

Control de *Listeria monocytogenes* en salmón ahumado mediante la aplicación de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas

R. Schöbitz¹⁾, J. González¹⁾, G. Vignolo²⁾ y L. H. Molina¹⁾

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

²⁾Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA) - CONICET. Tucumán, Argentina.



Resumen

Se evaluó la capacidad inhibitoria de tres sustancias antibacterianas producidas por bacterias lácticas frente a *Listeria monocytogenes* Lsa 4/00 en medio de cultivo y en salmón ahumado en frío envasado bajo vacío y almacenado a $3.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ durante 20 días. Cuando se ensayó el efecto de lactocina 705 producida por *Lactobacillus curvatus* CRL705, nisina (Nisaplin™) y la sustancia tipo bacteriocina producida por *Carnobacterium piscicola* L 103 en forma individual, en medio TSB a 25°C durante 72 h, se observó una cinética bactericida con lactocina 705 y nisina. El efecto de la primera fue significativamente menor que el de la nisina, mientras que ésta permitió un re-crecimiento de *Listeria* luego de las 48 hs de incubación.

La estrategia más eficiente fue la combinación de las tres bacteriocinas produciendo una disminución de los viables a <10 células/ml. La aplicación de las bacteriocinas en forma de spray a trozos de salmón mostró un efecto bacteriostático impidiendo el crecimiento de *L. monocytogenes* hasta los 15 días de almacenamiento. El uso de una combinación de bacteriocinas podría ser un mecanismo efectivo para reducir la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos como salmón ahumado en frío, limitando además la presencia de células resistentes a las bacteriocinas.

Palabras claves: bacterias lácticas, cultivos bioprotectores, bacteriocinas, salmón ahumado.

Introducción

El consumo de alimentos contaminados con *Listeria monocytogenes* constituye un elevado riesgo sanitario debido principalmente a su gran capacidad para crecer en condiciones ambientales desfavorables. Los numerosos brotes de listeriosis causados por este patógeno estuvieron relacionados al consumo de diversos tipos de alimentos, como productos lácteos y cárneos, así como pescados, frutos de mar y vegetales (6, 12, 23). El control de *L. monocytogenes* en alimentos resulta difícil debido a su habilidad para crecer a temperaturas de refrigeración y su tolerancia a bajos pH y elevados niveles de NaCl y Na_2NO_3 que resultan inhibitorios para otros patógenos alimentarios. La presencia de *L. monocytogenes* en salmón ahumado en frío así como en plantas procesadoras de salmón se encuentra bien documentada en la bibliografía (5, 7, 10).

La elevada incidencia de este patógeno alimentario en pescados y frutos de mar sustenta la investigación de barreras adicionales para suplementar las prácticas tradicionales de control. El hecho que las bacterias lácticas (BL) han sido aisladas como microbiota predominante en salmón ahumado sugiere que las mismas serían capaces de crecer en presencia de la baja cantidad de carbohidratos disponibles y moderada concentración de sal.

Carnobacterium piscicola fue aislado con frecuencia como la especie dominante de este nicho ecológico (20, 22). Numerosos estudios avalan el rol de las BL en la inhibición de contaminantes y patógenos mediante la producción de metabolitos antimicrobianos como ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. La producción de estos péptidos con carácter inhibitorio fue detectada en todos los géneros de BL y han sido estudiadas durante los últimos 20 años, constituyendo un fenotipo extensamente presente en este grupo bacteriano (2, 14, 15). En este sentido cepas del género *Carnobacterium* han mostrado capacidad para producir bacteriocinas con actividad frente a *L.*

monocytogenes (4, 13, 21, 25). Las cepas de *C. divergens* V1 y *C. piscicola* V41 mostraron ser capaces de crecer y producir bacteriocinas en sistemas simulados de pescado ahumado almacenados a 4° y 8°C, produciendo un efecto bactericida y bacteriostático, respectivamente, a las dos temperaturas ensayadas. Además el uso de estas cepas como cultivos protectores, así como de las bacteriocinas producidas, no produjeron efectos adversos sobre la calidad sensorial del producto (4). Uno de los problemas de la aplicación de bacteriocinas para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* es la aparición de fenotipos resistentes entre las células sensibles, tanto en medios de cultivo como en matrices alimentarias. Este fenómeno fue observado con nisina (8) y pediocina y carnocina (11, 16). Como estrategia para minimizar la ocurrencia de células resistentes, se propuso el uso de una combinación de bacteriocinas con modo de acción diferente. Los ensayos realizados usando la combinación de tres bacteriocinas, lactocina 705, enterocina CRL35 y nisina mostraron la total inhibición de *Listeria* en medio de cultivo así como en un sistema cárneo cuando se comparó con los efectos individuales de las bacteriocinas (24). Otro ejemplo lo constituye el empleo de curvaticina 13 y nisina, cuya combinación mostró un mayor efecto inhibitorio que el uso de ambas bacteriocinas separadamente (1). La presencia de una mezcla con más de un péptido antimicrobiano tendrá efecto bactericida para un mayor número de células en una población sensible, ya que células resistentes a una bacteriocina podrán ser inhibidas por la otra. La efectividad del uso de diferentes bacteriocinas podría depender del tipo o clase al que pertenecen, las que varían sustancialmente en la naturaleza y secuencia aminoacídica (24).

En la industria procesadora de salmón *L. monocytogenes* constituye un significativo problema a nivel mundial, con una incidencia particularmente elevada en salmón ahumado en frío (17). Por esta razón el objetivo de este estudio es la evaluación de la actividad antagonista de la combinación de tres bacteriocinas producidas por BL frente a *L. monocytogenes* in vitro y en salmón ahumado en frío envasado bajo vacío.

Materiales y métodos

Microorganismos y condiciones de cultivo

Carnobacterium piscicola L 103 aislado de salmón ahumado (20) y *Lactobacillus curvatus* CRL705 aislado de embutidos fermentados y perteneciente al Cepario de CERELA fueron usados como organismos productores de una sustancia tipo bacteriocina (STB) y lactocina 705, respectivamente. Las BL fueron mantenidas y conservadas en caldo D-MRS (18) y MRS a 4°C. *Listeria monocytogenes* Lsa 4/00 también aislada de salmón ahumado (Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia) fue cultivada a 30°C usando medio TSB (tripticase soya broth).

Obtención de las bacteriocinas

Los extractos crudos de la sustancia tipo bacteriocina (STB) producida por *C. piscicola* L 103 y lactocina 705 producida por *L. curvatus* CRL 705 fueron obtenidos en caldo D-MRS (25°C, 27 hs) y MRS (30°C, 18h) respectivamente. Los sobrenadantes libres de células se obtu-



vieron por centrifugación (7.700 x g a 4°C), se ajustó el pH a 6.5 con 1M NaOH y se esterilizó por filtración (Millipore 0.22 µm). La actividad antibacteriana de los extractos obtenidos fue determinada mediante ensayos de difusión en agar, sembrando diluciones seriadas en un césped inoculado con la cepa indicadora *L. monocytogenes* Lsa 4/00 (1.0 x 10⁵ UFC/ml). Nisina fue preparada en una concentración de 1.0 x 10⁴ UI/ml a partir de un stock conteniendo 1,0 x 10⁶ UI/g (Nisaplin™, donada por Danisco, Argentina).

Ensayos de inhibición en medio de cultivo

Con el objeto de obtener actividades antimicrobianas equivalentes se inocularon matraces de 25 ml con cada una de las bacteriocinas obtenidas en forma separada y una mezcla de las tres (STB, lactocina 705 y nisina).

SORIANO

Nuestros Productos

Agar Agar - Carrageninas - Gomas
Algas Marinas - Harina de Algas

SORIANO S.A.

Planta Industrial:
J.C. Evans 40 (9105)
Gaiman - Chubut - Argentina
54-2965-491033/59

Administración y Ventas:
El Salvador 5161 (C1414BPS)
Ciudad Autónoma de Bs. As.
54-11-4774-4525

www.soriano-sa.com.ar

Las actividades finales de las bacteriocinas en TSB fueron de 100 UA/ml para STB, 200 UA/ml para lactocina 705 y 100 UA/ml para nisina. La actividad de la combinación de las tres bacteriocinas fue de 200 UA/ml. Todos los matracas fueron luego inoculados con *L. monocytogenes* Lsa 4/00 para obtener una concentración celular final de 1.0×10^6 UFC/ml. Finalmente fueron incubados a 25°C durante 72h determinándose los viables de *Listeria* a tiempo cero, 1h, 24h y 72h. Cada tratamiento se realizó por triplicado y el ensayo se repitió dos veces.

Inoculación de salmón

Se usaron trozos de 3.0 x 3.0 cm obtenidos a partir de filetes sin espinas y sin piel de salmón ahumado en frío. Los mismos fueron inoculados en condiciones de esterilidad y en forma de spray (usando en cada caso un volumen aproximado de 65 l/cm²) con un cultivo de 18h de *L. monocytogenes* Lsa 4/00 para obtener una concentración final en cada cara del trozo de salmón de 1.0×10^5 UFC/cm². Este procedimiento se repitió con cada una de las bacteriocinas y con la mezcla. Los trozos se envasaron en bolsas Cryovac, tipo BL-4 termocontraíbles, con una permeabilidad de 20-40 cm³ m⁻²/24h, 1 atm, utilizando una envasadora MINIVAC 300. El almacenamiento se realizó a $3.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ durante 20 días. Los recuentos de *L. monocytogenes* se realizaron en agar OXA (Oxoid) homogenizando el trozo completo de salmón (aprox 10 g) con 90 ml de diluyente buffer fosfato y se tomaron muestras a tiempo cero y cada cinco días. Cada tratamiento se hizo por triplicado y el experimento completo se repitió dos veces.

Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó usando el programa estadístico Statgraphics 2.0.

Resultados y discusión

La Figura 1 muestra el efecto de las tres bacteriocinas aplicadas en forma individual así como la mezcla de las tres (lactocina, nisina y STB) sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* Lsa 4/00 en medio TSB incubado a 25°C durante 72h. Lactocina 705, nisina y la combinación de las tres bacteriocinas mostraron un inmediato efecto bactericida al tiempo cero sobre *Listeria* con la disminución de más de 2 ciclos log. Luego de la adición, nisina y lactocina 705 provocaron un efecto bac-

tericida sobre *Listeria*, siendo nisina mucho más efectivo que lactocina 705 con una disminución de viables de 2.6 ciclos log y 1 ciclo log a las 48h, respectivamente. Si bien la combinación de las tres bacteriocinas y la adición de nisina fueron las únicas estrategias que mostraron una drástica reducción en el crecimiento de *L. monocytogenes*, la mezcla de bacteriocinas produjo una inhibición celular casi total, alcanzando una recuento final de <10 células/ml a las 72h. Por el contrario nisina provocó un re-crecimiento de *Listeria* después de las 48h. Cuando se usó la sustancia tipo bacteriocina (STB) producida por *C. piscicola* no se observó inhibición, presentando el patógeno el mismo perfil de desarrollo que el control sin bacteriocina. El fenómeno de re-crecimiento de *Listeria* luego de las 48h también fue observado cuando se ensayó la adición de nisina, lactocina 705 y enterocina CRL35 frente diferentes cepas de *L. monocytogenes* y *L. innocua* en medio TSB a 30°C (24). La cinética de inhibición con disminución de viables a las 24h seguido de un re-crecimiento de los sobrevivientes al final de la incubación se produjo con las bacteriocinas adicionadas individualmente, mientras que en presencia de la combinación de las tres sustancias antimicrobianas se producía la inmediata inhibición de las cepas indicadoras ensayadas. Estos resultados podrían sugerir la aparición de células resistentes en la población, efecto que se encuentra documentado en la bibliografía (3, 19). La incapacidad de la sustancia tipo bacteriocina producida por *C. piscicola* para inhibir *L. monocytogenes* observada en este estudio contrasta con los resultados obtenidos en trabajos anteriores (21), lo que podría explicarse por la menor actividad del extracto utilizado en esta experiencia. Los resultados obtenidos en medio TSB sustentan la necesidad de usar una mezcla de bacteriocinas para garantizar la total inhibición de *L. monocytogenes*.

En base a estos resultados se usó la mezcla de lactocina 705, nisina y STB para evaluar el efecto inhibitorio sobre *L. monocytogenes* Lsa 4/00 en trozos de salmón ahumado en frío almacenados bajo vacío a $3.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ durante 20 días. El crecimiento de *Listeria* sin adición de bacteriocinas mostró una marcada fase lag de cinco días, aumentando luego su población en 3.5 ciclos log a los 20 días de almacenamiento (Figura 2). Estos valores concuerdan con los informados por otros investigadores (9) para el crecimiento de *L. monocytogenes* en salmón ahumado conservado a 10°C, aunque

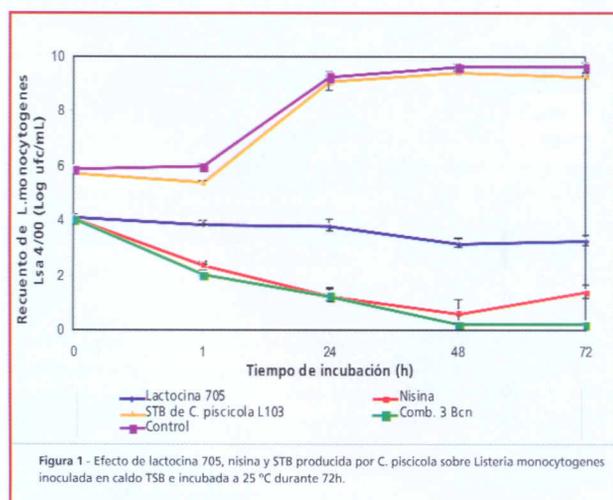


Figura 1 - Efecto de lactocina 705, nisina y STB producida por *C. piscicola* sobre *Listeria monocytogenes* inoculada en caldo TSB e incubada a 25 °C durante 72h.

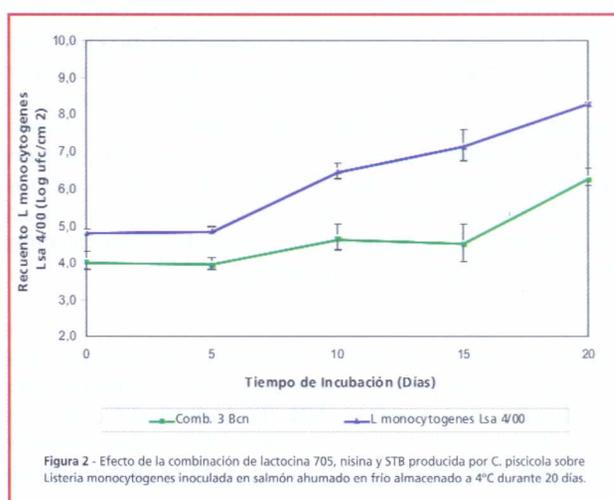
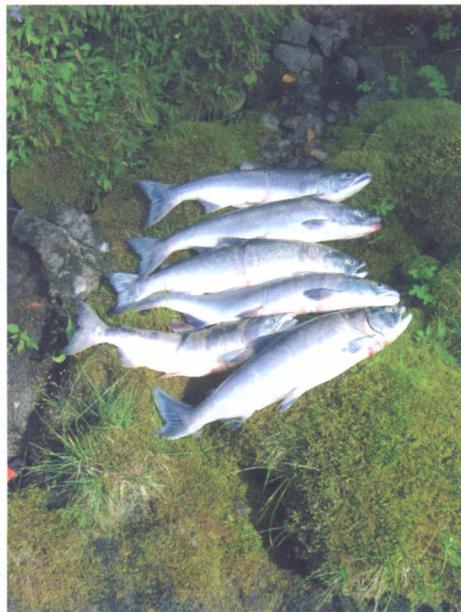


Figura 2 - Efecto de la combinación de lactocina 705, nisina y STB producida por *C. piscicola* sobre *Listeria monocytogenes* inoculada en salmón ahumado en frío almacenado a 4°C durante 20 días.

en este caso no se observó demora inicial en el crecimiento, probablemente por la mayor temperatura usada en el ensayo. En presencia de las sustancias antimicrobianas, *Listeria* también experimentó una demora inicial en el crecimiento hasta los cinco días, mostrando un efecto bacteriostático hasta los 15 días de almacenamiento, luego de lo cual incrementó su población hasta 6.25 UFC/ml a los 20 días. El efecto bacteriostático observado en salmón usando la combinación de bacteriocinas, a diferencia de la cinética bactericida observada en medio TSB, podría explicarse por la interferencia en la matriz alimentaria de compuestos tales como grasa o enzimas proteolíticas, junto a la baja temperatura de almacenamiento usada en el ensayo,



cuya presencia disminuiría la actividad inhibitoria de las bacteriocinas. Por otra parte la actividad de la mezcla de sustancias antibacterianas (200 UA/ml) podría haber sido insuficiente para la inhibición de *L. monocytogenes* en la concentración usada en este estudio. Por el contrario, estudios realizados aplicando carnobacteriocina semi-purificada (producida por *C. piscicola*) en un sistema de salmón ahumado en frío mostraron un pronunciado efecto bactericida de *L. monocytogenes* a 5°C (13). En este caso además de la mayor temperatura del ensayo se usó un sistema de jugo de salmón probablemente más libre de factores que puedan afectar adversamente la actividad de las bacteriocinas.

Conclusiones

Si bien las disminuciones observadas en la población de *L. monocytogenes* en presencia de las bacteriocinas

son pequeñas (efecto bacteriostático) y considerando que se parte de materias primas de buena calidad higiénica, el efecto resulta altamente significativo. El uso de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas constituye una valiosa herramienta para extender la vida útil de los alimentos y no debe ser utilizado como único factor de seguridad sino como un complemento en la secuencia de barreras existente en el alimento.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado parcialmente con fondos del proyecto DID/UACH 200316, de la Universidad Austral de Chile, Valdivia Chile. Los autores agradecen a Danisco, Argentina por la donación de nisina.

Bibliografía

- 1-Bouttefroy, A., Millière, J. (2000). Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC15313. *Int. J. Food Microbiology* 62, 65-75.
- 2-Cotter, P., Hill, C., Ross, R. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews* 3, 777-788.
- 3-Crandall, D., Montville, T. (1998). Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl Environ Microbiology* 64, 231-237.
- 4-Duffes, F., Corre, C., Leroi, F., Dousset, X., Boyaval, P. (1999). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. On vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. *J Food Protection* 62, 1394-1403.
- 5-Eklund, M., Peterson, M., Poysky, F., Paranjpye, R., Pelroy, G. (2004). Control of bacterial pathogens during processing of cold-smoked and dried salmon strips. *J Food Protection* 67, 347-451.
- 6-Gombas, D., Chen, Y., Clavero, R., Scott, V. (2003). Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *J Food Protection*



LA PRIMERA DE CUYO S.R.L.

ENVASES FLEXIBLES

Pouchs - Laminados
Bobinas para envasadoras automáticas
Bolsas de excelencia para presentar sus productos

Vestimos su producto... Distinguimos su empresa

Teléfono (0261) 432-3300

www.lpcuyo.com.ar

9 de Julio 97 - Zona Industrial - Godoy Cruz - Mendoza.

66, 559-569.

7-Gudmundsdottir, S., Gudbjornsdottir, B., Lauzon, H., Einarsson, H., Kristinsson, K., Kristjansson, M. (2005). Tracing *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon and its processing environment in Iceland using pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiology* 101, 41-51.

8-Harris, L., Fleming, H., Klaenhammer, T. (1991). Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC19115 Scott A, and UAL 500 to nisin. *J. Food Protection* 54, 836-840.

9-Katla, T., Møretro, T., Aasen I., Holck, A., Axelsson, L., Naterstad, K. (2001). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiology* 18, 431-439.

10-Klaeboe, H., Rosef, O., Saebo, M. (2005). Longitudinal studies on *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in two salmon processing plants. *Int J Environ Health Research* 15, 71-77.

11-Mathieu, F., Michel, M., Lebrihi, A., Lefebvre, G. (1994). Effect of the bacteriocin carnocin CP5 and of the producing strain *Carnobacterium piscicola* CP5 on the viability of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in salt solution, broth and skimmed milk, at various temperatures. *Int. J. Food Microbiology* 22, 155-172.

12-Mead, P., Dunne, E., Graves, L., Wiedmann, M., Patrick, M., Hunter, S., Salehi, E., Mostashari, F., Craig, A., Mshar, P., Bannerman, T., Saunders, B., Hayes, P., Dewitt, W., Sparling, P., Griffin, P., Morse, D., Slutsker, L., Swaminathan, B. (2005). Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. *Epidemiol. Infection* 1, 1-8.

13-Nilsson, L., Ng, Y., Christiansen, J., Jørgensen, B., Gróttinum, D., Gram, L. (2004). The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *J Appl Microbiology* 96, 133-143.

14-O'Sullivan, L., Ross, R., Hill, C. (2002) Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84, 593-604.

15-Papagianni, M. (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnology Advances* 21, 465-499.

16-Rekhif, N., Atrih, A., Lefebvre, G. (1994). Selection and proper-

ties of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains. *Curr. Microbiology* 28, 237-241.

17-Rørvik, L. (2000). *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. *Int. J. Food Microbiology* 62, 183-190.

18-Schillinger, U., Stiles, M. (1993). Bacteriocin production by *Carnobacterium piscicola* LV 61. *Int. J. Food Microbiology* 20, 131-147.

19-Schillinger, U., Chung, H., Keppler, K., Holzapfel, W. (1998). Use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria to inhibit spontaneous nisin-resistant mutants of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J Appl. Microbiology* 85, 657-663.

20-Schöbitz, R., Zaror, T., León, O., Costa, M. (1999). A bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* for the control of *Listeria monocytogenes* in vacuum-package meat. *Food Microbiology* 16, 249-255.

21-Schöbitz, R., Suazo, V., Costa, M., Ciampi, L. (2003). Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiology* 84, 237-244.

22-Truelstrup Hansen, L., Drewes Røntved, S., Huss, H. (1997). Microbiological quality and shelf-life of cold-smoked salmon from different processing plants. *Food Microbiology* 15, 137-150.

23-Vaillant, V., de Valk, H., Baron, E., Ancelle, T., Colin, P., Delmas, M., Dufour, B., Pouillot, R., le Strat, Y., Weinbreck, P., Jouglu, E., Desenclos, J. (2005). Foodborne infections in France. *Foodborne Pathog Diseases* 2, 221-232.

24-Vignolo, G., Palacios, J., Fariás, M. E., Sesma, F., Schillinger, U., Holzapfel, W., Oliver, G. (2000). Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Curr Microbiology* 41, 410-416.

25-Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N., Montville, T. (2003). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. *J Food Protection* 66, 1420-1425.



ARLA FOODS INGREDIENTS S.A.

La experiencia y fortaleza de Arla Foods Ingredients nunca antes fue tan fácil de alcanzar por las industrias alimentarias de América Latina.

Nuestra nueva planta de Proteínas Lácteas Funcionales proveerá a la Región de ingredientes funcionales brindando importantes ventajas en el desarrollo de productos alimentarios.

Las principales aplicaciones donde participan nuestras proteínas funcionales:

-  Productos fermentados
-  Helados
-  Quesos
-  Nutrición
-  Emulsiones
-  Carnes y pescados
-  Panificación y confitería

Dardo Rocha 3234 (B1640FTX) Martínez - Buenos Aires - Argentina
Tel.: (54-11) 4717-0555 / Fax: (54-11) 4717-5551
e-mail: magva@arlafoods.com / mariana.gomez.vazzana@arlafoods.com