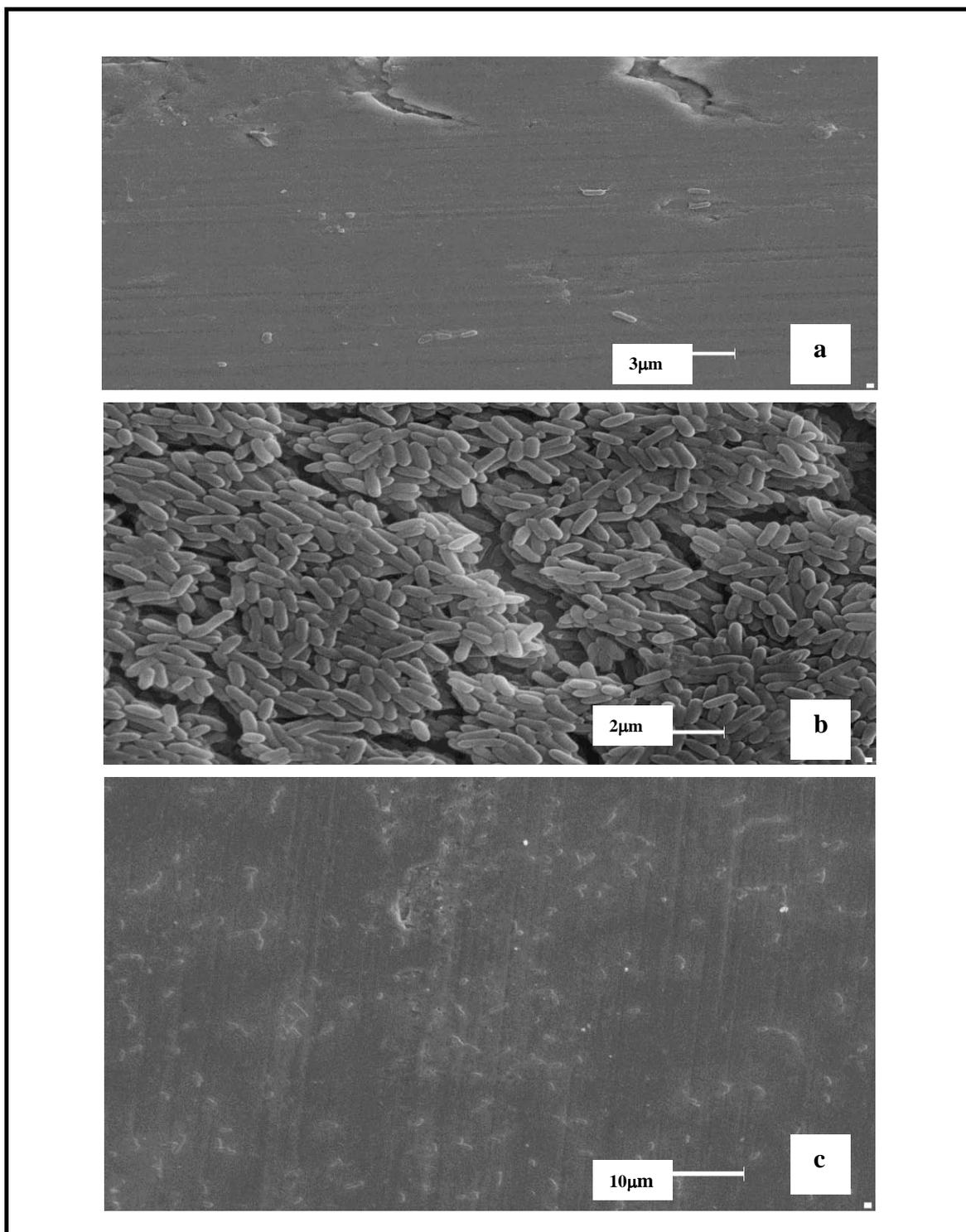
Esta metodología permitió visualizar, a través de la MEB, la formación de un biofilm que cubrió una mayor superficie de la probeta y fue más resistente al desprendimiento (FIGURA 3b). En el CUADRO 3 se observan los resultados obtenidos de las probetas con biofilm tratados a distintos tiempos con una mezcla de las tres STB en proporciones iguales (1:1:1) y con un valor de actividad de 12,800 UA/ml. En la probeta sonicada se observa que al tiempo cero (probeta sin tratamiento) hubo un recuento de  $2,1 \times 10^4$  ufc/cm<sup>2</sup> y 38 colonias desarrolladas sobre las probetas después de sonicadas. A las 0,5; 1,0; 6,0 y 24 h de tratamiento con las STB hubo un recuento en la probeta sonicada de  $<1,0 \times 10^1$  ufc/cm<sup>2</sup>, es decir, ausencia de crecimiento. Sin embargo, se desarrollaron colonias sobre la probeta de acero, después de aplicados los tratamientos, incluso durante 1 hora. En el ANEXO 2, se encuentran los valores de los recuentos expresados en log ufc/cm<sup>2</sup>.

**CUADRO 3 Recuperación de células de *L. monocytogenes* después de aplicados los tratamientos con la mezcla de tres STB (12.800 UA/ml).**

PROBETA SONICADA (3,5 min) (ufc/cm <sup>2</sup> )					
Tiempo Recuento Probetas*	Tpo 0	0,5 h	1,0 h	6,0 h	24 h
Sonicadas	$2,1 \times 10^4$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
posterior al sonicado	38	10	8	0	0

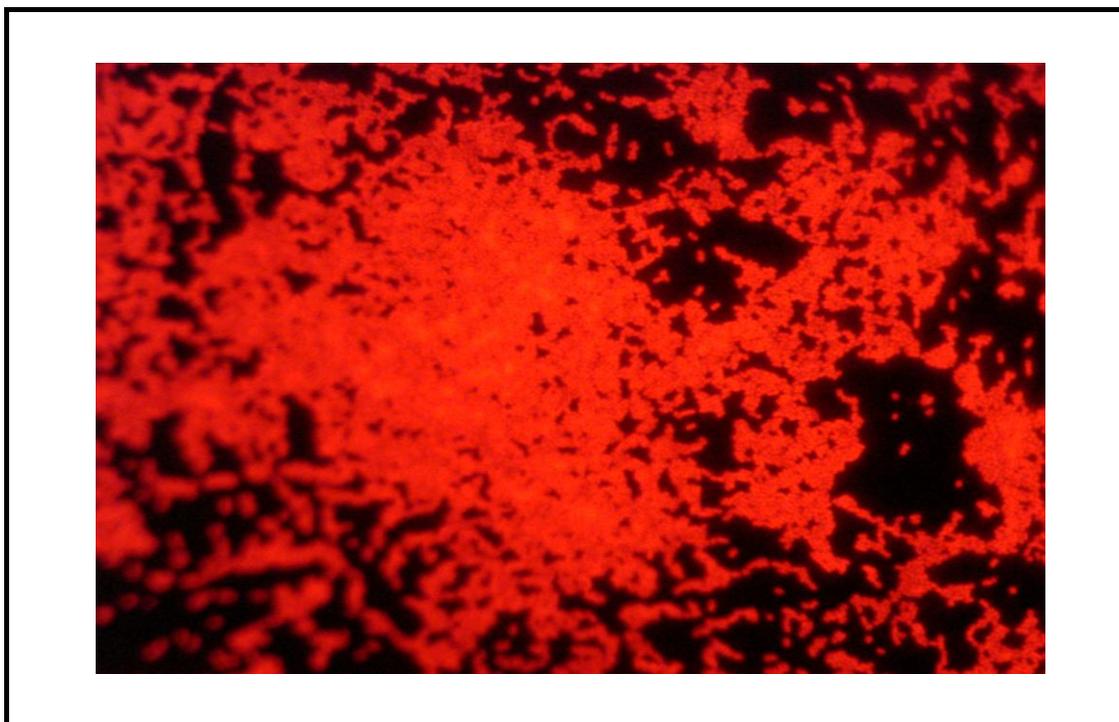
\* Los valores corresponden al promedio de 3 determinaciones (una repetición, con tres observaciones)

Los biofilm formados con esta técnica no reflejaban, sin embargo, la formación de biofilm en una industria, ya que se dieron las condiciones óptimas para la bacteria, con formación de una capa muy densa y tridimensional. Por lo cual, se optó incubar las probetas de acero inoxidable a 25°C por 72 h (ZAMBRANO, 2008), ya que mediante MEB se observó que había una formación de biofilm adecuado, con la cantidad suficiente de células para aplicar los tratamientos (FIGURA 3c).



**FIGURA 3** Observación por MEB de biofilm de *L. monocytogenes* desarrollado bajo distintas condiciones: a) 72 h a 10°C (aumento 15.99 Kx). b) 72 h a 10°C e incubado con una cubierta de AST a 25°C por 24 h (aumento 28.72 Kx). c) 25°C por 72 h (aumento 7.94 Kx).

Para corroborar estos resultados, se utilizó la microscopía de epifluorescencia, en la cual se observaron las células adheridas a la probeta de acero y se determinó que efectivamente *L. monocytogenes* era capaz de formar biofilm bajo estas nuevas condiciones (FIGURA 4). Para la observación, las células fueron teñidas con naranja de acridina, el cual se une al ácido nucleico de las células coloreando las paredes de la bacteria, produciendo una visualización de color anaranjado, producto del colorante (DÍAZ, 2006). RÍOS (2002), estudió la formación de biofilm de distintas bacterias sobre probetas de cobre, utilizando para su visualización microscopía de epifluorescencia, considerándolo un buen método de observación, por ser sencillo y de menor costo que la MEB.



**FIGURA 4.** Visualización de biofilm formado a 25°C durante 72 h mediante microscopía de epifluorescencia (aumento 100x).

Estudios de GAMBLE y MURIANA (2007), señalaron que uno de los factores que más ayudan a la formación del biofilm de *L. monocytogenes*, y a la adhesión de éste a las probetas y superficies, son los flagelos, y que éstos comienzan a expresarse con mayor fuerza entre los 25 a 37°C. Resultados similares observaron WAY *et al.* (2004) y WILLIAN *et al.* (2005), indicando además, que algunas cepas cultivadas a temperaturas inferiores mostraron una ligera adhesión a las superficies. BIGOT *et al.* (2005), también realizaron estudios sobre flagelos, detectando que estos son producidos a una temperatura entre 4 y 30°C, reduciendo su producción significativamente entre los 37 y 42°C.

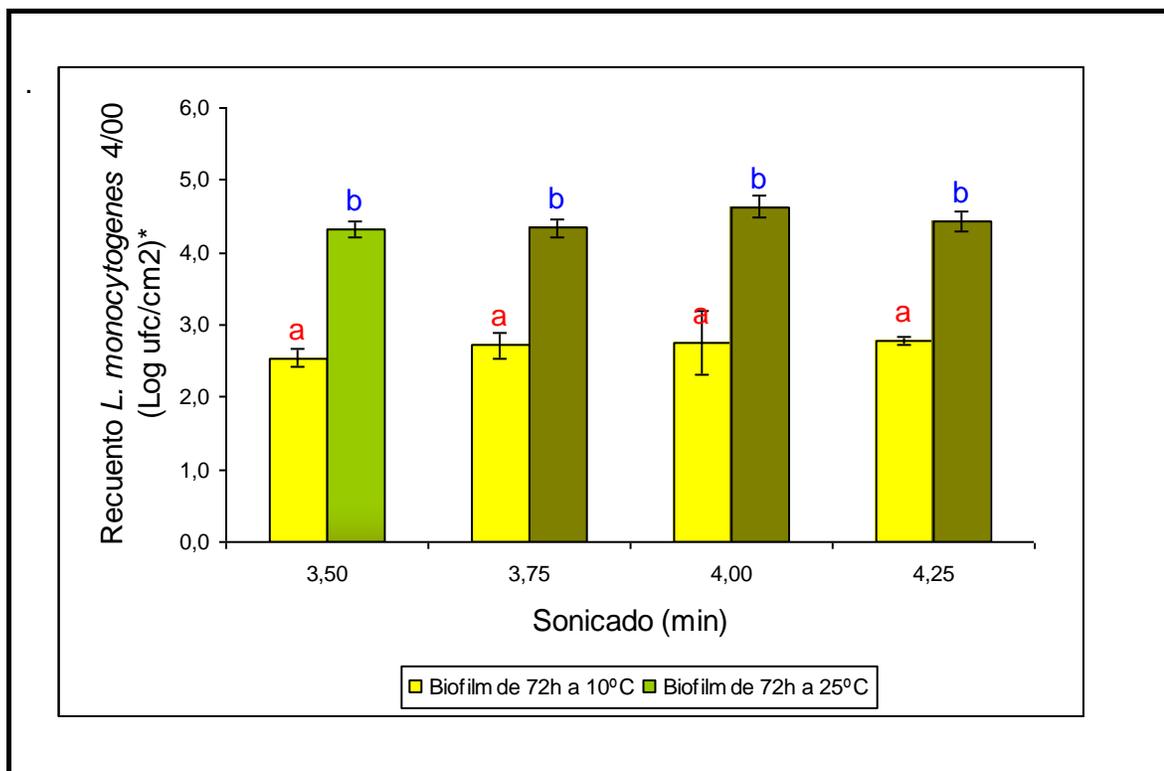
Otro factor de importancia son las propiedades físico-químicas de la superficie de adherencia, ya que influyen en la adhesión de células bacterianas y sobre la formación del biofilm de *L. monocytogenes*. CHAVANT *et al.* (2002), realizaron estudios en una planta procesadora de alimentos, comparando la formación de biofilm de *L. monocytogenes* en una superficie de acero inoxidable (hidrofílico) y politetrafluoroetileno o teflón (hidrofóbico), utilizando MEB y microscopía de epifluorescencia. Los resultados obtenidos indicaron que fue más rápida la formación de biofilm en superficies hidrofílicas (acero inoxidable), que hidrofóbicas (teflón), a 8°C por 3 días, presentando formación de una monocapa bacteriana en el acero y no observando crecimiento en teflón. Sin embargo, después de 5 días a 20 y 30°C la estructura del biofilm era tridimensional para ambos materiales.

### 4.3 Determinación del tiempo de sonicado

Para la utilización de la técnica de sonicado, existieron una serie de parámetros preestablecidos (SILVA, 2004; ZAMBRANO, 2008). Sin embargo, faltaba establecer el tiempo de sonicado de las probetas de acero inoxidable. Para ello, se formó el biofilm de *L. monocytogenes* (3.6) y se sonicó (3.8.3) sin aplicación de los tratamientos. El objetivo era lograr el desprendimiento del biofilm a fin de obtener los recuentos después del tratamiento con las STB, asegurándose que no había destrucción de células viables. Se eligieron cuatro tiempos de sonicado: 3,50; 3,75; 4,00; y 4,25 min en base a los estudios efectuados por ZAMBRANO (2008), quien utilizó como referencia a CHAVANT *et al.* (2002), con un tiempo de sonicado de 3 min y SILVA (2004), quien estableció un tiempo de 2 min. Debido a que inicialmente el biofilm de *L. monocytogenes* se formó en las probetas de acero inoxidable a 10°C por 72 h, (4.2) y luego se desarrolló a 25°C por 72 h (3.6), se obtuvieron distintos recuentos para cada temperatura de formación de biofilm.

En la FIGURA 5 se observan los valores obtenidos a cada tiempo del sonicado de las probetas, existiendo diferencias entre el crecimiento del biofilm de *L. monocytogenes* formado en las probetas de acero a distintas temperaturas ( $p < 0,05$ ) (ANEXO 4.2), es decir, al utilizar la técnica de sonicado el desprendimiento de células se refleja en un aumento de casi 2,0 ciclos log entre el biofilm formado a 10°C y el formado a 25°C. Sin embargo, no fue posible observar diferencias entre los tiempos de sonicado ( $p > 0,05$ ) (ANEXO 4.1), lo cual llevó a utilizar el tiempo establecido por ZAMBRANO (2008), quien sí obtuvo diferencias, estableciendo que a los 3,5 min de sonicado, en el líquido se presentaban recuentos de células viables con ausencia de desarrollo de colonias sobre la probeta.

Por otra parte, estudios realizados por VARGAS y ROMERO (2006), obtuvieron recuentos de células viables de un biofilm de bacterias sulfato reductoras, cultivadas en probetas de acero, utilizando la técnica de sonicado y comparándolo con el raspado con ultrasonido, encontrando que la técnica de sonicado resultó ser diez veces mejor ya que obtuvieron mayor desprendimiento de células.



\* Valores corresponden a dos repeticiones con 3 observaciones.

**FIGURA 5.** Recuentos de *L. monocytogenes* obtenidos a partir de biofilm formados en probetas a 10°C y 25°C e incubados durante 72 h.

#### 4.4 Desarrollo de un método para la aplicación de los tratamientos con STB por aspersión

**4.4.1 Selección del asperjador para la aplicación de las STB.** Para la aplicación de las tres STB por aspersión, se realizaron diferentes pruebas, a fin de determinar el mejor sistema de asperjado. Algunas de las características necesarias que debía tener el asperjador fueron:

- debía producir una aplicación que proporcione la cobertura adecuada de la probeta de acero y que la cantidad depositada fueran suficiente para actuar sobre el biofilm de *L. monocytogenes*.
- el tamaño de las gotas individuales de la aspersión debían ser pequeñas y finas permitiendo que el producto se adhiriera a la superficie.

Los primeros asperjadores ensayados tenían diferentes tipos de boquillas y capacidades (FIGURA 6a), al aplicar el líquido, su ángulo y cobertura de aspersión eran muy amplios. Además el volumen de producción que se requería de las STB era muy grande.

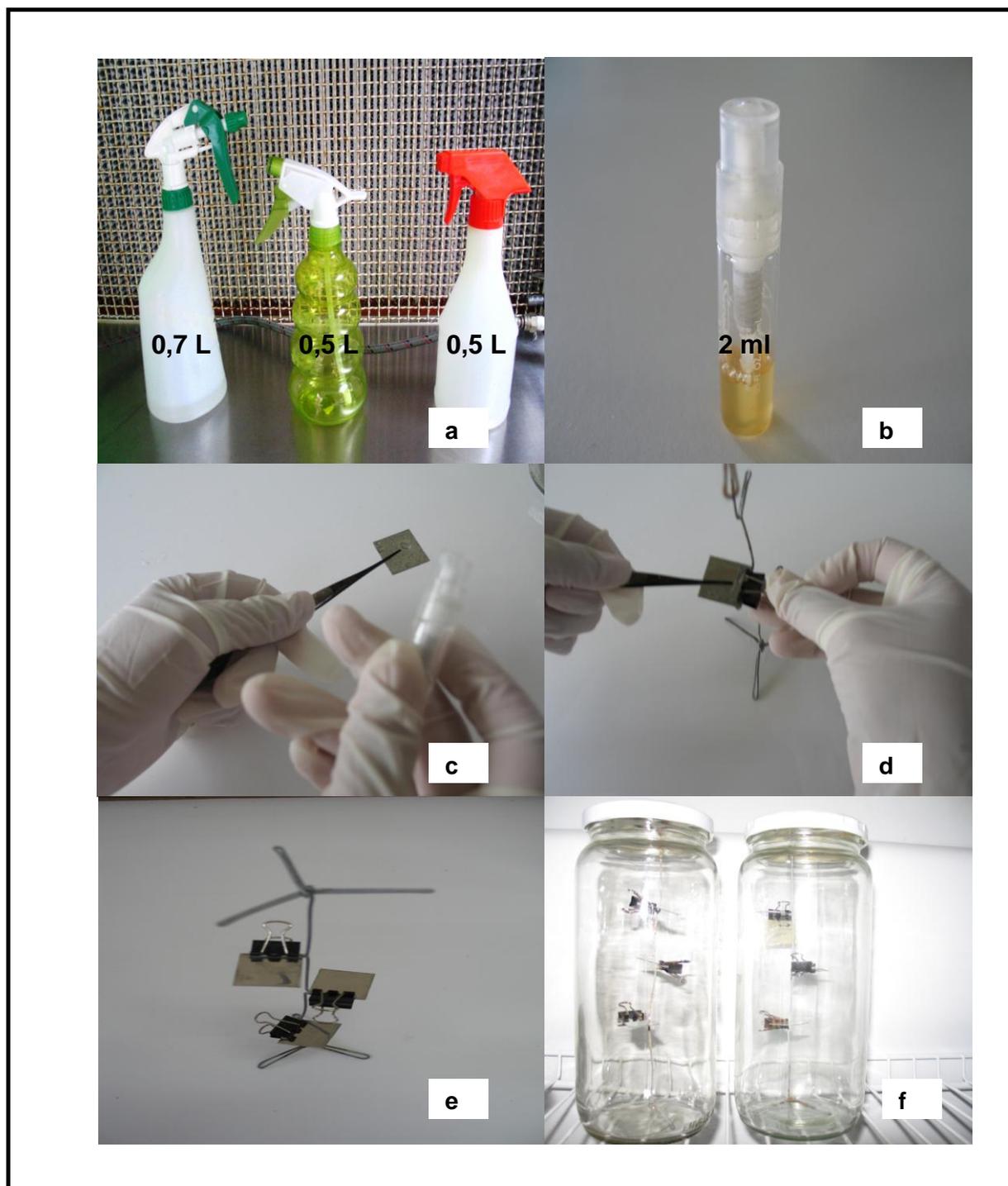
Finalmente, se utilizó un asperjador con dimensiones 35 mm de altura y 10 mm de diámetro y capacidad de 2 ml, que tenía una boquilla pequeña (FIGURA 6b), permitiendo que las probetas recibieran la cantidad necesaria de STB. Para cada STB se utilizó un asperjador distinto. Se lavaron con detergente y fueron enjuagados con agua destilada, lavados con alcohol de 70° y cinco enjuagues sucesivos con agua destilada estéril. Finalmente se secaron en cámara de flujo laminar.

**4.4.2 Diseño de un mecanismo de fijación de las probetas en soportes de acero para su incubación.** Para la aplicación de los tratamientos con las STB fue necesario diseñar un soporte de fijación de las probetas de acero en material esterilizable, que permitiera aplicar las STB en ambas caras, sin contacto con la superficie y manteniéndolas en forma horizontal durante los tratamientos. Para incubar las probetas de acero fueron evaluados dos tipos de soportes.

El soporte evaluado como adecuado, se diseñó con alambre de acero. Este consistió en una estructura de 1,22 mm de espesor, moldeado en la forma de un trípode, con tres brazos que sobresalían para colocar las placas de acero, las que fueron fijadas con pinzas metálicas. Posteriormente el trípode se introdujo en un frasco de conserva de 1 L estéril. Este soporte fue más fácil para montar las probetas y la base de acero le brindó la estabilidad necesaria para mantener las probetas de forma horizontal. Además fue esterilizado y reutilizado.

**4.4.3 Método de aplicación de las STB incorporando el asperjador y el mecanismo de fijación.** Una vez definido el asperjador a utilizar y el sistema de fijación de las probetas, fueron aplicadas las STB como se observa en la FIGURA 6.

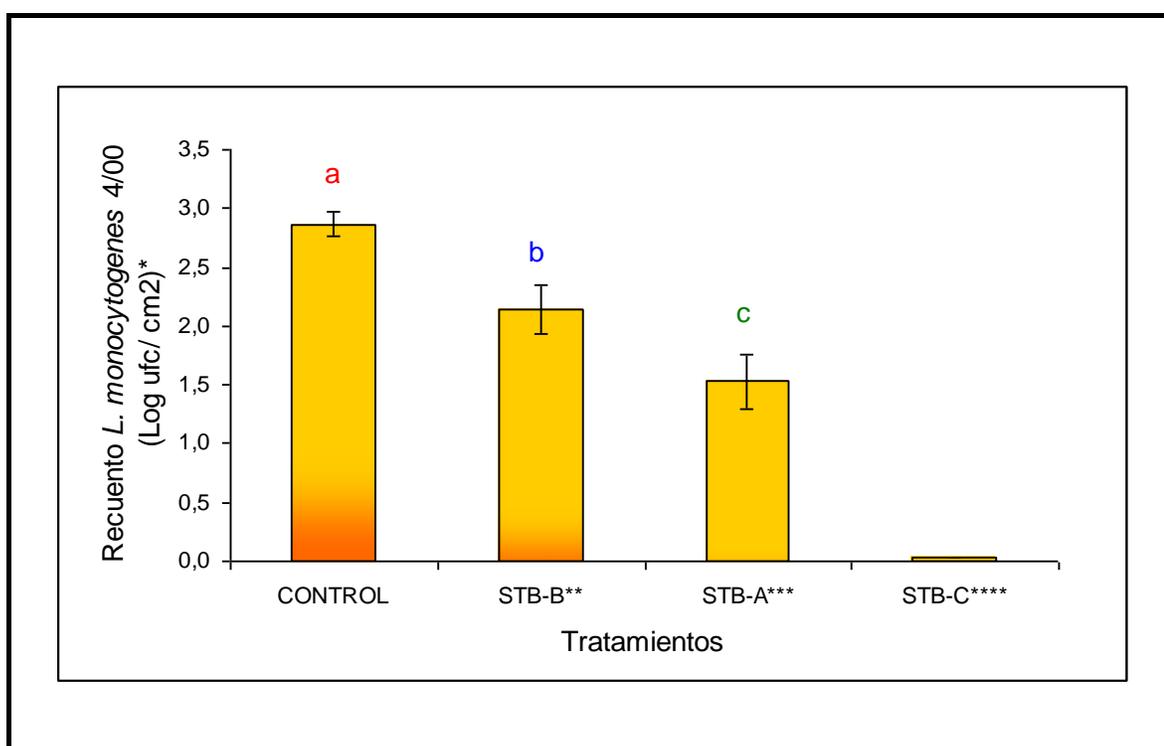
Para la prueba de aplicación de tres STB combinadas (BAL-A, BAL-B, BALC), se colocaron 600  $\mu$ l de cada una en el atomizador. Luego fueron aplicados dos toques de atomizado (FIGURA 6c), que equivalían a 150  $\mu$ l cada uno, sobre una cara de la probeta, se esperó algunos segundos, para el contacto adecuado. Luego se invirtió la placa y se asperjó con las STB sobre la otra cara de la probeta. Posteriormente, las probetas se montaron sobre el trípode de acero con la ayuda de pinzas metálicas (FIGURA 6d y 6e), y se procedió a su incubación según cada tratamiento (3.8.1) (FIGURA 6f), a 10°C. Para la prueba de antagonismo de las STB aplicadas individualmente se procedió de la misma forma.



**FIGURA 6** Aplicación de tratamientos sobre las probetas. (a) aspersores evaluados; (b) aspersor seleccionado para la aplicación de las STB; (c) asperjado de las STB; (d y e) montaje sobre el soporte; (f) Trípode con las probetas, incubadas en estufa a 10°C.

#### 4.5 Antagonismo de tres STB aplicadas por aspersión sobre un biofilm de *L. monocytogenes* 4/00 desarrollados sobre probetas de acero inoxidable

**4.5.1 STB aplicadas individualmente.** En la FIGURA 7 y ANEXO 5.1, se presentan los resultados obtenidos al aplicar las STB individualmente sobre un biofilm de *L. monocytogenes* Lm 4/00. Los resultados obtenidos son a partir de la probeta sonicada por 3,5 min. La aplicación de la bacteriocina BAL-C presentó como resultado un recuento  $<1,0$  ufc/cm<sup>2</sup>, es decir, ausencia de colonias sobre el agar.



\*Los valores corresponden al promedio de seis determinaciones (dos repeticiones, con tres observaciones cada uno)

\*\*STB-B=400UA/ml, \*\*\*STB-A=800 UA/m, \*\*\*\*STB-C=25600 UA/ml

**FIGURA 7** Recuentos de *L. monocytogenes* (log ufc/cm<sup>2</sup>) tratadas con las STB individualmente durante 0,5 h de exposición a 10°C sobre un biofilm formado a 25°C por 72 h.

El análisis estadístico de homogeneidad de varianza indicó que no existían diferencias significativas entre los valores de los recuentos de los dos experimentos realizados ( $p>0,05$ ), por lo cual se trabajó con los promedios de ambos. El análisis de varianza indicó que existieron diferencias significativas entre las STB y el CONTROL ( $p<0,05$ ) (ANEXO 5.3)

Se puede observar en la FIGURA 7 y en el ANEXO 5.1.2, que al aplicar la STB de la cepa BAL-A individualmente con una actividad de 800UA/ml sobre el biofilm existió una disminución de los recuentos de 1,4 ciclos logarítmicos desde una población inicial de 2,9 log ufc/cm<sup>2</sup>, se redujo a 1,5 log ufc/cm<sup>2</sup> en 0,5 h, demostrando la sensibilidad que presenta la cepa frente a la STB-A. Los resultados según el análisis de varianza indicaron que existen diferencias significativas entre el control y STB-A ( $p < 0,05$ ) (ANEXO 5.3). AGUILAR (2007), estudió el comportamiento de 10 cepas de *L. monocytogenes*, dentro de ellas la cepa L 4/00, frente a la STB de cepa BAL-A, indicando que todas fueron sensibles, especialmente L 4/00, demostrando que existe una actividad antagonista frente a las cepas de *Listeria*. La STB de BAL-B con 400 UA/ml presentó una disminución de 0,9 ciclos logarítmicos desde 2,9 log ufc/cm<sup>2</sup> a 2,1 log ufc/cm<sup>2</sup> (FIGURA 7), resultando en una menor reducción de *L. monocytogenes*, y siendo el tratamiento menos efectivo de los tres, con diferencias significativas con el control ( $p < 0,05$ ) (ANEXO 5.3). Asimismo GONZÁLES (2004), indica que al aplicar la STB de *C. piscicola* L103 con 400 UA/ml resultó un tratamiento poco efectivo en contra de *L. monocytogenes*.

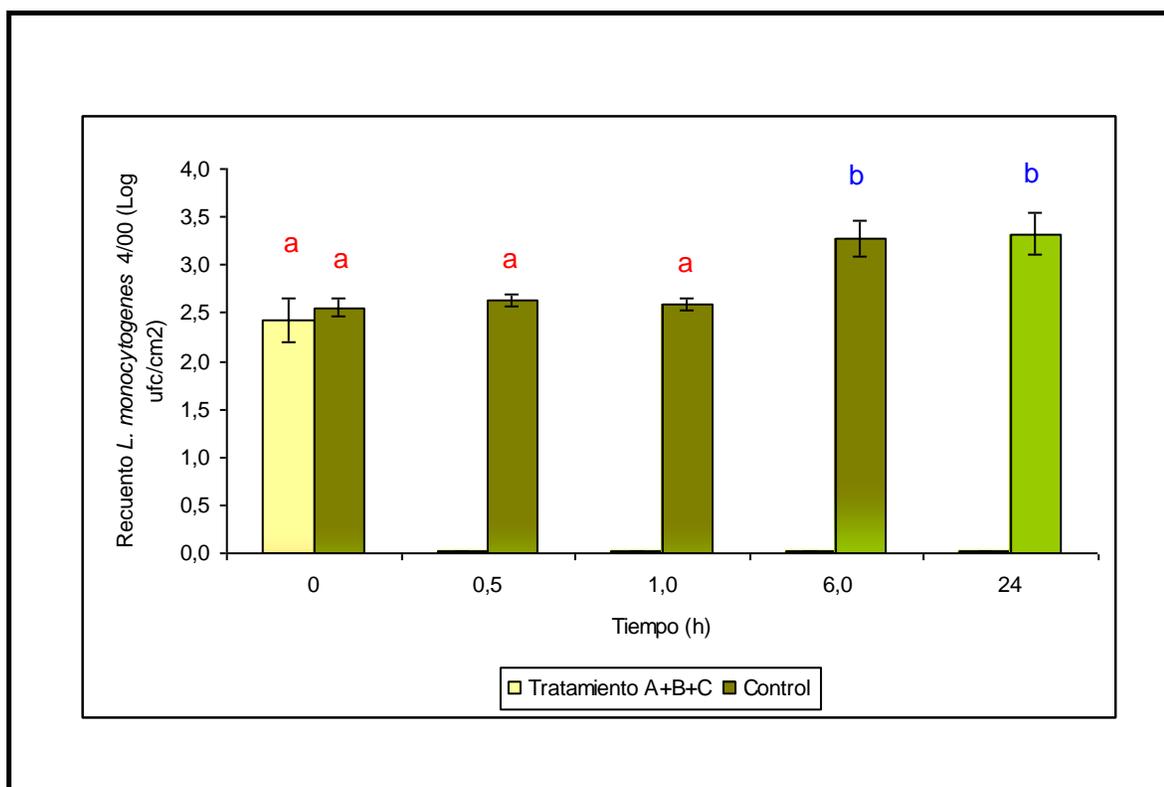
La STB de la cepa BAL-C, con 25,600 UA/ml, se observa en la FIGURA 7, que tuvo una reducción del recuento de *L. monocytogenes* de 2,9 log ufc/cm<sup>2</sup> hasta  $< 1,0$  ufc/cm<sup>2</sup>, indicando que la STB-C actuó como bactericida, siendo muy efectivo. Según MINAHK **et al.** (2004), quienes realizaron un estudio utilizando distintas concentraciones de la enterocina CLR35 sobre *L. monocytogenes*, observaron el fuerte efecto bactericida que producen las enterocinas, al aplicar 8  $\mu$ g/ml de esta STB, determinando que el 99% de las células de *Listeria* fueron destruidas con 10 min de tratamiento a 30°C. AUDISIO **et al.** (2005), utilizó una bacteriocina sintetizada por *E. avium* PA1 obteniendo una reducción desde 9,08 log ufc/ml a 0,04 log ufc/ml después de 2 h de contacto con la STB que presentaban 11,130 UA/ml a 25°C.

En el ANEXO 5.1.3, se presenta el número de colonias de *L. monocytogenes* desarrolladas sobre las probetas de acero, posterior a los tratamientos con las STB individuales durante 0,5 h. Se observa que la probeta control (sin tratamiento de STB) tuvo un mayor número de colonias de *L. monocytogenes* que la probetas a las cuales se les aplicó tratamiento de STB, lo cual se visualiza en el ANEXO 3.

Para la aplicación de las STB individuales y en combinación, éstas fueron utilizadas en la misma proporción (1:1:1), pero con diferentes unidades de actividad final (UA/ml) lo cual, no permite determinar si hubiera efecto sinérgico entre ellas. MARTIN (2002), estudió la capacidad antagonista de dos sustancias tipo bacteriocinas frente a *L. monocytogenes* utilizando la STB de *C. piscicola* y la STB de la cepa BAL M14 con 800 UA/ml y 400 UA/ml, respectivamente, determinando que existen diferencias. ZUÑIGA (2002), en sus resultados determinó que no existían diferencias respecto de la acción bacteriostática que se produce al inocular por aspersion la STB de *C. piscicola* L103 con 800 y 1600 UA/ml sobre filetes de salmón inoculados con *L. monocytogenes*. Pero no realizó una comparación entre diferentes cepas productoras de STB.

**4.5.2 Aplicación de una combinación de las tres STB.** En la FIGURA 8 y en el ANEXO 5.2, se presentan los resultados obtenidos al aplicar la combinación de tres STB con distintos tiempos de acción (3.8.1), con una actividad de 12800 UA/ml, sobre *L. monocytogenes* cultivada sobre probetas de acero (3.6). Estos valores, corresponden al promedio de nueve determinaciones (tres experimentos con tres observaciones cada uno).

Se puede observar en la FIGURA 8, que no existieron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (ANEXO 5.4), entre los valores iniciales en el tiempo cero de los recuentos de *L. monocytogenes* en las probetas sonicadas, es decir, entre el tiempo cero de la muestra control y el tiempo cero de la muestra a la cual se le aplicó el tratamiento de STB (A+B+C).



\*Los valores corresponden al promedio de nueve determinaciones (tres repeticiones, con tres observaciones cada uno)

\*\*Letras distintas indican diferencias significativas

**FIGURA 8 Antagonismo de una combinación de tres STB con diferentes tiempos de acción a 10°C, sobre un biofilm de *L. monocytogenes* formada a 25°C por 72 h.**

En la FIGURA 8 y en el ANEXO 5.2.1, se observa que el recuento inicial (tiempo cero) obtenido del sonicado de la probeta de acero que tenía el biofilm de *L. monocytogenes*,

fue de 2,57 log ufc/cm<sup>2</sup>. Su valor final, posterior al tratamiento con la combinación de STB y sonicado, fue <1,0 ufc/cm<sup>2</sup>, para todos los tiempos con respecto al valor inicial (tiempo cero). Las probetas control con un biofilm de *L. monocytogenes* sin tratamiento incubadas también a 10 °C, presentaron un recuento promedio inicial de 2,55 log ufc/cm<sup>2</sup> (ANEXO 5.2.3), y se observa en el grafico que presentan una variación promedio de 0,7 ciclos logarítmicos, entre el inicio del experimento y las 24 h de incubación. El análisis estadístico indicó que no presentaron diferencias, en el crecimiento de *L. monocytogenes* en el tiempo 0; 0,5; 1,0 h de incubación, sin embargo, existieron diferencias significativas en el crecimiento de *L. monocytogenes* al comparar 6,0 y 24 h, con respecto a los tiempos anteriores ( $p < 0,05$ ) (ANEXO 5.5). Además, se visualizó si hubo desarrollo de colonias, sobre las probetas de acero a las que se les aplicó una combinación de STB, lo cual no ocurrió (ANEXO 5.2.2). Sin embargo, en las probetas utilizadas como control si hubo crecimiento de colonias, observando un aumento en el número de colonias desarrolladas, sobre la probeta de acero cubierta con AST a medida que transcurrió el tiempo. Esta probeta control permitió además observar la efectividad del tratamiento y el efecto bactericida al combinar BAL-A+ BAL-B+ BAL-C en los tiempos ya mencionados.

El efecto bactericida que produce la combinación de las tres STB no se puede atribuir completamente a la STB-C, ya que al aplicar los tratamientos individualmente por 0,5 h se vio que STB-A y STB-B también poseen efecto antagonista sobre *L. monocytogenes*, solo que más leve. Lo que sí se puede determinar, es que la combinación de las tres fue efectiva dentro de las 24 h de tratamiento, además no es posible descartar el uso de STB-A y STB-B, ya que es posible que ambas permitan un efecto bacteriostático sobre las cepas de *L. monocytogenes*.

La combinación de STB fue efectivo contra *L. monocytogenes*, ya que las cepas utilizadas fueron dos de una misma especie (*Carnobacterium*), y otra de una especie diferente (*Enterococcus*), lo que permitiría que si la STB proveniente de una cepa se vuelve resistente exista siempre otra STB de otra cepa que pueda inhibirla. Estudios de VIGNOLO *et al.* (2000), indican que la eficacia de la combinación de las STB en contra de *L. monocytogenes* dependerá de las bacterias productoras, y que las STB son mas efectivas, si provienen de distintas especies bacterianas, ya que tienen diferentes mecanismos de acción. Además evita la frecuencia de mutaciones que producen resistencia siendo una ventaja que permite que si una STB es resistente a una bacteria, la otra de especie diferente no lo sea.

Diferentes estudios avalan la acción inhibidora que produce el combinar dos o más STB. GONZÁLES (2004), empleó una combinación de tres bacteriocinas (STB de *C. piscícola* L103, lactocina 705 y nisina) para inhibir *L. monocytogenes*, obteniendo como resultado que el tratamiento más efectivo era aplicar una combinación de las tres bacteriocinas, logrando reducir hasta 4 ciclos log desde la población inicial. CASAUS *et al.* (1997), estudiaron dos bacteriocinas (A y B), producidas por la bacteria *Enterococcus faecium* T136, determinando un efecto inhibitorio sobre *L. monocytogenes*, fue comparado el efecto bactericida de cada una individualmente y la mezcla de ambas, al aplicarlas con diferentes actividades. Como resultado al aplicar

las bacteriocinas por separado, encontraron que células de *L. monocytogenes* sobrevivieron siendo capaces de crecer y colonizar nuevamente la superficie. En cambio existió una disminución total al realizar pruebas con la mezcla de bacteriocinas, mostrando un efecto sinérgico.

## 5 CONCLUSIONES

- Los parámetros establecidos para el crecimiento de *L. monocytogenes*, y la formación del biofilm sobre probetas de acero inoxidable, fueron a 25°C por 72 h, lo que permitió la formación de biofilm apropiado para la aplicación de los tratamientos con las sustancia tipo bacteriocinas (STB).
- El método más efectivo para la aplicación por aspersion de las STB sobre las probetas de acero inoxidable, fue a través de un asperjador de volumen 2 ml, con las probetas fijadas en un trípode de acero.
- Las tres STB (STB-A, STB-B y STB-C) aplicadas individualmente sobre el biofilm de *L. monocytogenes* Lm 4/00 durante 0,5 h, presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), en su capacidad para inhibir a *L. monocytogenes*, con un efecto bacteriostático por parte de STB-A, STB-B y STB-C.
- El empleo de la mezcla de las tres sustancias tipo bacteriocinas (STB-A, STB-B y STB-C), por aspersion, con distintos tiempos de exposición a 10°C, resultó ser un método efectivo para inhibir completamente el crecimiento de *L. monocytogenes* Lm 4/00 en el biofilm durante 24 h.

## 6 RESUMEN

El trabajo tuvo como objetivo aplicar una combinación de bacteriocinas, provenientes de bacterias ácido lácticas, sobre un biofilm de *Listeria monocytogenes* desarrollado sobre probetas de acero inoxidable. Para el trabajo se evaluó una combinación de tres sustancias tipo bacteriocinas (STB) de BAL sobre un biofilm de *L. monocytogenes*. Estas se aplicaron por aspersión, con distintos tiempos de exposición 0 h; 0,5 h; 1,0 h; 6 h y 24 h a 10°C. También se estudió el efecto inhibitor de las bacteriocinas aplicadas individualmente, con exposición de 0,5 h sobre el biofilm. Los resultados obtenidos mostraron que las STB aplicadas en combinación resultaron efectivos para inhibir *L. monocytogenes*, mostrando a partir de las 0,5 h y hasta las 24 h un efecto bactericida, con destrucción de *L. monocytogenes* ( $<1,0 \times 10^1$  ufc/cm<sup>2</sup>). En la aplicación de las bacteriocinas individuales, los tres tratamientos (STB-A; STB-B y STB-C) aplicados por 0,5 h a 10 °C fueron efectivos para inhibir *L. monocytogenes*, presentando diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos ( $p < 0,05$ ) y en relación con el control sin tratar. Se obtuvo un efecto bacteriostático al aplicar las bacteriocinas STB-A y STB-B y un efecto bactericida para la bacteriocina STB-C. Se concluye que al aplicar una combinación de bacteriocinas por aspersión sobre un biofilm de *L. monocytogenes* se puede observar un efecto inhibitor lográndose con STB-A y STB-B un efecto bacteriostático y con STB-C un efecto bactericida.

## SUMMARY

The objective of the study was, to apply a combination of three bacteriocin like substances (BLS) from lactic acid bacteria (LAB), to inhibit *Listeria monocytogenes* in a biofilm developed on stainless steel coupons. The BLS were applied by spraying, with different exposure times of 0 h; 0,5 h; 1,0 h; 6 h and 24 h at 10°C. Also the inhibitory effect was studied for each BLS applied individually with an exposure time of 0,5 h at 10 °C on the biofilm. The results showed that the BLS applied in combination proved effective to inhibit *L. monocytogenes*, showing a bactericidal effect from 0,5 h up to 24 h, with complete destruction of the pathogen ( $<1,0 \times 10^1$  ufc/cm<sup>2</sup>). The bacteriocins applied individually (STB-A; STB-B and STB-C) during 0,5 h were also effective in inhibiting *L. monocytogenes*, with statistically significant differences among the three treatments ( $p < 0,05$ ) and with the control. A bacteriostatic effect was seen when BLS STB-A and STB-B were applied and a bactericidal effect for the BLS STB-C. It is concluded that by applying a combination of bacteriocins as a spray on a biofilm of *L. monocytogenes* a bacteriostatic effect is achieved with STB-A and STB-B and a bactericidal effect with STB-C.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

- AGUILAR, X. 2007. Sensibilidad de *Listeria monocytogenes* frente a una bacteria ácido láctica y diferentes combinaciones de pH y NaCl. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 62 p.
- AHIMOU, F.; SEMMENS, M.; HAUGSTAD, G. y NOVAK, P. 2007. Effect of protein, polysaccharide, and oxygen concentration profiles on biofilm cohesiveness. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(9): 2905-2910.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 1992. Standard method for the examination of dairy products. (MASHALL, R.T.Ed.). 16ª Edición. Editorial American Public Health Association, Washington, D.C., United State of American. 546p.
- ANON, A. 2007. *Listeria* contamination of sándwiches- an update. *Health Prot. Report.* 1(13): 123-127.
- AUDISIO, M.; TERZOLO, H. y APELLA, C. 2005. Bacteriocin from honeybee beebread *Eterococcus avium*, active against *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(6): 3373-3375.
- BAREFOOT, S. y KLAENHAMMER, R. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(6): 1808-1815.
- BEUMER, R. y HAZELEGER, W. 2003. *Listeria monocytogenes*: diagnostic problem. *Immun. Medical Microbiol.* 35: 191-197.
- BIGOT, A.; PAGNIEZ, H.; BOTTON, E.; FREHEL, C.; DUBAIL, I.; JACQUET, C.; CHARBIT, A. y RAYNAUD, C. 2005. Role of Fli F and Fli I of *Listeria monocytogenes* in flagellar assembly and pathogenicity. *Infect. Immun.* 73: 5530-5539.

- BÓRQUEZ, P. 2000. Producción continua y purificación parcial de la bacteriocina producida de *Carnobacterium piscicola* L103 utilizando un fermentador modular. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. p 52-57.
- BORUCKI, M.; PEPPIN, J.; WHITE, D.; LOGE, F. y CALL, F. 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 69(12): 7336–7342.
- CAROLISSEN-MACKAY, V.; ARENDSE, G. y HASTINGS, J. 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. Int. J. Food. Microbiol. 34: 1-16.
- CASAUS, P.; NIELSEN, T.; CINTAS, L.; NES, I.; HERNANDEZ, P. y HOLO, H. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin. Appl. Environ. Microbiol. 143: 2287-2294.
- CHAVANT, P.; MARTINIE, B.; MEYLHEUC, T.; BELLON-FONTAINE, M. y HEBRAUD, M. 2002. *Listeria monocytogenes* LO28: Surface physicochemical properties and ability to form biofilm at different temperatures and growth phase. Appl. Environ. Microbiol. 68(2): 728-737.
- CHEN, H. y HOOVER, D. 2003. Bacteriocins and their food applications. Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety 2: 82-100.
- COSTERTON, J.; STEWART, P. y GREENBERG, E. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Sci. 284: 1318-1322.
- DAEZA, M.; ARAUJO, M. y GARRIDO, M. 2005. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* on Stainless steel and glass surfaces by neutral electrolysed water. Letters Appl. Microbiol. 40: 341-346.
- DANHORN, T. y FUQUA, C. 2007. biofilm formation by plant-associated bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 61: 401-422.
- DAVEY, M. y O`TOOLE, G. 2000. Microbial biofilm: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64(4): 847-867.

- DIAZ, G. 2006. Técnicas de observación de microorganismos. Fundamentos, Técnicas de Análisis de Laboratorio. Disponible en: <<http://chopo.cnice.mecd.es/~gdiaz3/apuntes/UT131.pdf>> (15 marzo 2008)
- DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M., y McLANDSBOROUGH, L. 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2950-2958.
- DONLAN, R. 2002. Biofilm: microbial life of surface. Emerg. Infect. Dis.8: 881-890.
- DUNNE, W. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. Clin. Microbiol. Rev. 15(2): 155-166.
- FARBER, J. y PETERKIN, P. 1991. *Listeria monocytogenes*, as food- borne pathogen. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 55(3): 476-511.
- GAHAN, C.; O`DRISCOLL, B. y HILL, C. 1996. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic food and during milk fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 62(9): 3128-3132.
- GAMBLE, R. y MURIANA, P. 2007. Microplate fluorescent assay for measurement of the ability of strains of *Listeria monocytogenes* from meat and meat-processing plants to adhere to abiotic surfaces. Appl. Environ. Microbiol. 73: 5235-5244.
- GELLIN, B. y BROOME, C. 1989. Listeriosis. J. Amer. Med. Assoc. 261: 1313-1320.
- CENTER FOR BIOFILM ENGINEERING. 2003. Disponible en <[http://.sterilex.com/biofilm/the\\_science.asp](http://.sterilex.com/biofilm/the_science.asp)> (15 abril 2008)
- GONZÁLES, J. 2004. Empleo de una combinación de tres bacteriocinas para la inhibición de *Listeria monocytogenes*. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 73 p.
- GRAVESEN, A.; RAMNATH, M.; RECHINGER, K.; ANDERSEN, N.; JANSCH, L.; HÉCHARD, Y.; HASTINGS, J. y KNÖCHEL, S. 2002. High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. Microbiol. 148: 2361–2369.

- HERRERA, M. 2004. El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia. *Rev. nova.* 2(2): 71-80.
- HOOD, S. y ZOTTOLA, E. 1997. Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel. *J. Food Prot.* 60(9): 1034-1037.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). 1988. Microorganism in foods "their significance and method of enumeration". (Elliott R.P. Ed). Segunda edición. University of Toronto Press, Canadá. 436 p.
- JACK, R.; WAN, J.; HARMARK, K.; DAVIDSON, B.; HILLIER, A.; WETTWNHALL, R.; HICKEY, M. y COVENTRY, M. 1996. Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2897-2903.
- JEONG, D. y FRANK, J. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms which microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. *J. Food Prot.* 57: 576-586.
- JOERGER, R.; HOOVER, D.; BAREFOOT, S.; HARMON, K.; GRINSTEAD, D. y NETTLES-CUTTER, C. 2000. Bacteriocins in: Lederberg, editor. *Encyclopedia of microbiology*, vol 1, 2<sup>nd</sup> edition. San Diego: Academia Press, Inc. 383-397pp.
- JOSEPH, B.; MOTTA, S. y KARUNASAGAR, I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int. J. Food Microbiol.* 64(3): 367-372.
- KIEPEK-PEARSON, K. y KARATAN, E. 2005. Biofilm development in bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* 57, 79-111.
- 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. 78 p.
- LARSEN, A.; VOGENSEN, F. y JOSEPHSEN, J. 1993. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of

- bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. J. Appl. Bacteriol. 75: 113-122.
- LASA, I.; DEL POZO, J.; PENADÉS, J. y LEIVA, J. 2005. Bacterial biofilm and infection. An. Sist. Sanit. Navar. 28(2): 163-175
- MAH, T.; PITT, B.; PELLOCK, B.; WALKER, G.; STEWART P. y O`TOOLE G. 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. Nature (Inglaterra) 426: 306-310.
- MARTIN, D. 2002. Capacidad antagonista frente a *Listeria monocytogenes* de dos sustancias tipo bacteriocinas utilizadas en combinación con NaCl y CO<sub>2</sub>. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. p 32-45.
- MARTINEZ, S.; MARTINEZ, E. y ALVAREZ, A. 2004. Abatimiento del biofilm en sistemas de enfriamiento. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 20(1): 39-48.
- MATARAGAS, M.; METAXOPOULOS, J.; GALIOTOU, M. y DROSINOS E. 2003. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc menesteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. Meat Sci. 64(3): 265-271.
- MCCLURE, P.; KELLY, T. y ROBERTS, T. 1991. The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 14: 77-79.
- MEAD, P.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, J.; BRESEE, C.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. y TAUXE, V. 1999. Food-related illness and death in the United State. Emerg. Infect. Dis. 5:607-625.
- MINAHK, C.; DUPOY, F. y MORENO, R. 2004. Enhancement of antibiotic activity by sub-lethal concentrations of enterocin CRL35. J. Antimicrob. Chemother. 53, 240-246.
- MORETRO, T.; AASEN, I.; STORRO, I. y AXELSSON, L. 2000. Production of sakacin P by *Lactobacillus sakei* in a completely defined médium. J. Appl. Microbiol. 88(3): 536-545.

- MUÑOZ, M.; GUEVARA, L.; PALOP, A.; TAVERA, J.; CANO, P. y FERNANDEZ, P. 2006. Antibacterial effects of essential oils of orégano, laurel and rosemary obtenido: <<http://redsicura.iata.csic.es/xarxa/ocs/viewabstract.php?id=50&cf=1>> ( 17 de febrero del 2008)
- NILSSON, L.; GRAM, L. y HUSS, H. 1999. Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacterial flora. J. Food Prot. 62: 336-342.
- NORWOOD, D. y GILMOUR, A. 2000. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. J. Appl. Microbiol. 88: 512-520.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. y KOLTER, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 54: 49-79.
- PUMAROLA, A.; RODRIGUEZ, A.; GARCIA-RODRIGUEZ, J. y PIEDROLA-ANGULO, G. 1987. Microbiología y parasitología médica. Madrid, España. Salvat. 916 p.
- PIARD, J. y DESMAZEAUD, M. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Bacteriocin and other antibacterial substances. Lait. 72: 113-142.
- RILEY, M. y WERTZ, J. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology and application. Annu. Rev. Microbiol. 56:117-137.
- RÍOS, J. 2002. Formación de biopelículas por adherencia bacteriana a probetas de cobre. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 120 p.
- STEWART, P. y J. COSTERTON. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet (USA). 358: 135-138.
- SCHILLINGER, U.; STILES, M. y HOLZPAPFEL, W. 1993. Bacteriocin production by *C. piscicola* LV61. Int. J. Food Microbiol. 20(3): 131-147.
- SHARMA, M. y ANAND, S. 2002. Biofilm evaluation as an Essential component of HACCP for food/ Dairy processing industry- a case. Food Control. 13(6): 467-477.

- SILVA, J.; CARVALHO, A.; TEIXEIRA, P. y GIBBS, P. 2002. Bacteriocins productions by spray-dried lactic acid bacteria. *Letter Appl. Microbiol.* 34: 77-81.
- SILVA, R. 2004. Acción antimicrobiana de dos bacteriocinas lácticas sobre *Listeria monocytogenes* adherido sobre una superficie de acero inoxidable. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. p 24-75.
- STEPANOVIC, S.; CIRKOVIC, I.; RAIN, L. y SVABIC-VLAHOVIC, M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters Appl. Microbiol.* 38: 428-432.
- STEWART, J. y COSTERTON, W. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The lancet (USA)*. 358: 135-138.
- STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. y COSTERTON, J. 2002. Biofilm as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 187-209.
- THOMAS, L.; WIMPENNY, J. y BARKER, G. 1997. Spatial interactions between surface bacterial colonies in a model system: a territory model describing the inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nisin-producing lactic acid bacterium. *Microbiol.* 143: 2575-2582.
- USA, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). 2006. *Listeria monocytogenes*. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. Department of health and human service. Disponible en: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap6.html>> (19 mayo 2007).
- VARGAS, A. y ROMERO, M. 2006. Parámetros involucrados en la técnica de sonicado de biopelículas asociadas a procesos corrosivos. *Acta Microscópica*. 15(1): 48-56.
- VIGNOLO, G.; PALACIOS, J.; FARIÁS, M.; 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. *Curr. Microbiol.* 41: 410-416.
- WADE, W.; SCOUTEN, A.; MCWATTERS, K.; WICK R.; DEMIRCI, A.; FETT, W. y BEUCHAT, L. 2003. Efficacy of Ozone in Killing *Listeria monocytogenes* on

Alfalfa Seeds and Sprouts and Effects on Sensory Quality of Sprouts. *J. Food Protec.* 66: 44-51.

WALKER, S.; ARCHER, P. y BANKS, J. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 157-162.

WATNICK, P. y KOLTER, R. 2000. Biofilms, city of microbes. *J. Bacteriol.* 182(10): 2675-2679.

WAY, S.; THOMPSON, L.; LOPEZ, J; HAJJAR, A.; KOLLMANN, T.; FREIGTAG, N. y WILSON, C. 2004. Characterization of flagellin expression and its role in *Listeria monocytogenes* infection and immunity. 6 (3): 235-242.

WEINER, H. 1997. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune disease. *Immunol. Today.* 18 (7): 335-343.

WIKIPEDIA. 2007. Características del acero. Disponible en:

[http://es.wikipedia.org/wiki/Acero\\_inoxidable\\_austen%C3%ADtico](http://es.wikipedia.org/wiki/Acero_inoxidable_austen%C3%ADtico) (17 marzo 2008).

WILLIAMS, T.; BAUER, S.; BEIER, D. y KUHN, M. 2005. Construction and characterization of *Listeria monocytogenes* mutants with in frame deletions in the response regulator genes identified in the genome sequence. *Infection and Immunity.* 73(5): 3152-3159.

XIE, L.; HETTIARACHCHY, N.; JANE, M. y JOHNSON, M. 2003. Antimicrobial activity of *Ginkgo biloba* leaf extract on *Listeria monocytogenes*. *J. Food Sci.* 68(1): 268-270.

YAMAZAKI, K.; SUZUKI, M.; KAWAI, Y.; INOUE, N. y MONTVILLE, T. 2005. Purification and characterization of a novel class IIa bacteriocin, Piscicocin CS526, from surimi-associated *Carnobacterium piscicola* CS526. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(1): 554-557.

ZAMBRANO, M. 2008. Formación "in vitro" de biopelículas de *Listeria monocytogenes* para el estudio de antagonismo microbiano. Lic. en Tecnología Médica. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Biomédicas (tesis en curso).

ZÚÑIGA, A. 2002. Producción Continua de Bacteriocinas de *Carnobacterium piscicola* a escala prepiloto y Estudio de su Efecto Antagónico en Contra de *L. monocytogenes*. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 67 p.

## **ANEXOS**

**ANEXO 1. Recuento de *L. monocytogenes* 4/00 en caldo (ufc/ml), obtenido al incubar a dos temperaturas en diferentes tiempos.**

Temporatura \ Tiempo	inicial	72 h	96 h	120 h
10°C*	$7,4 \times 10^7$	$8,1 \times 10^8$	$7,4 \times 10^9$	$9,5 \times 10^{10}$
25°C**	$1,8 \times 10^8$	$6,32 \times 10^{10}$	NR***	NR

\* Los valores corresponden al promedio de 12 determinaciones (dos experimentos, con seis observaciones cada uno)

\*\* Los valores corresponden al promedio de 9 determinaciones (tres experimentos, con tres observaciones)

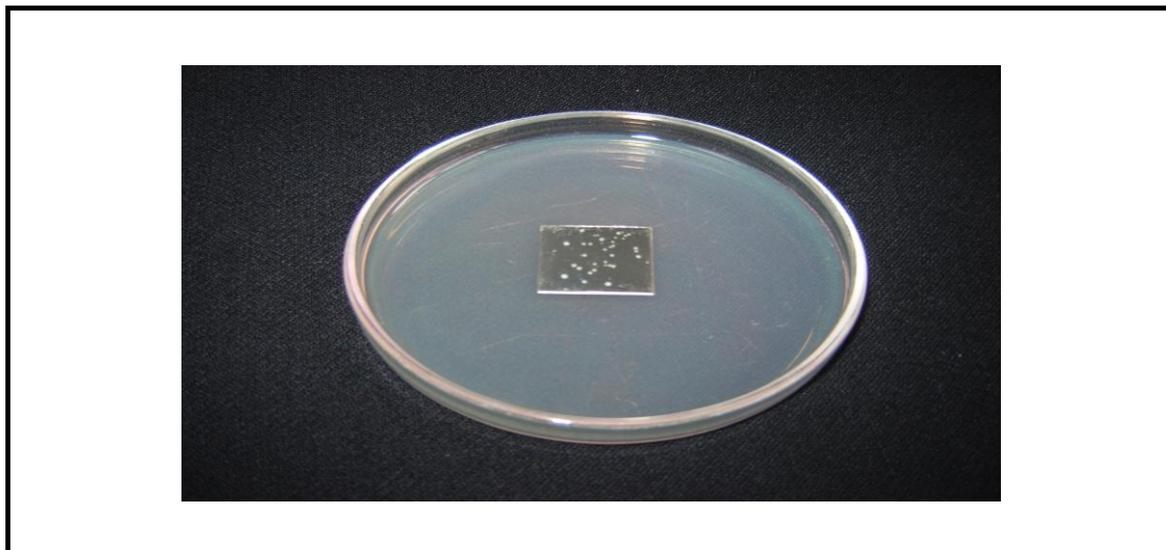
\*\*\* Indica no realizado

**ANEXO 2. Recuperación de células de *L. monocytogenes* (log ufc/cm<sup>2</sup>) obtenido en un biofilm formado a 25°C por 72 h y luego incubado en agar a 25°C por 24 h y después de aplicados los tratamientos con la mezcla de tres STB (12.800 UA/ml).**

PROBETA SONICADA (3,5 min) (Log ufc/cm <sup>2</sup> )					
Recuento Probetas* \ Tiempo	Tpo 0	0,5 h	1,0 h	6,0 h	24 h
Sonicadas**	$4,3 \pm 0,2$	<1	<1	<1	<1
Desarrollo posterior al sonicado	38	10	8	0	0

\* Los valores corresponden al promedio de 3 determinaciones (un experimento, con tres observaciones)

**ANEXO 3. Visualización del desarrollo de colonias de *L. monocytogenes* desarrolladas en la probeta control (sin tratamiento), la cual se cubrió con AST semisólido y se incubó por 48 h a 25°C**



**ANEXO 4. Análisis estadístico para determinar si los factores TIEMPO de sonicado y TEMPERATURA de incubación de probetas, afectan el recuento de *L. monocytogenes*.**

**ANEXO 4.1 Resultados obtenidos del análisis de varianza para los recuentos obtenidos.**

Analysis of Variance for RECUENTO - Type III Sums of Squares					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:TEMPERATURA	19,3129	1	19,3129	954,22	0,0000
B:TIEMPO	0,13895	3	0,0463167	2,29	0,1095
INTERACTIONS					
AB	0,179419	3	0,0598064	2,95	0,0573
RESIDUAL	0,404788	20	0,0202394		
TOTAL (CORRECTED)	20,7381	27			

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

**(Continuación ANEXO 4)**

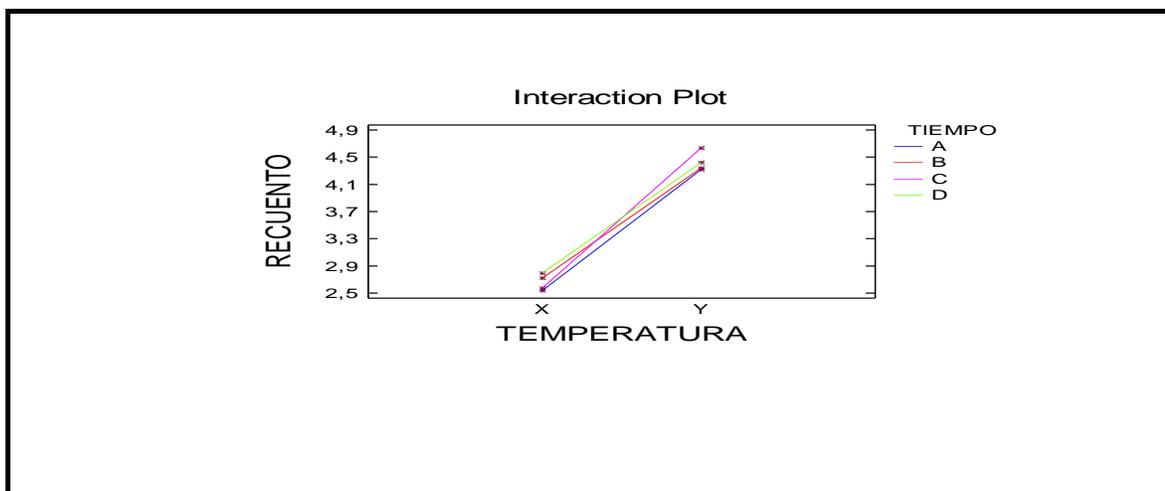
El análisis indica que la temperatura de incubación afecta el recuento de *L. monocytogenes* ( $p < 0,05$ ) y que el tiempo de incubación no afecta el recuento ( $p > 0,05$ ). Además indica que no existe una interacción entre los factores ( $p > 0,05$ )

**ANEXO 4.2 Prueba de comparación múltiple para determinar si existen diferencias al incubar *L. monocytogenes* a dos temperaturas.**

Multiple Range Tests for RECUENTO by TEMPERATURA				
Method: 95,0 percent Tukey HSD				
TEMPERATURA	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
X (10°C)	18	2,65279	0,0346658	X
Y (25°C)	10	4,43	0,0459159	X
Contrast		Difference	+/- Limits	
X - Y		*-1,77721	0,120011	

\* denotes a statistically significant difference

**ANEXO 4.3 Gráfico que representa la interacción que existe entre el tiempo y la temperatura para el recuento de *L. monocytogenes*.**



Siendo X= 10°C, Y=25°C; A= 3,5 min B= 3,75 min C= 4,00min D= 4,25min.

**ANEXO 5 Recuento de *L. monocytogenes* obtenido al aplicar tres STB por aspersión sobre un biofilm desarrollado sobre probetas de acero inoxidable**

**ANEXO 5.1 Tratamientos individuales.**

**ANEXO 5.1.1 Recuento de *L. monocytogenes* (ufc/cm<sup>2</sup>) después de sonicados y aplicados los tratamientos individualmente con las STB.**

Tratamientos Recuento Probeta	CONTROL	STB-B	STB-A	STB-C
Sonicada* ufc/cm <sup>2</sup>	7,22x10 <sup>2</sup>	1,52x10 <sup>2</sup>	3,75x10 <sup>1</sup>	<1,0X10 <sup>1</sup>
Desarrollo de colonias después de sonicado	12	7	4	1

\*Los valores corresponden al recuento de 6 determinaciones (dos experimentos, con tres observaciones cada uno)

**ANEXO 5.1.2 Recuento obtenido por experimento, de *L. monocytogenes* (log ufc/cm<sup>2</sup>) después de sonicados y aplicados los tratamientos individualmente con las STB.**

Tratamientos	Experimento*	Log ufc/cm <sup>2</sup>
Control	1	3,00
	2	2,79
Promedio		2,9 ± 0,10
STB-A	1	1,06
	2	1,34
Promedio		1,5 ± 0,24
STB-B	1	2,22
	2	1,84
Promedio		2,1 ± 0,20
STB-C	1	<1
	2	<1

\*Valores corresponden al promedio de tres observaciones por experimento

**(Continuación ANEXO 5)****ANEXO 5.1.3 Número de colonias de *L. monocytogenes* adheridas a la probeta después de sonicados y aplicados los tratamientos individualmente con las STB.**

COLONIAS (ufc/cm <sup>2</sup> )				
Tratamientos	CONTROL	STB-B	STB-A	STB-C
Experimento1	13	9	3	0
	>50	8	3	0
	15	12	4	0
Experimento2	>50	8	8	2
	>50	5	3	1
	10	4	4	0
Promedio	12 ± 2,5	7 ± 2,9	4 ± 1,9	1 ± 0,8

\*Los valores corresponden al recuento de 6 determinaciones (dos experimentos, con tres observaciones cada uno)

**ANEXO 5.2 Tratamientos en combinación****ANEXO 5.2.1 Recuento de *L. monocytogenes* (log ufc/cm<sup>2</sup>) después de sonicados y aplicados los tratamientos en combinación con STB.**

Tiempo Recuento Probeta	0,0 h	0,5 h	1,0 h	0,6 h	24 h
Control* log ufc/cm <sup>2</sup>	2,55 ± 0,09	2,64 ± 0,07	2,59 ± 0,06	3,27 ± 0,19	3,32 ± 0,22
Tratamiento** log ufc/cm <sup>2</sup>	2,57 ± 0,30	<1	<1	<1	<1
Desarrollo de colonias control*	6	6	6	9	12
Desarrollo de colonias tratamiento**	<1	<1	<1	<1	<1

\* Los valores corresponden a tres experimentos.

\*\* Los Valores corresponden al recuento de 9 determinaciones (tres experimentos con tres observaciones)

**(Continuación ANEXO 5)****ANEXO 5.2.2 Número de colonias de *L. monocytogenes* (ufc/cm<sup>2</sup>) adheridas a la probeta después de aplicada una combinación de las STB.**

TIEMPO (h)	EXPERIMENTO	TRATAMIENTO A+B+C*	CONTROL**
0	1	0	6
	2	0	4
	3	0	10
0,5	1	0	8
	2	0	3
	3	0	7
1,0	1	0	8
	2	0	4
	3	0	8
6,0	1	0	10
	2	0	8
	3	0	9
24	1	0	12
	2	0	15
	3	0	9

\*Los valores corresponden al recuento de 9 determinaciones (tres experimentos, con tres observaciones cada uno).

\*\*Los valores corresponden a una observación por experimento.

**ANEXO 5.2.3 Recuento de *L. monocytogenes* (log ufc/cm<sup>2</sup>) obtenidos de las probetas control.**

Recuento log ufc/cm <sup>2</sup> *	0 h	0,5 h	1,0 h	0,6 h	24 h
Experimento 1	2,26	2,57	2,54	3,14	3,32
Experimento 2	2,65	2,70	2,64	NR**	3,36
Experimento 3	2,55	2,64	2,59	3,41	3,47
Promedio	2,55 ± 0,09	2,64 ± 0,07	2,59 ± 0,06	3,27 ± 0,19	3,32 ± 0,22

\* Valores corresponden a tres experimentos, con una observación cada uno.

\*\* NR significa no realizado

**(Continuación ANEXO 5)****ANEXO 5.3 Análisis estadístico entre tratamientos CONTROL, BAL-A y BAL-B**

Se realizó para determinar si existen diferencias al aplicar cada tratamiento individualmente.

**ANEXO 5.3.1 Distribución y homogeneidad de varianza para los datos obtenidos de tratamientos CONTROL, BAL-A y BAL-B.**

Shapiro-Wilks W statistic = 0,923283

P-Value = 0,266452

Para evaluar la homogeneidad de varianza se aplicó el Test de Cochran, No existiendo diferencias significativas entre las desviaciones estándar con un 95% de confianza ( $p > 0.05$ ).

Cochran's C test: 0, 51687 P-Value = 0,557926

**ANEXO 5.3.2 Resultados obtenidos del análisis de varianza obtenido de tratamientos CONTROL, BAL-A y BAL-B.**

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	4,00004	2	2,00002	58,75	0,0000
Within groups	0,340455	10	0,0340455		
Total (Corr.)	4,34049	12			

Indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos con un 95% de confianza ( $p < 0,05$ )

**(Continuación ANEXO 5)****ANEXO 5.3.3 Prueba de comparación múltiple para los tratamientos CONTROL, BAL-A y BAL-B.**

Multiple Range Tests for Log ufc_cm2 by tratamiento			
Method: 95,0 percent Tukey HSD			
tratamiento	Count	Mean	Homogeneous Groups
3	4	1,5275	X
2	4	2,145	X
1	5	2,862	X
Contrast		Difference	+/- Limits
1 - 2		*0,717	0,339675
1 - 3		*1,3345	0,339675
2 - 3		*0,6175	0,358049

\* denotes a statistically significant difference.

Existen diferencias significativas entre los tratamientos CONTROL (1), BAL-A (2) BAL-B (3) con un 95% de confianza.

**ANEXO 5.4 Análisis estadístico para determinar si existen diferencias entre los valores iniciales del recuento de *L. monocytogenes* aplicados****ANEXO 5.4.1 Distribución de los datos y homogeneidad de varianza para valores iniciales del recuento de *L. monocytogenes*.**

Distribución normal

Shapiro-Wilks W statistic = 0,874215

P-Value = 0,134204

Homogeneidad de varianza

Cochran's C test: 0,593559 P-Value = 0,550876

No existiendo diferencias significativas entre las desviaciones estándar con un 95% de confianza ( $p > 0.05$ )

**(Continuación ANEXO 5)****ANEXO 5.4.2 Resultados obtenidos al aplicar un análisis de varianza para valores iniciales del recuento de *L. monocytogenes*.**

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,737976	3	0,245992	1,44	0,3350
Within groups	0,851963	5	0,170393		
Total (Corr.)	1,58994	8			

Indica que no existen diferencias significativas entre los tratamientos con un 95% de confianza ( $p > 0,05$ ).

**ANEXO 5.4.3 Prueba de comparación múltiple de Tukey para valores iniciales del recuento de *L. monocytogenes*.**

Method: 95,0 percent Tukey HSD			
Tratamiento	Count	Mean	Homogeneous Groups
2	1	2,04873	X
1	3	2,49677	X
4	3	2,87255	X
3	2	2,93354	X
Contrast		Difference	+/- Limits
1 - 2		0,448041	1,75885
1 - 3		-0,436762	1,39049
1 - 4		-0,37578	1,24369
2 - 3		-0,884803	1,86554
2 - 4		-0,82382	1,75885
3 - 4		0,0609825	1,39049

\* denotes a statistically significant difference.

No existen diferencias significativas entre los recuentos iniciales de *L. monocytogenes* con un 95% de confianza.

**(Continuación ANEXO 5)****ANEXO 5.5 Análisis estadístico para determinar si existen diferencias significativas entre el recuento obtenido de las probetas control (tiempo 0,0 a 24 h de incubación)****ANEXO 5.5.1 Distribución de los datos y homogeneidad de varianza**

Shapiro-Wilks W statistic = 0,856335

P-Value = 0,0664112

Cochran's C test: 0,417645 P-Value = 0,827855

No existiendo diferencias significativas entre las desviaciones estándar con un 95% de confianza ( $p > 0.05$ )

**ANEXO 5.5.2 Resultados obtenidos al aplicar un análisis de varianza entre las probetas control.**

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1,19536	4	0,29884	12,99	0,0075
Within groups	0,11505	5	0,02301		
Total (Corr.)	1,31041	9			

Indica que existen diferencias significativas, entre las probeta control (sin tratamientos) a distintos tiempos: 0,0; 0,5; 1,0; 6,0 y 24h con un 95% de confianza ( $p > 0,05$ ).

## (Continuación ANEXO 5)

**ANEXO 5.5.3 Prueba de comparación múltiple de Tukey para el recuento obtenido de las probetas control.**

Method: 95,0 percent Tukey HSD			
tratamiento	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	2	2,555	X
3	2	2,585	X
2	2	2,635	X
4	2	3,275	X
5	2	3,315	X
Contrast		Difference	+/- Limits
1 - 2		-0,08	0,605721
1 - 3		-0,03	0,605721
1 - 4		*-0,72	0,605721
1 - 5		*-0,76	0,605721
2 - 3		0,05	0,605721
2 - 4		*-0,64	0,605721
2 - 5		*-0,68	0,605721
3 - 4		*-0,69	0,605721
3 - 5		*-0,73	0,605721
4 - 5		-0,04	0,605721

\* denotes a statistically significant differen

Existen diferencias significativas en el recuento obtenido para las probetas control con un 95% de confianza