



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Autora: María Verónica Lancelle

Directora: Lic. Susana María Jiménez

Co-director: Dr. Arturo Carlos Simonetta

Jurados: Dr. Oscar Garro, Dra. María Cristina Lurá, Dra. María Luján Capra

“Estudio de tratamientos con sobrenadantes de cultivos de bacterias lácticas bacteriocinogénicas para el control de *Salmonella* y de la microflora de alteración en carcasas de pollo”.

**Tesis presentada para optar al grado académico de Magister en Ciencia y Tecnología
de Alimentos**

Santa Fe – 2015

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi mamá Gilda que es mi adorado Ángel de la Guarda y a mi papá Federico, quienes me han apoyado para poder llegar a esta instancia de mis estudios, siempre presentes en todo momento, siendo el pilar principal para la culminación de la misma.

Muchos años después, sus enseñanzas persisten y aquí estoy, con un nuevo logro, mi Tesis de Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

A mis hijos, Facundo y Helena que son mi mayor motivación para no rendirme en los estudios y poder llegar a ser un ejemplo para ellos.

A mi esposo Darío, quien es mi amor incondicional y el impulso durante mi carrera.

AGRADECIMIENTOS

Dado que esta Tesis es fruto del trabajo conjunto de muchas personas que, de una u otra manera, hicieron esto posible, quiero aprovechar la oportunidad para agradecerles profundamente.

A Dios, por protegerme y darme fuerzas para superar obstáculos y dificultades a lo largo de toda mi vida.

A mi familia, que ha sido la base de mi formación. A cada uno de ellos que han aportado grandes cosas a mi vida, y me han ayudado a enfrentar este difícil camino, les agradezco por todo, en especial por ser los principales benefactores del desarrollo de mi tesis.

A mi Directora y Co-Director, Lic. Susana María Jiménez y Dr. Arturo C. Simonetta, mis guías, por enseñarme tanto, por dedicarme su tiempo y paciencia, por su entrega al servicio de la vocación.

A las Bioqcas. María Sara Salsi y María del Carmen Tuburzi y a la Tca. Qca. María Alejandra Moguilevsky, del Laboratorio de Microbiología del ITA, por su gran ayuda en el desarrollo del trabajo.

A la Dra. Marta Carrasco, a la Mg. Karen Russell-White y al Mg. Hugo Scarinci de la Cátedra de Microbiología y Biotecnología, Departamento de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ingeniería Química (F.I.Q) UNL, por sus orientaciones y ayuda en la práctica en el laboratorio.

A las Dras. María Inés Caffer y Mariana Pichel, del Instituto "Carlos Malbrán", ANLIS-Buenos Aires, por la identificación de las distintas serovariedades de las cepas aisladas en nuestros laboratorios.

INDICE

DEDICATORIA	1
AGRADECIMIENTOS	3
1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN	14
2.1. Generalidades en avicultura y su problemática microbiana	15
2.2. Generalidades sobre las bacterias del ácido láctico (BAL)	25
2.3. Efecto beneficioso de las bacterias lácticas en los alimentos	29
2.3.1. Extensión de la vida útil	29
2.3.2. Sustancias antimicrobianas producidas por BAL	30
2.3.2.1. Ácidos Orgánicos	30
2.3.2.2. Peróxido de Hidrógeno	32
2.3.2.3. Diacetilo	32
2.3.3. Otros compuestos antimicrobianos no proteicos sintetizados por BAL	33
2.3.3.1. Reuterina	33
2.3.3.2. Ácido Fenilacético	34
2.3.3.3. Efectos combinados	34
2.3.4. Compuestos antimicrobianos proteicos sintetizados por BAL	35
2.3.4.1. Bacteriocinas	35
2.4. Clasificación, estructura y propiedades de las bacteriocinas	37
2.4.1. Criterios para definir las y clasificación	37
2.4.2. Espectro de inhibición de las bacteriocinas	39

2.4.3. Propiedades bioquímicas: Tolerancia de las bacteriocinas al calor, acidez y enzimas.....	41
2.4.4. Modo de acción.....	42
2.5.- Aplicación de las bacteriocinas en la industria alimentaria.....	44
3. OBJETIVOS.....	47
3.1 Objetivo General.....	48
3.2 Objetivos Parciales.....	48
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
4.1. Aislamiento de los microorganismos empleados.....	51
4.1.1. Aislamiento de BAL a partir de intestinos de pollos.....	51
4.1.2 Aislamiento de cepas de <i>Salmonella</i> provenientes de diferentes muestras de pollo y del alimento aviar.....	52
4.2. Identificación de los microorganismos aislados.....	54
4.2.1. Identificación de las cepas de <i>Salmonella</i>	54
4.2.2. Identificación de las cepas de BAL.....	54
4.3. Cepas utilizadas.....	54
4.3.1. Cepas de BAL.....	54
4.3.2 Cepas Blanco.....	55
4.4. Conservación de las cepas.....	55
4.4.1. <i>Salmonella</i> y otras cepas blanco.....	55
4.4.2. Bacterias Ácido Lácticas.....	56
4.5. Determinación de la capacidad inhibitoria de las cepas de BAL contra las cepas blanco o sensibles.....	57
4.5.1. Screening preliminar mediante el ensayo de la doble capa de agar.....	57

4.5.2. Ensayo de Difusión en Agar.....	58
4.5.2.1. Obtención de los sobrenadantes libres de células (SLC).....	58
4.5.2.2. Determinación de la actividad antibacteriana de los sobrenadantes libres de células (SLC) obtenidos de cultivos de las cepas de BAL seleccionadas.....	59
4.6. Caracterización primaria de los SLC de bacterias ácido lácticas.....	60
4.6.1. Ensayos Enzimáticos.....	60
4.6.2. Determinación de algunos parámetros fisicoquímicos.....	61
4.6.2.1. Tratamientos térmicos.....	61
4.6.2.2. Sensibilidad frente al pH.....	61
4.7. Determinación del modo de acción y de la capacidad lítica.....	62
4.7.1. A temperatura óptima de crecimiento (37°C).....	62
4.7.2. A temperatura de refrigeración (6,5°C).....	62
4.8. Evaluación sensorial. Diseño experimental.....	63
4.8.1. Muestras.....	63
4.8.2. Rociado de las porciones.....	64
4.8.3. Panel de evaluadores.....	66
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
5.1. Cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) seleccionadas.....	68
5.2. Caracterización taxonómica de las cepas de BAL seleccionadas.....	69
5.3. Caracterización taxonómica de las cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de canales de pollo y alimento aviar.....	70

5.4. Determinación de la actividad antibacteriana de los SLC obtenidos de cepas de BAL seleccionadas.....	72
5.5. Caracterización preliminar de los SLC mediante ensayos físico químicos.....	76
5.5.1. Efecto de la temperatura (100°C durante 10 y 30 min).....	76
5.5.2. Efecto del pH.....	79
5.6. Caracterización enzimática.....	84
5.7. Determinación del modo de acción.....	90
5.7.1. Cinéticas de crecimiento a 37°C.....	90
5.7.2. Cinéticas de crecimiento a 6,5°C ± 0,3.....	101
5.8. Análisis sensorial.....	111
5.8.1. Evaluación del color.....	111
5.8.2. Evaluación del olor.....	112
6. CONCLUSIONES.....	117
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123

1. RESUMEN

La reducción de la carga bacteriana que contamina la carne de pollo es un desafío para las industrias, tanto de los países desarrollados como en vías de desarrollo. Este interés tiene una estrecha relación con la salud pública cuando se trata de disminuir la frecuencia de aparición de cepas patogénicas en dichas canales y/o el número de microorganismos que permanecen en las mismas. Los patógenos posibles serían: *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, etc. La salmonelosis es una de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) más frecuentemente reportadas en todo el mundo, principalmente por el consumo de pollo y huevos, de lo cual deriva la importancia de una pertinente evaluación epidemiológica y posterior control.

En los años recientes se han estudiado en profundidad tecnologías que analizan las posibilidades de descontaminación de aves en las diferentes etapas del procesamiento. El aumento de la demanda de productos conservados de forma natural o con el agregado de sustancias naturales ha estimulado la obtención de alimentos así tratados y/o con un procesamiento mínimo. Esta tendencia ha despertado el interés hacia las sustancias naturales con capacidad antimicrobiana comprobada para conservar los alimentos.

Las bacterias ácido lácticas (BAL), consideradas inocuas para su incorporación a alimentos ya que han recibido el *status* de GRAS (Generally Recognized as Safe) otorgado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), tienen una larga historia en la obtención de alimentos fermentados (quesos, yogures, etc.) y, a su vez, un potencial futuro en la biopreservación, debido a su

habilidad para producir sustancias antimicrobianas, que incluyen ácidos láctico y acético, diacetilo, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas.

La obtención de datos de efectiva inhibición y/o reducción de población microbiológica por el uso de bacteriocinas crudas o sobrenadantes libres de células (SLC), permitirá su uso para el control de la prevalencia y número de *Salmonella* en productos aviares, y también para prolongar su vida útil en refrigeración. El uso de SLC como estrategia alternativa de control para reducir los riesgos microbianos es una temática que ha sido poco abordada, especialmente en la producción avícola. Es así que no se ha encontrado un número significativo de trabajos acerca de la utilización de bacteriocinas como antimicrobianos sobre pollo faenado fresco, y en consecuencia estos estudios aportarán una información útil en la temática perseguida.

Esta Tesis enfocó el estudio de la capacidad de cepas de BAL, aisladas de la microbiota naturalmente presente en los pollos, para producir compuestos antimicrobianos, con el objetivo de estudiar la evolución de las poblaciones de cepas de *Salmonella* y la inhibición de la microflora de alteración en presencia de los citados compuestos.

Se aislaron 62 cepas de BAL de intestinos de pollos, de las cuales sólo 26 generaron halos de inhibición contra la casi totalidad de las cepas utilizadas como blanco (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovariedad Hadar y otros serotipos de *Salmonella*). De las 26 cepas mencionadas se seleccionaron 10, que fueron las que generaron los mayores halos de inhibición, para llevar a cabo la producción de

los SLC. Con estos últimos se procedió a evaluar la posibilidad de aplicarlos para controlar el desarrollo de microorganismos causantes de ETA o alterantes, ya sea por sí solos o asociados a baja temperatura de almacenamiento.

Los resultados de la caracterización de los SLC provenientes de diferentes cepas de BAL, en lo referente a tratamientos térmicos a 100°C durante distintos tiempos de contacto, indicaron la termorresistencia presentada por todos ellos en las condiciones ensayadas. Además, el estudio a diferentes pH sugirió la presencia de compuestos con actividad inhibitoria distintos del ácido láctico. Por último, si bien se trató solamente de un ensayo de caracterización primaria, el efecto de los tratamientos con enzimas proteolíticas indicó la probable presencia de compuestos proteicos o peptídicos en la composición de todos los SLC ensayados.

Todas estas razones fortalecieron y justificaron la investigación de las propiedades de los sobrenadantes libres de células (SLC) obtenidos de cultivos de BAL bacteriocinogénicas aisladas de la Región Santa Fe, y su posible uso como antimicrobianos.

Para ello se determinó la sensibilidad frente a dichos SLC de distintas cepas pertenecientes a especies bacterianas causantes de ETA o alterantes de alimentos. Entre las cepas evaluadas varios serotipos de *Salmonella*, apropiadamente caracterizados al inicio de las tareas de investigación, resultaron sensibles. A estas cepas se las cultivó en presencia de los SLC y bajo distintas condiciones de temperatura. Se pudo determinar la existencia de sinergia entre la actividad antibacteriana de los SLC y la temperatura de refrigeración, dado que fue

más efectiva la inhibición del patógeno a temperatura de refrigeración (6,5°C) que a la temperatura de cultivo (37°C).

Por último, también se procedió a evaluar los caracteres sensoriales de olor y color, a fin de determinar si el tratamiento con SLC producía alteraciones detectables en ellos en la carne de pollo almacenada a baja temperatura. Los ensayos efectuados demostraron que no se detectaron cambios significativos a nivel sensorial (olor y color), de lo que se deduce que el público consumidor aceptaría, o al menos no cuestionaría, su aplicación.

Los resultados obtenidos permiten concluir que el uso de SLC de BAL asociado a las bajas temperaturas que se aplican en el almacenamiento de canales de pollo constituye una estrategia promisorio para el control de la exposición del hombre al patógeno por el consumo de dicho alimento.

2. INTRODUCCIÓN

La inocuidad de los alimentos engloba acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los mismos. Las políticas y actividades que persiguen dicho fin deberán abarcar toda la cadena alimenticia, desde la producción al consumo (OMS, 2015). Una de las causas principales de deficiencia en la seguridad alimentaria se da por el ataque microbiano (bacterias, levaduras y mohos), el cual tiene efectos en la salud y económicas evidentes, tanto para los consumidores, por el efecto adverso a su salud después del consumo, como para los fabricantes (deterioro de materias primas y productos elaborados antes de su comercialización, pérdida de imagen de la marca, etc.) y distribuidores (deterioro de productos después de su adquisición y antes de su consumo).

2.1. Generalidades en avicultura y su problemática microbiana

La cría de las aves, como actividad industrial en la Argentina, puede situarse alrededor de los años 60 (CEPA, 2013). Desde esa época el sector creció sostenidamente en equipamiento y dedicó tiempo y esfuerzo a la mejora en el aseguramiento de la calidad e inocuidad de sus productos. Este segmento de la agricultura es uno de los que más ha evolucionado en la Argentina en los últimos 15 años. Actualmente, vive un momento de gran expansión, con un número cada vez más importante de empresas que cuentan con tecnologías de avanzada e invierten en mejores y más eficientes procesos de producción.

En el transcurso de los diez últimos años el sector avícola ha logrado, a través de la integración vertical, la elaboración de un producto homogéneo, trazable, seguro y de elevada calidad, que es reconocido y demandado en el mundo.

En término sanitarios, Argentina se halla libre de enfermedades de Newcastle (con vacunación) y de Influenza Aviar, situación que es reconocida por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2007).

La producción en Argentina se concentra, por orden de importancia, en las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Santa Fe y Córdoba.

Según datos de la SAGPyA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación), la faena en establecimientos con habilitación del Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) (más de 50 plantas) se ha incrementado sustancialmente con el correr de los años. Tal es que el consumo *per capita* pasó de 22 kg en el año 1997 a 45,9 kg en el 2014, lo que representa un aumento muy importante en los pocos años transcurridos (CEPA, 2014).

A partir de los años 2003 y 2005, la avicultura argentina creció casi un 50%. Posteriormente, en el 2014, se registró una faena diaria de 2.955.145 aves, y se reportó también la existencia de 29 empresas exportadoras (CEPA, 2014). La Cámara de la Industria y el Comercio de Carnes y Derivados de nuestro país publicó en enero de 2013 que el consumo doméstico absorbió 1,65 millones de toneladas de pollo, es decir 4,5% más que en 2011.

En nuestro mercado se considera al pollo como un sustituto de la carne vacuna, y dada la importante suba en el precio de ésta, se eleva la demanda del

producto aviar. Por otra parte, no sólo el mercado interno a abastecer resulta atractivo para el sector avícola; existe también un mercado externo que posibilita una excelente comercialización e invita al compromiso de mayores inversiones y ofertas del sector.

El peso promedio de los pollos faenados en la década de los años ´80 era de 2,25 kg y hoy se encuentra en 2,6 kg. Debe destacarse que anteriormente las aves se sacrificaban a los 54 días de nacidos, luego a los 48 y hoy se hace a los 46 días.

Las plantas habilitadas por SENASA deben cumplir con las reglas de procedimientos adecuados para el suministro nacional de sus productos, en sus condiciones de procesamiento, almacenamiento y venta, reguladas por el Código Alimentario Argentino. La adopción de dicha reglamentación garantiza la trazabilidad de los productos. Cabe aclarar que a lo largo de la cadena de producción de pollos los establecimientos cuentan con controles oficiales por parte del organismo de fiscalización sanitaria, SENASA, enmarcados en diversas normativas legales (Resolución SENASA N° 553 del 08/07/2002, que sustituye al texto completo que fuera aprobado por el Decreto del PEN N°4238 del 19/07/68). Tanto en la etapa de crianza de las aves, como en la de elaboración del alimento en la de incubación de huevos fértiles, en la de faena de las aves y en la de elaboración de productos procesados, los establecimientos deben ajustarse a reglamentaciones establecidas por este organismo, que permiten cumplir con las normas de higiene requeridas para el producto terminado.

Estas Normas están contempladas en el Capítulo II del Código Alimentario Argentino (Ley N° 18284/69, Decreto N° 2126/71). En el Capítulo VI del mismo Código se definen algunas condiciones para el procesado, conservación y venta de aves. Además, tanto para la comercialización interna de los países miembros, como para la venta internacional, en el Codex Alimentarius (2005), Volumen X "Carne y Productos Cárnicos", se presentan con carácter orientativo, entre otros, el Código de Prácticas de Higiene para la Carne, con conceptos que deben ser atendidos.

Los establecimientos faenadores introducen su producción al mercado a través de diversas vías. Algunas de ellas implican el consumo directo, y en otros casos el pollo constituye el insumo de un proceso de elaboración de productos rebozados. Es así que las empresas tienen clientes diferenciados, tales como super e hipermercados, plantas procesadoras de productos semielaborados y el canal institucional, que incluye restaurantes, hoteles, confiterías, escuelas, dependencias de las Fuerzas Armadas, hospitales, comedores, etc.

En las góndolas de comercialización de mercaderías argentinas pueden encontrarse gran variedad de productos crudos de origen aviar: pollo entero (con o sin menudos) enfriado o congelado, trozado (pechuga, pata muslo, ala), pollo deshuesado o supremas y rebozados (milanesas, bocadillos). Asimismo, se podrán encontrar una gran variedad de productos cocidos.

Dentro de la carga rutinaria microbiológica presente en las aves, *Salmonella* spp. es una de ellas, microorganismo que es considerado como uno de los peligros biológicos transmitidos por los alimentos, ya que esta bacteria es el

agente etiológico de la salmonelosis humana y de infecciones en animales (FAO, 2002; Caffer *et al.*, 2007). La carne de pollo y los huevos han sido clasificados como los principales alimentos capaces de producir salmonelosis humana luego del consumo.

Debido al incremento en la incidencia de esta enfermedad transmitida por alimentos (ETA), y a través de los registros aparecidos en los últimos años a nivel mundial (EFSA, 2015; Akhtar *et al.*, 2012), este tema se ha convertido en un objetivo prioritario de la salud pública y de la seguridad alimentaria (Anónimo, 2009).

Según referencias publicadas en Latinoamérica por el Global *Salmonella* Surveillance, Región Sud América (WHO) (datos cedidos por los doctores Norma Binsztein y Enrique Pérez, coordinadores del programa WHO-GSS – Sud América, y en nombre de los participantes de la Red), los porcentajes de alimentos portadores de *Salmonella* corresponden a: carnes (33%), aves (20%), lácteos (11%), huevos (8%), alimentos preparados (14%), pescados y mariscos (2%) y otros (12%).

Las aves de corral están frecuentemente contaminadas con este patógeno y llegan a la planta procesadora con una elevada y variada carga bacteriana, tanto externamente como en su tracto digestivo (Keener *et al.*, 2004; Uribe y Suárez, 2006; Jiménez *et al.*, 2008). Por lo tanto, la carne del ave queda a menudo contaminada por el agente patógeno durante el sacrificio y, posteriormente, en la elaboración de derivados (Whyte *et al.*, 2002).

Se debe considerar que la exposición a *Salmonella* a partir del consumo de pollo y/o productos avícolas representa un riesgo considerable para los consumidores en todas las regiones del mundo (Comisión del Codex Alimentarius, 2009). Sin embargo, el riesgo en los diferentes países varía en función de las medidas de control y las prácticas implementadas a lo largo de la cadena, desde la producción primaria hasta la preparación final de la carne para el consumo. Está perfectamente documentado que la cocción completa de los alimentos y la toma de medidas de limpieza y desinfección adecuadas en la cocina, participan activamente en el control del patógeno (EFSA, 2009).

Durante la conversión del pollo en carne para consumo, las canales pasan varios estadios de procesamiento, de los cuales el escaldado, desplume, evisceración, duchado interior – exterior y enfriamiento por inmersión en agua, son los de mayor relevancia para la contaminación microbiana. El incremento de la carga bacteriana en las mismas puede ocurrir por contaminación cruzada con el ambiente, entre canales y con los equipos de procesamiento (Thomas and McMeenkin, 1980; Olsen *et al.*, 2003).

Velilla *et al.* (2011) informaron que las cepas de *Salmonella* aisladas de pollos parrilleros en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Entre Ríos, fueron caracterizadas como: *S. Infantis*, *S. Thompson*, *S. Rissen*, *S. Agona*, *S. Brandeburgo*, *S. Enteritidis* y *S. Oranienburg*. Estos serotipos, entre otros, aparecen también reportados por la Comunidad Europea en el informe “*The community summary report on food-borne outbreaks in the European Union*” (EFSA, 2009). Este documento informa, a su vez, que la prevalencia de

Salmonella en canales de pollo es del 23,7%, dato que surge de los países participantes de la Comunidad y que varía desde 0% a 68.2% (EFSA, 2009).

Hasta el momento no se cuenta con datos oficiales de prevalencia de *Salmonella* en los pollos de Argentina, es decir, no hay datos de pollos vivos en granjas, como tampoco de canales a la salida del procesamiento. Sin embargo, a partir de investigaciones anteriores sobre este patógeno en la región Santa Fe, realizadas por Jiménez *et al.* (2002), se reportó la prevalencia de *Salmonella* en las canales inmediatamente sacrificadas en valores de alrededor del 20 - 20,8%.

La información existente sobre los parámetros que afectan el crecimiento/no crecimiento de *Salmonella* es bien conocida y está disponible en la literatura científica internacional (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2010a; Buchanan *et al.*, 1989; ICMSF 5, 1996; Faura y Angulo, 2008; Juneja *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2012), pero no existían antecedentes en nuestro país acerca de estos valores para cepas de salmonelas nativas hasta la concreción de los estudios de investigación realizados en el 2012 por la Lic. Archelasqui. Como resultado de su investigación se informaron los valores de crecimiento/no crecimiento para cepas autóctonas de salmonella aisladas de canales de pollo y del ambiente aviar de la región Santa Fe, en función de condiciones extremas de temperatura (T), pH y actividad de agua (a_w). Asimismo, se encuentran también en el mismo estudio, resultados sobre combinaciones simultáneas de dichos parámetros realizadas según un diseño experimental, y cuyos datos fueron modelados según la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM). Estos modelos están basados en ecuaciones

polinomiales de segundo orden, que permiten predecir el comportamiento de los microorganismos bajo condiciones establecidas (Buchanan *et al.*, 1993).

Organismos internacionales tales como la Autoridad Europea de Inocuidad Alimentaria (EFSA), el Servicio de Inspección e Inocuidad de Alimentos (FSIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA), Consumers International y los organismos de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), por medio del Codex Alimentarius, indican que el control de alimentos debe ser realizado a través de la evaluación del riesgo, mediante el uso de Análisis de Riesgos (FAO/WHO, 2002), y confieren gran importancia a lograr productos inocuos a partir de la implementación del sistema de Análisis de Peligros y Control de Puntos Críticos (HACCP) en los procesos industriales (Smulders *et al.*, 1998; White *et al.*, 2007). Cabe aclarar que la implementación de este sistema continúa siendo voluntaria en los procesos productivos en Argentina.

Durante el procesamiento, especialmente la matanza y evisceración, las bacterias se diseminan desde las plumas y el tracto intestinal de aves infectadas a la superficie de las canales (James *et al.*, 2000), con la posible participación en la contaminación de equipos y canales adyacentes.

Sofos *et al.* (1998) estudiaron la prevalencia de *Salmonella* spp. en canales de pollo en varios puntos del procesamiento. Los autores consideraron que los tratamientos de inmersión y duchado, y de enjuague o lavado por aspersion, son necesarios para remover la contaminación visible de las canales que incluye pelos, materia fecal y huesos.

La adherencia bacteriana a superficies resulta de una compleja interacción entre la célula, la superficie de adherencia y la fase líquida. La piel del pollo tiene ciertas características que permiten la adherencia bacteriana (Kim *et al.*, 1996). Este proceso es dependiente del tiempo, por lo que se asume que los microorganismos provenientes de la ruptura de intestinos o del escape de la materia fecal durante el procesamiento, se encuentran débilmente adheridos a la piel de la canal (Jiménez *et al.*, 2009). Después de la evisceración, el punto de duchado de las canales debería remover estos residuos, incluida su carga microbiana. En la práctica, la remoción completa de las heces visibles es difícil de conseguir y suele pasar esa contaminación con microorganismos de alteración y patógenos a canales vecinas de la línea y al agua del tanque de enfriamiento (Jiménez *et al.*, 2002).

Se han estudiado por años diferentes métodos para la descontaminación de pollos y para mejorar la vida útil de las canales y sus productos (Bolder, 1997; James *et al.*, 2000; Whyte, 2002).

El enjuague de canales con agua fue concebido como una estrategia efectiva en la reducción de la carga microbiana (Siragusa, 1995); mediante su uso, el número de células microbianas se reducía por remoción de la película líquida que las contenía, antes de que éstas lograran adherirse a la superficie de la piel del ave (Sofos *et al.*, 1998). Sin embargo, el enjuague con agua como único tratamiento no logró grandes disminuciones de la carga bacteriana.

Posteriormente se analizó el uso del vapor de agua en la descontaminación. La ventaja de este proceso fue la rápida transferencia de calor, la ausencia de

residuos y una intensa limpieza de las superficies; pero la dificultad de aplicarlo de manera continua y por cortos tiempos y así evitar daños en el producto fue su gran desventaja (James *et al.*, 2002).

El cloro es el agente sanitizante de equipamientos, utensilios y agua y, sin dudas, el más comúnmente usado en el lavado de canales de pollo en diferentes etapas del procesamiento (Sofos *et al.*, 1998). El inconveniente de éste es su fácil inactivación en contacto con materia orgánica.

Tessi *et al.* (1993) reportaron la ventaja significativa del uso de ácido acético en comparación con otros ácidos orgánicos en la reducción del número de microorganismos presentes en canales de pollo recién faenadas.

Una mejora en la efectividad del punto de duchado de canales, posterior a la evisceración, puede ser alcanzada sin mayores costos para las empresas con la implementación de sistemas de duchados secuenciales y previo al ingreso al tanque de enfriamiento de la línea de proceso existente, sin requerir de mayores espacios (Li *et al.*, 1997; Jiménez *et al.*, 2007). Esto puede realizarse con el agregado o no de un ácido orgánico en concentraciones apropiadas u otros productos descontaminantes, como por ejemplo clorito de sodio acidificado, el cual se encuentra aprobado y recomendado por el JECFA de FAO/OMS (2007) como excelente reductor de la microflora de las canales.

El aumento de la demanda de productos conservados de forma natural o con la adición de sustancias naturales ha estimulado el desarrollo de alimentos que son obtenidos con un procesamiento mínimo. Esta tendencia ha despertado el

interés hacia las sustancias naturales con capacidad antimicrobiana para conservar los alimentos (Cleveland *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2008).

En general, la preservación biológica es atractiva como método seguro para producir alimentos con bajo contenido de ingredientes químicos destinados al control del crecimiento microbiano (Schillinger *et al.*, 1996). La biopreservación se refiere, en el caso de las carnes, a extender la vida útil y mejorar la seguridad del alimento utilizando su microflora natural y los productos antibacterianos producidos por ella (Hugas, 1998; Ross *et al.*, 2002; Belfiore *et al.*, 2007).

Los efectos potencialmente indeseables de los tratamientos de descontaminación están asociados, entre otros aspectos, con cambios en el color y/o apariencia del producto, que deben ser evaluados, dado que se relacionan directamente con la aceptabilidad por parte del consumidor (Sofos *et al.*, 1998; Zapata *et al.* 2009).

2.2. Generalidades sobre las bacterias del ácido láctico (BAL)

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son un grupo de bacterias Gram (+) unidas por un conjunto de características fisiológicas, metabólicas y morfológicas.

La descripción general de las bacterias incluidas en el grupo es la de cocos o bacilos Gram (+), no móviles y no formadores de esporos, los cuales producen ácido láctico como el producto final principal o único de la fermentación de carbohidratos.

Son quimiorganotrofas y sólo crecen en medios de cultivos complejos. Se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes ecosistemas, y son comúnmente encontradas en alimentos, plantas y también en los tractos genital, respiratorio e intestinal del hombre y los animales. Los límites de este grupo han estado sujetos a muchas controversias, pero ha habido aceptación general acerca de que los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus* forman el núcleo del grupo.

Algunas de las revisiones taxonómicas más recientes de este grupo sugieren que las BAL comprenden a los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*.

La clasificación de las BAL en diferentes géneros ha estado tradicionalmente basada en la morfología, modo de fermentación de la glucosa, crecimiento a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico producido, habilidad de crecer a altas concentraciones salinas y tolerancia a los ácidos y álcalis. Para algunos de los últimos géneros descritos, se usaron en la clasificación características adicionales, como composición de ácidos grasos y movilidad (Bergey's Manual, 1984; Axelsson, 2002).

Las medidas de las verdaderas relaciones filogenéticas a través del secuenciamiento del rRNA han ayudado a la clasificación de las BAL y clarificaron la filogenia del grupo (Axelsson, 1993).

En reemplazo de los métodos bioquímicos tradicionalmente usados en la clasificación, por su complejidad y lentitud, se han desarrollado y se utilizan en la

actualidad métodos moleculares tales como pruebas de hibridación del rRNA, así como PCR en tiempo real, etc. (Ammor *et al.*, 2006; Aymerich *et al.*, 2006; Bernadeau *et al.*, 2008).

Las BAL gozan de gran importancia económica ya que, bien de forma natural o añadidas intencionalmente, desempeñan un papel importante en la fermentación de una gran variedad de productos lácteos, cárnicos y vegetales (Mani-López *et al.*, 2014). En ellos, las actividades metabólicas de este grupo no sólo contribuyen al desarrollo de características organolépticas y reológicas deseables, sino que además, permiten conservar o aumentar el valor nutritivo y la salubridad de la materia prima, previniendo el desarrollo de microorganismos contaminantes no deseables en tales productos (Martínez Magro *et al.*, 2000; Carr *et al.*, 2002).

Las BAL tienen habilidad para producir sustancias antimicrobianas, en las que se incluyen ácidos láctico y acético, diacetilo, dióxido de carbono y peróxido de hidrógeno, que juegan un papel fundamental en el aseguramiento de la calidad e inocuidad y en la extensión de la vida útil de los productos alimentarios (Daeschel, 1989; Piard and Desmazeaud, 1991; Ray and Daeschel, 1992; De Vuyst and Vandamme, 1994; Schillinger *et al.*, 1996; Signorini *et al.*, 2003; Adams and Nicolaidis, 2008; Gaggia *et al.*, 2010). También la reducción del pH por la fermentación de los carbohidratos presentes en los productos lácteos participa en el proceso de preservación de los mismos.

En años más recientes se ha demostrado la capacidad de las BAL para producir, además de los productos finales de fermentación antes mencionados,

otras sustancias inhibitorias del desarrollo microbiano: las bacteriocinas y sustancias tipo bacteriocinas (Tagg *et al.*, 1976; Klaenhammer, 1988; Schillinger, 1990; Piard and Desmazeud, 1992; Ray and Daeschel, 1992; De Vuyst and Vandamme, 1994; Malik *et al.*, 1994; Carr *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2010).

En las últimas dos décadas, el estudio de este aspecto tecnológico de las BAL se ha visto fuertemente incrementado como respuesta a la tendencia del mercado consumidor, que ha demostrado una preferencia cada vez más marcada por los alimentos “naturales”, es decir, “libres de aditivos químicos”, y por lo tanto, exentos de los compuestos químicos tradicionalmente utilizados en su preservación (Carr *et al.*, 2002). Como consecuencia de lo expuesto precedentemente, y por el incremento en la investigación científico-tecnológica acerca de estos aspectos, se han descrito cientos de bacteriocinas y sustancias tipo bacteriocinas producidas por cepas de BAL seleccionadas de diversos orígenes, tales como: alimentos fermentados, materias primas alimentarias, medio ambiente, starters artesanales y comerciales, intestinos de animales, etc. (Tagg *et al.*, 1976; Barefoot and Klaenhammer, 1984; Piard and Desmazeud, 1992; Ray and Daeschel, 1992; Vignolo *et al.*, 1993; De Vuyst and Vandamme, 1994; Tahara and Kanatani 1996; Revol-Junelles *et al.*, 1996; Manca de Nadra *et al.*, 1998; Yanagida, *et al.*, 2005; FAO/WHO, 2010; Bourdichon *et al.*, 2012)

Algunas BAL han demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento de una gran variedad de especies microbianas alterantes de alimentos y también, en ocasiones, de organismos patogénicos tales como: *Staphylococcus aureus*,

Listeria monocytogenes, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus cereus*, etc. (Jack *et al.*, 1995; Meghrous *et al.*, 1999; Belfiore *et al.* 2007).

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana (Jack *et al.*, 1995; Hernández Cruza, 2008). Estas sustancias fueron aisladas, en un primer momento, a partir de bacterias Gram (-). Las colicinas de *Escherichia coli* fueron una de las más estudiadas. Actualmente, algunas bacterias Gram (+), como las BAL, son de interés porque constituyen un reservorio de péptidos antimicrobianos con aplicación potencial en la biopreservación de los alimentos (Salminen *et al.*, 1998; Ennahar *et al.*, 1999; Cleveland *et al.*, 2001; González-Martínez *et al.*, 2003; Elegado *et al.*, 2004).

2.3. Efecto beneficioso de las bacterias lácticas en los alimentos

2.3.1. Extensión de la vida útil

Como se ha descrito, uno de los aspectos interesantes de las bacterias lácticas es su capacidad de prolongar la vida útil de ciertos alimentos, al inhibir el desarrollo de los microorganismos causantes de alteraciones. Desde los comienzos de las investigaciones en esta temática, autores como Elliker *et al.* (1964) informaron este fenómeno en queso Cottage. La inhibición estaba directamente relacionada con la concentración de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetilactis* en el producto final.

Posteriormente, Gilliland and Speck (1975) confirmaron y ampliaron estas observaciones, demostrando que en un medio a base de leche desnatada, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* inhibía rápidamente el desarrollo de

Pseudomonas fragi y de otras bacterias psicrotrofas Gram (-). Por su parte, Reddy *et al.* (1970, 1975) comprobaron un aumento en la vida útil de la carne vacuna picada, refrigerada a 7°C e inoculada con *Lactococcus lactis* y *Leuconostoc citrovorum*. En trabajos llevados a cabo por Roth and Clark (1975), se informaron observaciones de inhibición del crecimiento de *Brochothrix thermosphacta*, frecuente alterante de carnes envasadas al vacío, debida a cepas de BAL. Por su parte, Raccach *et al.* (1979) comprobaron que los cultivos iniciadores comerciales de *Pediococcus cerevisiae* y *Lactobacillus plantarum* incrementaban la vida útil de la carne de pollo, dado que retrasaban el desarrollo de *Pseudomonas* spp., principales bacterias alterantes de pollos frescos refrigerados.

En la actualidad, los estudios sobre las actividades antimicrobianas de las bacterias ácido lácticas continúan siendo de elevada importancia en las investigaciones llevadas a cabo en diferentes países (San Martín, 2010; Mohankumar and Murugalatha, 2011; Dimitrellou *et al.*, 2014).

2.3.2. Sustancias antimicrobianas producidas por BAL

2.3.2.1. Ácidos Orgánicos

Las BAL fermentan los carbohidratos por diferentes vías metabólicas y durante este proceso se obtienen ácidos orgánicos (principalmente láctico y acético), que no son utilizados por las células y, por lo tanto, son excretados al exterior. Los ácidos orgánicos contribuyen al desarrollo de sabor, aroma y textura de los alimentos y también a su estabilidad, mediante la reducción de microorganismos

alterantes, y contribuyen a asegurar la inocuidad por inhibición del crecimiento de patógenos (Gatti *et al.*, 2014).

El mecanismo de acción de los ácidos orgánicos se basa en la penetración del ácido no disociado a la célula y posterior disociación molecular del mismo en el citoplasma, lo cual da lugar a la aparición de protones y aniones. La célula tiende a sacarlos mediante bombeo de protones y así evitar la desnaturalización de las enzimas presentes en las estructuras celulares expuestas (pared celular, membrana y espacio periplásmico), lo cual puede ocasionar alteraciones en la permeabilidad de la membrana (Konings and Otto, 1983; ICMSF, 1980, 1996)

Cuando la concentración de protones excede la capacidad tampón del citoplasma, éstos se transportan hacia el exterior mediante bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Cuando estas reservas quedan agotadas, la bomba de protones se detiene y se produce el descenso del pH interno, que causa a su vez la desnaturalización de proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo así con la viabilidad (Piard and Desmazeaud, 1991).

Las bacterias lácticas pueden vivir y desarrollarse a un pH relativamente bajo. En ciertas circunstancias, utilizan un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y de protones al exterior celular, que además de contribuir a la homeostasis del pH interno, origina energía (Michels *et al.*, 1979; Tseng and Montville, 1993).

2.3.2.2. Peróxido de Hidrógeno

Algunas especies de BAL producen peróxido de hidrógeno como mecanismo de protección frente al oxígeno, mediante la acción de oxidasas o NADH peroxidasas (Condon, 1987). El H₂O₂ se acumula en el medio de crecimiento debido a que estos microorganismos son incapaces de producir catalasa. La acción bactericida del H₂O₂ se atribuye a su efecto altamente oxidante, mediante peroxidación de los lípidos de la membrana y destrucción de la estructura básica molecular de las proteínas celulares (Haugaard, 1968; Dahl *et al.*, 1989; Özer *et al.*, 2003; Sakai *et al.*, 2008).

2.3.2.3. Diacetilo

El diacetilo (2,3-butanodiona) es un compuesto producido por las BAL fermentadoras del citrato (Hugenholtz, 1993). Posee efecto antimicrobiano a elevadas concentraciones; en cambio, a bajas concentraciones puede ser metabolizado por algunos microorganismos. Su acción antimicrobiana es mayor frente a microorganismos Gram (-) y también frente a levaduras y mohos (Jay, 1982a, 1982b).

Aunque el diacetilo se considera sustancia GRAS, su utilidad como antimicrobiano es reducida debido a que se requieren cantidades demasiado elevadas para que ejerza un efecto inhibitorio. Se debe tener en cuenta, además, que genera un aroma muy intenso, que puede ocasionar serias alteraciones sensoriales en los alimentos. A pesar de su categorización de sustancia GRAS, en la bibliografía internacional se encuentran documentados casos de enfermedad

pulmonar obstructiva irreversible en trabajadores expuestos a dicho compuesto en la producción de 2,3-butanodiona (diacetilo) en la industria química, y en la de productos alimentarios que contienen diacetilo como saborizante (FAO/WHO, JECFA, 2011).

2.3.3. Otros compuestos antimicrobianos no proteicos sintetizados por BAL

2.3.3.1. Reuterina

Algunos estudios destacan la importancia para el control de los microorganismos de alteración de los alimentos de ciertas moléculas pequeñas, no proteicas, producidas por las BAL (Vásquez *et al.*, 2009b).

Dentro de estas sustancias se destaca la reuterina (β -hidroxipropionaldehído), que es un antibiótico de amplio espectro producido por *Lactobacillus reuteri*, por fermentación del glicerol. Este microorganismo es componente del tracto gastrointestinal, y se puede encontrar en los productos cárnicos. Algunas especies del género *Klebsiella* producen también reuterina como metabolito intermedio. Este compuesto es activo frente a diferentes géneros microbianos, tales como *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* y algunos protozoos como *Tripanosoma* (Axelsson *et al.*, 1989). Como todavía no se ha estudiado su potencial tóxico, y dada su naturaleza química, existen dudas razonables acerca de su posible utilidad en la industria alimentaria (Talarico and Dobrogosz, 1989; Martín *et al.*, 2009).

2.3.3.2. Ácido Fenilacético

Éste y su derivado, el ácido 4-hidroxifenilacético, son compuestos que poseen actividad antifúngica (Magnusson *et al.*, 2003). Además, existen muchos otros compuestos de bajo peso molecular ya caracterizados, que poseen este tipo de capacidad antimicrobiana (Niku-Paavola *et al.*, 1999).

2.3.3.3. Efectos combinados

En estudios comparativos sobre los efectos de diversas sustancias antimicrobianas producidas por BAL, se ha informado recientemente que las altas presiones en combinación con bacteriocinas o con el sistema lactoperoxidasa presentan efectos letales sinérgicos frente a *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* y *E. coli* O157:H7 en alimentos listos para el consumo. Asimismo, la lactoferrina y sus derivados, muestran una considerable actividad bactericida *in vitro* frente a distintos microorganismos patógenos y alterantes, pero esa actividad disminuye en alimentos. Por otra parte, se han aislado y seleccionado cepas de *L. reuteri* productoras de reuterina que sobreviven y sintetizan el antimicrobiano en queso y yogur (Anukam *et al.*, 2008).

Con el fin de obtener quesos probióticos con doble efecto protector alimentario-intestinal frente a patógenos alimentarios, se están investigando cepas productoras de bacteriocinas y reuterina con buenas propiedades tecnológicas y resistentes a las condiciones gastrointestinales (Medina y Picón, 2011).

2.3.4. Compuestos antimicrobianos proteicos sintetizados por BAL

De las sustancias antimicrobianas producidas por las BAL, las bacteriocinas son las más interesantes tecnológicamente. Es importante aclarar que las bacteriocinas no son las únicas sustancias peptídicas producidas por las bacterias lácticas. Ciertas cepas producen péptidos cíclicos con características antifúngicas (Magnusson and Schnurer, 2001; Sang and Blecha, 2008).

2.3.4.1. Bacteriocinas

Las bacteriocinas producidas por BAL comienzan a estudiarse en 1928, pero las investigaciones más interesantes sobre ellas comienzan en la década del '70, las cuales se han incrementado notablemente desde los '90 hasta hoy.

Las principales bacteriocinas caracterizadas, procedentes de BAL, son producidas por cepas pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Enterococcus* y *Pediococcus*. Estos compuestos son péptidos bioactivos, simples o complejos, sintetizados a nivel ribosomal y que ejercen su acción de modo extracelular, inhibiendo típicamente el crecimiento de bacterias próximas desde el punto de vista taxonómico. Sin embargo, estudios más recientes han demostrado la existencia de bacteriocinas que impiden la proliferación de otras bacterias Gram (+) no relacionadas estrechamente desde un punto de vista taxonómico con la cepa productora (Tagg *et al.*, 1976; Sobrino *et al.*, 1991; Okereke and Montville, 1991; Lauková *et al.*, 1993; Vignolo *et al.*, 1993; De Vuyst and Vandamme, 1994; Racach and Geshell, 1995; Susani *et al.*, 1995, Vanegas López *et al.*, 2011).

Las anteriormente denominadas “sustancias tipo bacteriocinas” (denominación ya prácticamente caída en desuso) se diferenciaron de las bacteriocinas por tener un espectro de acción antibacteriano mucho más amplio que éstas, que también alcanza a especies bacterianas Gram (-). Cierta literatura especializada considera que esta actividad antagónica puede ser la resultante del efecto combinado de varios inhibidores diferentes producidos por las BAL, tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, sustancias de tipo antibiótico y bacteriocinas. Sin embargo, en numerosos trabajos de investigación se informa que las bacteriocinas son activas por sí mismas frente a bacterias Gram (-) (Tagg *et al.*, 1976; Wiseman and Marth, 1981; Coallier-Ascah and Idziak, 1985; Piard and Desmazeud, 1992; Ray and Daeschel, 1992; Lauková *et al.*, 1993; Vignolo *et al.*, 1993; De Vuyst and Vandamme, 1994; Gálvez *et al.*, 2007; Vanegas López *et al.*, 2011; Medina y Picón, 2011; FAO/WHO, 2011).

La acción de las bacteriocinas ha sido comprobada no sólo por su uso como biopreservadores de alimentos, sino también como complemento de los antibióticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas, por ejemplo en el caso de la mastitis (Broadbent *et al.*, 1989), y además como agentes antivirales (Dridier *et al.*, 2006; Wachsman *et al.*, 1999; Sang and Blecha, 2008; Klostermann *et al.*, 2010).

La biosíntesis de bacteriocinas ocurre en la fase exponencial del desarrollo bacteriano o al final de la misma, y en la mayoría de los casos guarda relación con la biomasa producida (Piard and Desmazeud, 1992).

Las variaciones de las condiciones de cultivo, como por ejemplo temperatura, tiempo y pH, ejercen un profundo efecto en la producción de estos compuestos. Una mayor cantidad de bacteriocina es generalmente producida cuando la cepa que la genera es cultivada a su temperatura óptima de crecimiento y a pH constante (Tagg *et al.*, 1976).

Existe un mecanismo especial de defensa que protege a las cepas de la toxicidad de sus propias bacteriocinas. Este mecanismo depende principalmente de una proteína de inmunidad específica de cada una de ellas (Nes *et al.*, 1996). La inmunidad también podría estar mediada por la acción de proteasas intracelulares que inactivarían a la bacteriocina en la célula productora (Abee *et al.*, 1995; Jack *et al.*, 1995; Allison and Klaenhammer, 1996).

2.4. Clasificación, estructura y propiedades de las bacteriocinas.

2.4.1. Criterios para definir las y clasificación.

Estos compuestos deben cumplir con las siguientes propiedades:

- En su estructura deben tener un componente proteico o peptídico activo biológicamente.
- Tener un espectro inhibitorio reducido sobre bacterias relacionadas taxonómicamente con la cepa productora.
- Poseer capacidad bactericida frente a cepas sensibles.

Si bien los puntos previamente citados, establecidos para la definición dada por Tagg *et al.* (1976), son válidos para muchas de las bacteriocinas estudiadas, los

resultados obtenidos en la caracterización de estos compuestos han mostrado una gran heterogeneidad en cuanto a propiedades bioquímicas, peso molecular, espectro de actividad, mecanismo de acción, sistemas de producción y secreción, así como la organización genética de los operones que codifican estas funciones.

Las bacteriocinas han sido sometidas a diversas clasificaciones atendiendo a su estructura, tamaño molecular, presencia de aminoácidos modificados, modo de acción, estabilidad térmica, etc. Actualmente se aceptan cuatro clases bien definidas (García, *et al.*, 2010; Herrero Sánchez, 2013):

Clase I – Lantibióticos: Se denominan lantibióticos debido a que contienen aminoácidos modificados como lantionina y/o β -metil-lantionina. Son de pequeño tamaño molecular (< 5 kDa) y estables al calor. El ejemplo más conocido es la Nisina, y en este grupo también se incluyen la Lacticina 481 y la Plantaricina C.

Clase II - No lantibióticos: Bacteriocinas lineales y no modificadas post-traduccionalmente. Son péptidos pequeños (< 10 kDa) y termoestables, que actúan a nivel de la membrana plasmática. El representante más característico de este grupo es la Pediocina PA-1.

Clase III: Comprende grandes proteínas lábiles al calor y con pocas perspectivas como bioconservantes de alimentos, con excepción de la Colicina. Dentro de este grupo también se encuentra la Enterolisina A.

Clase IV: Péptidos circulares que se caracterizan por un enlace peptídico entre el C- y el N-terminal. Ejemplos de este grupo son la bacteriocina AS-48, la Gasericina A y la Acidocina B.

2.4.2. Espectro de inhibición de las bacteriocinas

La mayoría de las bacteriocinas de Clase I poseen un espectro antimicrobiano muy amplio. No sólo inhiben a bacterias relacionadas taxonómicamente, tales como especies de los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, sino que también inhiben a bacterias Gram (+) mucho menos relacionadas desde ese punto de vista, como lo son: *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus* y *Clostridium botulinum*.

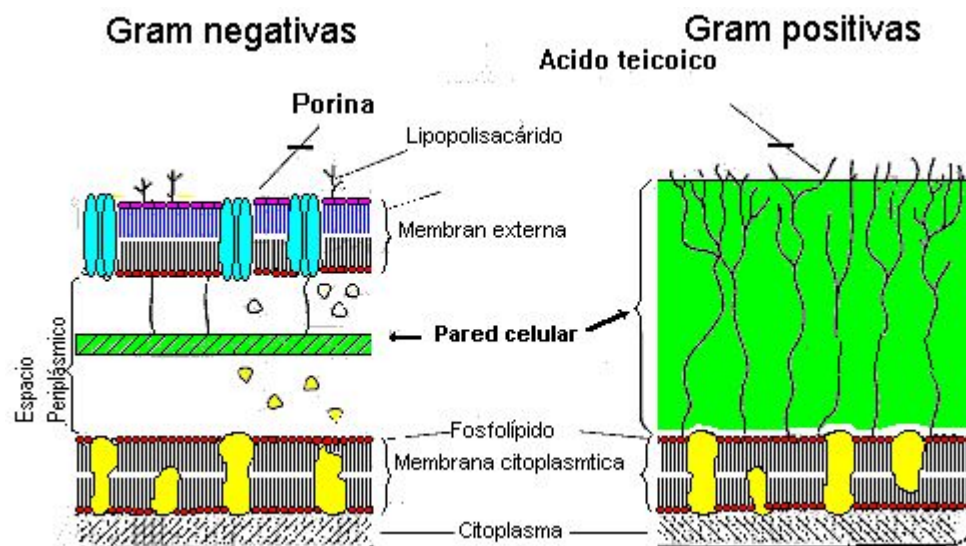
Es así que la Nisina, bacteriocina producida por algunas cepas de *L. lactis* subsp. *lactis*, presenta un amplio espectro de inhibición frente a una numerosa cantidad de microorganismos Gram (+), que incluye a estreptococos, lactococos, lactobacilos, leuconostoc, pediococos, estafilococos, micrococos y listerias (Carminati *et al.*, 1989; Spelhaug and Harlander, 1989), e impide la germinación de esporas de *Clostridium* y *Bacillus*, acción que también puede ser efectuada por la Termofilina 13 (Marciset *et al.*, 1997; Fernández *et al.*, 2004; Maldonado y Llancas, 2007). La Nisina es la bacteriocina de BAL mejor caracterizada y, hasta el momento, es la única que se comercializa como aditivo alimentario (Parente and Ricciardi, 1999).

La mayoría de las bacteriocinas de Clase II tienen un espectro de actividad más reducido que las de Clase I, y sólo inhiben a bacterias Gram (+) relacionadas filogenéticamente.

La susceptibilidad de las bacterias Gram (-) a las bacteriocinas producidas por las BAL es limitada. De acuerdo con Klaenhammer (1988), se requiere una purificación de la misma para lograr una actividad significativa frente a las

Gram (-). Se ha informado que la Nisina y la Pediocina PA-1 presentan actividad inhibitoria frente a *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia* y *Aeromonas*, pero el efecto no se observa a menos que se altere el componente lipopolisacárido de la membrana externa de estos microorganismos (**Fig.1**) (Stevens *et al.*, 1991; Bhunia *et al.*, 1991; Naidu *et al.*, 2006).

Fig.1. Membranas citoplasmática de bacterias Gram (+) y Gram (-).



La acción combinada de dos o más bacteriocinas puede reforzar considerablemente su acción inhibitoria.

2.4.3. Propiedades bioquímicas: Tolerancia de las bacteriocinas al calor, acidez y enzimas.

Las bacteriocinas de bacterias lácticas presentan una serie de propiedades bioquímicas comunes, como son la sensibilidad a la acción de enzimas proteolíticas, la tolerancia a elevadas temperaturas y a bajos valores de pH. Sin embargo, la mayoría de las bacteriocinas son activas en un amplio rango de pH, generalmente entre 3.0 y 9.0.

La termotolerancia de las bacteriocinas de BAL es generalmente elevada, aunque la misma puede depender del grado de purificación, de la presencia de sustancias termoprotectoras en el medio y del pH. Así, la termoestabilidad disminuye significativamente cuando los tratamientos térmicos son realizados con fracciones purificadas parcialmente u homogeneizadas; tal es el caso de la Lactacina B (Barefoot and Klaenhammer, 1984) y la Sakacina P (Tichaczek *et al.*, 1992). La Nisina purificada, sin embargo, se caracteriza por su elevada termoestabilidad a pH 2.0, y también por permanecer activa tras ser sometida a 100 °C durante 10 minutos (Hurst, 1981; Grande Burgos *et al.*, 2011).

La termorresistencia generalizada de las bacteriocinas permite que permanezcan activas después de tratamientos térmicos equivalentes a la pasteurización de la leche (63 °C 30 min; 72 °C 15 s), lo que supone una ventaja adicional para su utilización en productos pasteurizados (Piard and Desmazeaud, 1992; Oh *et al.*, 2000; Tulini *et al.*, 2011).

Debido a su naturaleza proteica, todas las bacteriocinas se inactivan por una o más enzimas proteolíticas, incluyendo aquellas de origen pancreático

(tripsina y α -quimotripsina), y algunas de origen gástrico, como la pepsina. Esta característica es bastante interesante con respecto a la utilización de bacteriocinas en productos alimentarios, puesto que serían inactivadas durante su paso por el tracto gastrointestinal, sin ser absorbidas como compuestos activos y sin causar efectos similares a los relacionados con el uso de antibióticos (Lloyd and Drake, 1975; Herrero Sánchez, 2013).

Actualmente se acepta que la pronasa E y la proteinasa K, proteasas de amplio espectro, inhiben parcial o totalmente la actividad antimicrobiana de cualquier bacteriocina. Por ello es que durante los ensayos de screening para caracterización preliminar de posibles bacteriocinas, es esencial la utilización de las enzimas mencionadas, para confirmar el origen proteico del inhibidor (Ray and Daeschel, 1992; Oh *et al.*, 2000; Pringsulaka *et al.*, 2012).

2.4.4. Modo de acción

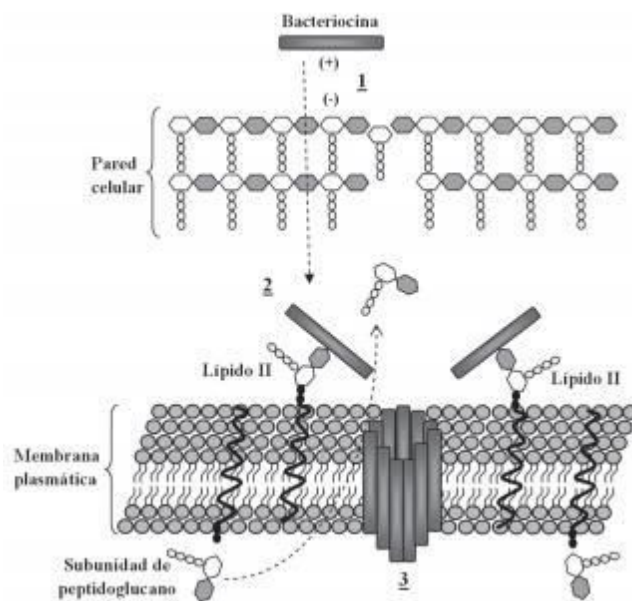
El modo de acción de las bacteriocinas está determinado por la composición de la membrana citoplasmática, la estructura y la expresión de una proteína en función de la inmunidad, además de la composición química del medio ambiente (Monroy Dosta *et al.*, 2009).

En general, la acción antimicrobiana de las bacteriocinas se debe a la desestabilización funcional de la membrana citoplasmática de las células sensibles. Las bacteriocinas actúan sobre las membranas a través de un proceso que consta de tres etapas básicas:

- ❖ Unión a la membrana
- ❖ Inserción en la membrana
- ❖ Formación de poros

Este fenómeno conduce, en última instancia, a la muerte celular (**Fig. 2**).

Fig. 2. Modo de acción de las bacteriocinas



Se trata de un mecanismo compartido por la mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL (Abee *et al.*, 1995; Hildeng-Hauge *et al.*, 1998; Moll *et al.*, 1999; Grande Burgos *et al.*, 2011).

Otro aspecto importante es la inhibición de la biosíntesis del ADN, lo que conlleva a la muerte celular, como un mecanismo secundario de estos péptidos antimicrobianos (Brötz and Sahl, 2000).

Recientemente se ha demostrado que varios tipos de bacteriocinas de la Clase II utilizan un componente asociado a la membrana del sistema manosa-fosfotransferasa como receptor específico en las células diana (García *et al.*, 2010; Herrero Sánchez, 2013)

El efecto que ejercen las bacteriocinas sobre los microorganismos patógenos se manifiesta de distintas formas, es decir, algunos microorganismos pueden ser sensibles mientras que otros podrían ser resistentes a la acción de estos compuestos, inclusive una cepa que parece ser sensible puede tener células que presenten resistencia a la acción de la bacteriocina. Es más, un microorganismo puede ser sensible a una bacteriocina y resistente a otra; las bacterias productoras de un dado compuesto antimicrobiano pueden ser sensibles a la acción de otra bacteriocina (Monroy Dosta *et al.*, 2009).

2.5.- Aplicación de las bacteriocinas en la industria alimentaria

Como ya se explicitó previamente, las bacteriocinas producidas por BAL gozan del *status* de sustancias GRAS (Generally Recognized as Safe), y debido a su naturaleza peptídica son degradadas e inactivadas enzimáticamente en el tracto digestivo, por lo que no originan trastornos intestinales ni de tipo alérgico. Además, la mayor parte de las bacteriocinas de interés industrial tienen un amplio espectro antimicrobiano y actúan sinérgicamente con otros sistemas de conservación.

Debido a las características señaladas se observan atentamente estos compuestos desde un punto de vista práctico. Frecuentemente se ha observado

que la aplicación de bacteriocinas en sistemas alimentarios provoca reducciones típicas de entre 1 - 4 log en las poblaciones de los microorganismos sensibles (Muriana, 1996; Stiles, 1996). Igualmente, en otras publicaciones se ha verificado una reducción del recuento microbiano, particularmente de *Listeria monocytogenes*, en superficies de acero inoxidable en contacto con alimentos, hecho que representa una reducción del riesgo de contaminación cruzada entre utensilios y productos alimenticios (Silva Rivas, 2004).

Si bien los niveles de inhibición alcanzados mediante la aplicación de estos compuestos pueden considerarse inaceptables como método de conservación único o primario, resultarían muy útiles como factores adicionales en un sistema de barreras para lograr la inocuidad (Leistner, 1992; Ennahar *et al.*, 1999; Carrasco *et al.*, 2002; Belfiore *et al.*, 2007).

La acción sinérgica de las bacteriocinas con otras barreras (temperatura, atmósferas modificadas, NaCl, nitratos, etc.) contribuiría a la obtención de alimentos de calidad higiénica óptima, también con la reducción de la concentración de algún aditivo químico, así como a disminuir la intensidad del tratamiento tecnológico a aplicar.

Éstas podrían aplicarse en la preservación de alimentos según las siguientes alternativas: a) por inoculación de los alimentos con la/s cepa/s de BAL que produzcan la bacteriocina en el producto mismo (producción *in situ*); b) por adición de la bacteriocina purificada o semipurificada; y c) mediante la utilización de un medio de cultivo fermentado con cepas productoras de bacteriocinas, como

“ingrediente” (y no como “aditivo”) agregado en el proceso de elaboración del alimento.

Sería de suma utilidad en el control de la calidad e inocuidad de los productos alimentarios el uso de compuestos naturales que colaboren en la reducción de la microbiota presente en los alimentos, tanto la constituida por los microorganismos alterantes como la integrada por los patógenos. Por lo tanto, su estudio conduce a la aplicación de los nuevos conocimientos en futuras evaluaciones de riesgos microbiológicos y éstos darán lugar, a su vez, a la creación de las capacidades necesarias para conducir líneas de investigación que ayuden a visualizar la conexión de los problemas de contaminación con patógenos de los alimentos con la salud humana.

Estas evaluaciones de riesgo son un recurso que puede ser utilizado por varios organismos, a nivel nacional e internacional, entre los que se incluye el Codex Alimentarius, ya que ofrecen respaldo científico e información necesaria para establecer políticas de regulación de alimentos dirigidas al control de enfermedades transmitidas por ellos.

3. OBJETIVOS

Para el estudio del tema se plantearon los siguientes objetivos:

3.1. Objetivo General:

Determinación de la actividad antimicrobiana de cepas de BAL, provenientes de aislamientos del intestino de pollos y también de la colección del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la FIQ-UNL, frente a cultivos de cepas de *Salmonella* spp. participantes de la microbiota típica de los pollos, y también de colección.

Para dar cumplimiento a este objetivo general se plantearon los siguientes

3.2. Objetivos Parciales:

- a) Caracterización taxonómica de las cepas de BAL aisladas del intestino de pollos, mediante la determinación de sus características fisiológicas y bioquímicas, realizada con la metodología clásica y también con kits comerciales y softwares especiales.
- b) Caracterización taxonómica, a nivel de serotipo, de las cepas de *Salmonella* aisladas de piel de cuello de pollo fresco recién faenado, de carne separada mecánicamente y de alimentos balanceados para aves.
- c) Obtención de los SLC de las cepas seleccionadas de BAL (en base a un screening preliminar de su actividad inhibitoria) y determinación de su actividad antimicrobiana frente a microorganismos alterantes de pollo (como por ej. *S. aureus*, *B. cereus*, *Pseudomonas* spp., *E. coli*, etc.) y frente a cepas patógenas de *Salmonella* spp.

- d) Caracterización preliminar de los SLC con actividad antibacteriana, mediante ensayos de temperatura (T), pH y enzimáticos, que determinarán la presencia en ellos de péptidos bioactivos (bacteriocinas) responsables de su capacidad antimicrobiana.
- e) Evaluación de la actividad inhibitoria, mediante la determinación de la cinética de crecimiento y de muerte, de los SLC más activos frente a cepas de *Salmonella*.
- f) Determinación del efecto sinérgico de la temperatura de almacenamiento bajo refrigeración y la incorporación de los SLC sobre la cinética de crecimiento y muerte de las cepas de *Salmonella*.
- g) Evaluación sensorial de los efectos causados por la aplicación sobre porciones de pollo de los SLC seleccionados como biopreservadores. Esta actividad implica la preparación de un panel de evaluadores sensoriales para la determinación del grado de aceptación del uso de los SLC en la conservación de productos de pollo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Aislamiento de los microorganismos empleados

4.1.1. Aislamiento de BAL a partir de intestinos de pollos

Se aislaron cepas silvestres de BAL de intestinos completos de pollo, provenientes de aves saludables criadas a campo, libres de tratamientos con promotores de crecimiento que podrían inducir alteraciones en su flora intestinal.

Mediante un bisturí estéril se cortaron porciones de intestino y se abrieron para efectuar la limpieza del material fecal de su interior, de manera que quedasen las paredes intestinales libres de los fluidos.

Cada muestra consistió en 10 g de intestino, que fueron colocados en una bolsa estéril que contenía 90 ml de agua de peptona al 0.1% (p/v), tamponada (BPW, Britania). Estas muestras se sometieron a procesamiento en Stomacher Lab-Blender 400 durante 60 segundos. A partir de estas muestras homogeneizadas se efectuaron diluciones sucesivas en agua de peptona y las mismas se sembraron en profundidad en cuatro medios de cultivo diferentes, recomendados para el aislamiento de distintos tipos de BAL: MRS Agar (Merck), KF Agar (Biokar), M17 Agar (Biokar) y Medio Rogosa Agar (Biokar). Las placas de Petri sembradas se incubaron a 37°C durante 24 h, en ambiente aeróbico y anaeróbico (en este último caso se utilizaron jarras y reactivos para anaerobiosis marca Oxoid).

Se seleccionaron 183 aislamientos que presentaban las características macroscópicas típicas correspondientes a colonias de BAL.

Los aislamientos seleccionados se sembraron en Caldo MRS (Merck) y se incubaron a 37°C durante 24 h. Se determinó la evolución de los cultivos mediante la observación a ojo desnudo de la aparición y desarrollo de turbidez.

Inmediatamente los cultivos se sometieron a ensayos bioquímicos/fisiológicos básicos para establecer una diferenciación primaria entre las posibles cepas de BAL y las pertenecientes a otros géneros bacterianos, tales como: características microscópicas (microscopía de contraste de fases), morfología y coloración de Gram (microscopía de campo claro), crecimiento en presencia de O₂ y prueba de catalasa.

De la etapa anterior se seleccionaron 62 aislamientos, con cada uno de los cuales se llevó a cabo el ensayo de la doble capa de agar a fin de determinar la actividad inhibitoria del crecimiento de las cepas elegidas como blanco o sensibles. De las 62 cepas precedentes se escogieron las que presentaron halos de inhibición.

A partir de las cepas que presentaron las mejores características compatibles con cepas de BAL y también los mejores halos de inhibición contra los microorganismos sensibles evaluados, se seleccionaron 10 para continuar con ellas los ensayos experimentales

4.1.2. Aislamiento de cepas de Salmonella provenientes de diferentes muestras de pollo y del alimento aviar

Numerosos pollos, criados en forma convencional, fueron sacrificados de acuerdo a las reglas del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) de Argentina. Las canales se retiraron inmediatamente después del enfriamiento en la línea de procesamiento y se llevaron al laboratorio bajo refrigeración. Se tomaron muestras para la detección de la presencia de *Salmonella*, que se analizaron según el método oficial de USDA FSIS, 2008.

Los alimentos balanceados para aves también fueron incluidos dentro de los estudios para la detección de cepas de *Salmonella*, siguiendo el mismo método de USDA-FSIS.

A 25 gramos de muestra (para el caso de piel de pollo, recogida del cuello del ave; para alimentos balanceados, se tomaron del polvo de los mismos; y para la carne de pollo separada mecánicamente, las muestras estuvieron constituidas por trozos de carne) se les agregaron 225 ml de agua de peptona tamponada (BPW, Britania), se homogeneizaron e incubaron a 37°C durante 24 h. Cumplido este tiempo, se tomó 1 ml de cada una de las muestras pre-enriquecidas y se lo colocó en 10 ml de caldo Muller-Kauffmann tetracionato (MKTT, Merck). Además se tomó 0,1 ml de cada muestra de pre-enriquecimiento y se los agregó a 10 ml de Caldo de Peptona de Soja Rappaport Vassiliadis (RVS, Biokar). Ambos medios, inoculados con las diferentes muestras, se incubaron a 42°C durante 24 h. Estos cultivos de enriquecimiento selectivo se sembraron en placas de Xilosa Lisina Tergitol TM 4 Agar (XLT4, Merck) y en Verde Brillante Sulfa Agar (BGS, Merck), y se incubaron a 35°C durante 24 h. De cada placa de agar selectivo se tomaron siete colonias sospechosas, que se inocularon en Hierro Triple Azúcar Agar (TSI, Merck), en Hierro Lisina Agar (LIA, Merck) y en Caldo Urea (Merck) y se incubaron a 35°C durante 24 h. A todas las colonias que presentaron características típicas de *Salmonella* se las sometió *a posteriori* a los ensayos correspondientes a su caracterización bioquímica/serológica.

4.2. Identificación de los microorganismos aislados

4.2.1. Identificación de las cepas de *Salmonella*

Las cepas confirmadas como *Salmonella* mediante antisueros poli-valentes OMA y OMB (Bio-Rad) fueron enviadas al Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, A.N.L.I.S, "Dr. Carlos Malbrán", para la determinación del serotipo de cada una de ellas. Los resultados de esta investigación fueron provistos por la Dra. M. I. Caffer, del Departamento de Enterobacterias de dicha Institución (como puede observarse en la **Tabla 3** de la sección Resultados y Discusión).

4.2.2. Identificación de las cepas de BAL

A las 10 cepas de BAL seleccionadas según la metodología descrita previamente se les completó su caracterización taxonómica mediante pruebas fisiológicas y bioquímicas realizadas por métodos clásicos y también con el kit comercial API 50 CH de BioMèrieux (Francia) y con el Medio de cultivo para API 50 CHL y su software complementario. Las cepas ya caracterizadas se utilizaron en la producción de Sobrenadantes Libres de Células (SLC) y se emplearon en las investigaciones sucesivas.

4.3. Cepas utilizadas

4.3.1. Cepas de BAL

Mediante el kit comercial utilizado en la identificación de las cepas de BAL, se obtuvo la información siguiente: 1 cepa se identificó como *Lactobacillus brevis* (C), 2 como *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* (R y B) y 7 como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (X, Q, A, V, M, Z y W) [datos que pueden

observarse en **Tabla 2**, en la sección Resultados y Discusión]. Todas estas cepas se utilizaron posteriormente para la obtención de los SLC correspondientes y para realizar los ensayos de actividad antimicrobiana.

4.3.2. Cepas Blanco

Se utilizaron como blanco las siguientes cepas pertenecientes a la colección propia de la Cátedra de Microbiología y Biotecnología de la FIQ-UNL: *Bacillus cereus* (Bc), *Staphylococcus aureus* (Sa), *Escherichia coli* (Ec), *Pseudomonas* sp. (Ps) y *Salmonella* sp.

Las cepas de *Salmonella*, aisladas (de pollo y alimento aviar) debidamente identificadas en el Instituto Malbrán, también fueron utilizadas como blanco en esta investigación. Ellas fueron clasificadas taxonómicamente como: *S. Montevideo* (S₁), *S. Glostrup* (S₂), *S. Newport* (S₃), *S. Montevideo* (S₅), *S. Anatum* (S₁₀), *S. Newport* (S₁₂), *S. Bredeney* (S₁₃) y *S. Agona* (S₆). Se empleó, además, una cepa de *Salmonella* Hadar perteneciente a la colección del Laboratorio de Microbiología del ITA-FIQ-UNL.

4.4. Conservación de las cepas

4.4.1. *Salmonella* y otras cepas blanco

Las cepas de *Salmonella* y las restantes utilizadas como blancos se propagaron en Caldo Nutritivo (CN, Merck) a 37°C, durante 18 h. Se centrifugaron 5 ml de cada uno de estos cultivos durante 15 minutos a 3000 rpm y se descartó el sobrenadante en condiciones de esterilidad. Las células fueron suspendidas en 5 ml de agua estéril y las suspensiones fueron

centrifugadas por 15 minutos a 3000 rpm, descartando nuevamente el sobrenadante en condiciones de esterilidad. Este proceso fue repetido dos veces más. Por otro lado, se preparó CN con el agregado de 15 % (v/v) de glicerol estéril, y las células recuperadas del último lavado se suspendieron en 5 ml de este medio. Esta suspensión se distribuyó en crioviales estériles de 2,5 ml de capacidad y se los conservó a -80 °C (Heckly, 1978).

Todas las cepas se activaron, antes de cada ensayo, en Caldo Triptona Soja (TSB, Merck), incubándolas a 35 °C durante 24 h.

4.4.2. Bacterias Ácido Lácticas

Las cepas de BAL se propagaron durante una noche en tubos de ensayo con 10 ml de Caldo MRS (Merck). Estos cultivos se centrifugaron durante 15 min a 3.000 rpm, descartando el sobrenadante en condiciones de esterilidad. Se adicionó al sedimento el mismo volumen (10 ml) de solución fisiológica (0,86% p/v de NaCl) estéril y se repitieron dos veces las operaciones mencionadas. Finalmente se suspendieron las células en 2 ml de solución protectora [Caldo MRS adicionado de glicerol estéril al 15% (v/v)]. Estas suspensiones se colocaron en crioviales que se conservaron a -80 °C y a -20 °C.

Las cepas de BAL mantenidas en congelamiento a -80 °C fueron activadas mediante tres procedimientos sucesivos de cultivo en caldo MRS (Merck), a 37 °C durante 24 h.

4.5. Determinación de la capacidad inhibitoria de las cepas de BAL contra las cepas blanco o sensibles

4.5.1. Screening preliminar mediante el ensayo de la doble capa de agar

Se determinó la inhibición de diferentes cepas blanco por parte de cada uno de los 62 aislados de BAL seleccionados previamente, mediante el ensayo de la doble capa de agar. Para llevar a cabo este ensayo se inocularon por toque en placas de Petri conteniendo 15 ml de Agar MRS (Merck) y utilizando ansa de aguja, 6 a 8 de los aislados de BAL en estudio. Las placas se incubaron a 37 °C por 12 h. Una vez que las colonias de bacterias lácticas estuvieron ya desarrolladas en dicho medio, se colocó encima del mismo una capa de Agar Nutritivo semisólido (Merck) [CN con el agregado de agar (0,85% p/v)], previamente inoculado con una cepa bacteriana blanco o sensible (0,5 ml de un cultivo de la cepa blanco con una concentración celular de log 6 ufc/ml). Se incubó a 37 °C durante 24 h y se observó la formación de halos transparentes (ausencia de crecimiento) generados en el césped de la bacteria blanco por los aislamientos de BAL que fueron capaces de inhibirla.

Como fue mencionado anteriormente, las cepas empleadas como blanco en este ensayo fueron las siguientes: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella* sp, todas pertenecientes a la colección propia de la Cátedra de Microbiología y Biotecnología de la FIQ-UNL.

Cada ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como un promedio de los resultados individuales obtenidos.

4.5.2. Ensayo de Difusión en Agar

4.5.2.1. Obtención de los sobrenadantes libres de células (SLC)

Para la obtención de los SLC se seleccionaron los 10 aislamientos de BAL que produjeron los mayores halos de inhibición frente a distintos microorganismos sensibles (elegidos de los 26 que generaron halos cuando fueron sometidos a screening). Éstos fueron denominados mediante letras, como se detalla a continuación: A, B, C, M, Q, R, X, V, W, Z.

A 5 ml de Caldo MRS (Merck) se le inoculó 0,1 ml de cultivo de cada aislamiento seleccionado y se incubó a 37°C durante 24 h. Al cabo de este período, una alícuota de 1 ml se sembró en 10 ml del mismo medio de cultivo y se incubó bajo idénticas condiciones. El cultivo final se obtuvo con la siembra de 6 ml del último precultivo en 200 ml de Caldo MRS (Merck), y fue incubado bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura.

Las concentraciones celulares logradas mediante este proceso presentaron valores de aproximadamente log 9 ufc/ml. Los sobrenadantes libres de células de cada aislamiento de BAL a ensayar se obtuvieron centrifugando cada cultivo final a 6000 rpm por 20 min, a una temperatura de 5°C.

Posteriormente, los SLC se concentraron 10 veces por evaporación bajo vacío a 70°C, en un evaporador rotatorio BUCHI RE 111, utilizando una bomba de vacío "Buchi" Mod. Vac V-500. Los concentrados se esterilizaron a través de un sistema de membranas (Millipore) con filtros Ministart de 0,2 µm de diámetro de poro (Simonetta *et al.*, 1997; Moragues *et al.*, 2003). Todos los SLC obtenidos se colocaron en frascos de vidrio estériles con tapa a rosca y se conservaron a -20°C hasta su utilización.

4.5.2.2. Determinación de la actividad antibacteriana de los sobrenadantes libres de células (SLC) obtenidos de cultivos de las cepas de BAL seleccionadas.

Con la finalidad de investigar la actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de los SLC obtenidos de las 10 cepas de BAL seleccionadas, se aplicó el método de difusión en agar y se utilizaron como cepas blanco las siguientes: dos cepas de bacterias Gram (+): *B. cereus* y *S. aureus*, y dos cepas de bacterias Gram (-): *E. coli* y *Pseudomonas* sp., todas ellas pertenecientes a la colección de la Cátedra de Microbiología y Biotecnología de la FIQ-UNL. También se utilizaron como blanco 13 cepas de *Salmonella* seleccionadas del total de las aisladas de pollos de la región Santa Fe, que fueron caracterizadas serológicamente como se indicó anteriormente, y una cepa de *S. Hadar*, de la colección del Laboratorio de Microbiología del ITA-FIQ.

Los ensayos se llevaron a cabo mediante el agregado de 60 µl del SLC de cada una de las BAL en estudio, a orificios de 5 mm de diámetro practicados en placas de Agar Nutritivo (Merck) e inoculadas con una cepa blanco. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h, para observar luego la presencia de halos transparentes indicadores de inhibición del crecimiento de la cepa blanco.

Cada ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como un promedio de los resultados individuales obtenidos.

4.6. Caracterización primaria de los SLC de bacterias ácido lácticas

4.6.1. Ensayos Enzimáticos

Se determinó la sensibilidad de cada SLC en estudio frente a la acción de las siguientes enzimas: catalasa, pepsina, tripsina, Proteinasa K y Pronasa E (todas provistas por Sigma). Las soluciones enzimáticas se prepararon en buffer fosfato de potasio ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,5), a fin de lograr el pH óptimo de acción. La fuerza iónica del mismo varió dependiendo de la enzima: con catalasa, pepsina y tripsina se usó una concentración salina de 0,2 M; con Pronasa E y Proteinasa K se usó una concentración 0,01 M.

La técnica aplicada fue la siguiente: en un tubo de ensayo estéril se colocaron 0,5 ml de SLC concentrado y 0,5 ml de la solución de enzima esterilizada por filtración, con lo cual se logró una concentración de 0.5 mg/ml de la enzima en el medio de reacción. La mezcla reaccionante se incubó en estufa durante 4 h a 37°C. Posteriormente se evaluó la actividad inhibitoria remanente por el método de difusión en agar (Strasser de Saad *et al.*, 1993; Vignolo *et al.*, 1993).

Las cepas sensibles que se usaron fueron: *Pseudomonas* sp., *B. cereus*, *S. Hadar* y las cepas de *Salmonella* S_6 y S_{12} , aisladas y caracterizadas en el presente estudio.

Cada ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como un promedio de los resultados individuales obtenidos.

4.6.2. Determinación de algunos parámetros fisicoquímicos

4.6.2.1. Tratamientos térmicos

Los SLC concentrados se calentaron en baño de María a 100°C durante 10 y 30 minutos, ensayándose luego la actividad inhibitoria por el método de difusión en agar (Simonetta *et al.*, 1997).

Las cepas sensibles que se utilizaron fueron: *Pseudomonas* sp., *B. cereus*, *S*₂, *S*₄, *S*₆, *S*₈, *S*₁₀, *S*₁₂ y *S*₁₃.

Cada ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como un promedio de los resultados individuales obtenidos.

4.6.2.2. Sensibilidad frente al pH

Se ajustó el pH de cada SLC concentrado estéril a distintos valores, que estuvieron en el rango comprendido entre 4,50 y 8,00 (4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 y 8,0). Se usó como testigo el medio de cultivo (Caldo MRS, Merck) no inoculado, concentrado 10 veces, esterilizado y llevado a los mismos valores de pH, para diferenciar si la inhibición era debida a la acidez láctica o a otros componentes del SLC en estudio. Para disminuir el pH se utilizó HCl 1N, y para aumentarlo se trabajó con una solución de NaOH 1N.

Posteriormente se evaluó la actividad inhibitoria por el método de difusión en agar (Schillinger and Lucke, 1989; Park *et al.*, 2003).

Los microorganismos sensibles que se usaron en esta prueba fueron: *Pseudomonas* sp. , *B. cereus*, *S. Hadar* y las cepas de *Salmonella* identificados como *S*₆ y *S*₁₂.

Cada ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como un promedio de los resultados individuales obtenidos.

4.7. Determinación del modo de acción y de la capacidad lítica

4.7.1. A temperatura óptima de crecimiento (37°C)

Para confirmar la actividad antagonista de los SLC y al mismo tiempo determinar su modo de acción (bactericida o bacteriostático) y su capacidad lítica, se analizó el efecto de los mismos sobre la evolución de la población, o cinética de crecimiento, de cepas sensibles.

A 18 ml de cultivos en Caldo Nutritivo (Merck) de los aislados de *Salmonella S₆* y *S₁₂*, en fase logarítmica de desarrollo, se les agregaron 2 ml de SLC y se continuó su incubación a 37°C durante 24 h. A intervalos apropiados de tiempo (0, 3, 6, 9, 12 y 24 h, considerando como tiempo 0 el del agregado del SLC), se tomaron muestras de estos cultivos y se determinó el número de células viables en Agar Nutritivo (Merck) (Schillinger and Lucke, 1989).

Como control se realizó una experiencia testigo con cada microorganismo utilizado, sin el agregado del SLC. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como promedio de los valores individuales obtenidos.

4.7.2. A temperatura de refrigeración (6,5°C)

Las cepas sensibles se sembraron en caldo Nutritivo (Merck) a 37°C durante 24 h. Luego se hicieron diluciones de este cultivo para tener una concentración celular de log 4 ufc/ml. Con esta concentración se sembraron tubos de ensayo conteniendo 18 ml de CN (Merck) estéril más 2 ml de SLC de cada cepa de BAL en estudio.

Las cepas blanco utilizadas fueron las correspondientes a los aislados de *Salmonella* S_6 y S_{12} . Como control se realizó una experiencia testigo con cada microorganismo utilizado, sin el agregado del SLC.

Todos estos tubos, los adicionados con los SLC y los controles, se incubaron en refrigeración a $6,5 \pm 0,3^\circ\text{C}$ durante 24 días. En intervalos apropiados de tiempo (1, 7, 15 y 24 días) se tomaron muestras de estos cultivos y se determinó el número de células viables en Agar Nutritivo (Merck) (Jiménez *et al.*, en prensa, 2015).

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como promedio de los valores individuales obtenidos.

4.8. Evaluación sensorial. Diseño experimental

4.8.1. Muestras

Después del procesamiento en planta, se retiraron porciones de canales de pollo inmediatamente después del despiece y antes de su disposición o envasado final previo a la comercialización. Para disminuir el efecto de la variabilidad natural entre las canales, se dividieron los filetes de pechugas sin piel (supremas) al medio; una se roció con agua destilada estéril y la otra con el sobrenadante problema de manera de tener la muestra control en cada par analizado. Cada mitad fue colocada en su respectiva bandeja plástica con tapa en bisagra y se refrigeraron a 4°C hasta el momento de efectuar la evaluación del panel.

Una vez realizada la primera evaluación de los panelistas las muestras se refrigeraron a 4°C para efectuar nuevamente su control a los 4 días de

conservación. Al cabo de este período la evaluación se realizó por un ordenamiento por intensidad del atributo percibido, asignando un puntaje según una escala de 5 puntos.

El tiempo de almacenamiento de 4 días bajo condiciones de refrigeración se estableció sobre la base de que se pretendía evaluar la aparición o no de alteraciones sensoriales sólo debidas al tratamiento con el SLC, dejando de lado los cambios que podría originar el aumento de la carga microbiana o distintos factores físico-químicos. Como este tipo de cambios aparecen, a 4°C, en muestras no tratadas después del quinto día de almacenamiento, la evaluación a los 4 días no será influenciada por los mismos (Jiménez *et al.*, 2009).

4.8.2. Rociado de las porciones

Las muestras se retiraron de las bandejas, se colgaron de los ganchos de un equipo de acero inoxidable construido al efecto, que consiste en una cámara cerrada que evita salpicaduras y contaminación del área de trabajo, se rociaron respetando los pares, una mitad con agua destilada estéril (como control) y la otra con el SLC "W" en estudio no concentrado (SC₀) y concentrado 2,5 (SC₁); 5 (SC₂) y 10 (SC₃) veces, respectivamente. Se dejaron escurrir 1 min, se reubicaron en sus respectivos recipientes, se taparon y se presentaron inmediatamente al panelista correspondiente. Para esta actividad se utilizaron pulverizadores manuales de previa presión marca Giber modelo H-1.5, de 1,5 litros de capacidad (**Fig.3**) Se estandarizaron las condiciones de rociado mediante el número de bombeo del pistón del equipo. Se trabajó a temperatura ambiente de alrededor de 20°C.

Fig. 3. Equipo de rociado de muestras de pollo con SLC



Fig. 4. Par de muestras rociadas con SC₃ en bandeja plástica



4.8.3. Panel de evaluadores

Se trabajó con 6 evaluadores entrenados al efecto, a los cuales se les presentaron las muestras en orden creciente de concentración del SLC con su respectiva muestra control, para que evaluaran los atributos de color y olor, mediante una escala de comparación como la siguiente:

Para el atributo color:

- Mucho más oscura
- Moderadamente más oscura
- Poco más oscura
- Igual que el control
- Poco más clara
- Moderadamente más clara
- Mucho más clara

Y en el caso del olor:

- Mucho más intenso
- Moderadamente más intenso
- Poco más intenso
- Igual al control
- Poco menos intenso
- Moderadamente menos intenso
- Mucho menos intenso

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) seleccionadas

De las 62 cepas de BAL seleccionadas para efectuar el screening de actividad inhibitoria mediante el ensayo de la doble capa de agar, solamente 26 generaron halos de inhibición contra la casi totalidad de las cepas utilizadas como blanco.

Los diámetros de dichos halos estuvieron comprendidos entre 6 y 30 mm, como puede observarse en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Halos de inhibición (diámetro medido en mm) de los aislados de BAL frente a los microorganismos sensibles.

Cepas de BAL	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
A	12	17	10	7
B	20	12	9	16
C	23	18	10	14
D	9	18	7	s/h
E	8	17	8	s/h
F	23	20	10	16
G	6	6	s/h	s/h
H	20	23	10	17
I	7	15	7	9
J	15	18	6	6
K	13	18	8	9
L	7	17	8	12
M	15	18	15	7
N	12	17	8	7
O	17	18	15	8
P	10	18	12	8
Q	22	17	17	8
R	15	15	s/h	10
S	12	17	13	7
T	17	20	s/h	8
U	12	13	13	7
V	15	20	20	s/h
W	15	17	23	s/h
X	13	18	30	10
Y	10	23	29	s/h
Z	15	21	30	12

s/h: ausencia de halo de inhibición

De los valores detallados en la **Tabla 1** se deduce que, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (A, V, M, X, Z, W y Q) fue la subespecie que presentó aislados con mejor capacidad antimicrobiana contra las 4 cepas sensibles evaluadas.

En coincidencia con estos resultados, Lee *et al.* (1999) aislaron, a partir del alimento fermentado denominado Kimchi, una cepa que fue identificada como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, la cual presentó una muy buena actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, así como contra otras cepas de BAL.

Por su parte Audisio and Apella (2006) informaron el hallazgo de cepas de BAL aisladas de pollos que inhibían a microorganismos patogénicos de importancia para la salud humana y de las aves. Entre las cepas aisladas por estos investigadores se destaca la identificada como *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* CRL1384, seleccionada por su capacidad para producir sustancias antimicrobianas activas contra cepas de *L. monocytogenes* y de *Salmonella*.

5.2. Caracterización taxonómica de las cepas de BAL seleccionadas

En función de los resultados detallados en la **Tabla 1**, se procedió a seleccionar las 10 cepas que mostraron los mayores halos de inhibición y, al mismo tiempo, una buena capacidad de crecimiento, para realizar con ellas los cultivos para la obtención de los respectivos SLC.

La caracterización taxonómica de los 10 aislados se detalla en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Caracterización taxonómica de las cepas de BAL aisladas utilizando Kits API 50 CH y API 50 CHL.

Cepa	Caracterización taxonómica
A	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
B	<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>
C	<i>Lactobacillus brevis</i>
M	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Q	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
R	<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>
V	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
W	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
X	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Z	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>

5.3. Caracterización taxonómica de las cepas de *Salmonella* aisladas de canales de pollo y alimento aviar

Las cepas fueron enviadas al Departamento de Enterobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “DR. CARLOS G. MALBRAN” y resultaron caracterizadas según se informa en **Tabla 3**.

Tabla 3: Determinación de serovariedades de *Salmonella*

Cepa	Serotipo	Sitio de aislamiento
S ₁	<i>S. Montevideo</i> (6,7: g,m,s:-)	piel de cuello
S ₂	<i>S. Glostrup</i> (6,8:z ₁₀ :e,n,z ₁₅)	piel de cuello
S ₃	<i>S. Newport</i> (6,8:c,h:1,2)	piel de cuello
S ₄	<i>S. subespecie I O(rugosa):f,g</i>	harina de carne
S ₅	<i>S. Montevideo</i> (6, 7: g,m,s:-)	carne separada mecánicamente
S ₆	<i>S. Agona</i> (4, 12: f,g:-)	Alimento balanceado
S ₇	<i>S. subespecie I 4,5,12:-</i>	Alimento balanceado
S ₈	<i>S. Montevideo</i> (6, 7: g,m,s:-)	piel de cuello
S ₉	<i>S. Newport</i> (6, 8:c,h:1,2)	carne separada mecánicamente
S ₁₀	<i>S. Anatum</i> (3,10:e,h:1,6)	piel de cuello
S ₁₁	<i>S. Newport</i> (6, 8:c,h:1,2)	piel de cuello
S ₁₂	<i>S. Newport</i> (6, 8:c,h:1,2)	piel de cuello
S ₁₃	<i>S. Bredeney</i> (4,12:1,v:1,7)	piel de cuello

(Colaboración de las Dras. Caffer y Pichel, Inst. Malbrán. Comunicación personal)

Es interesante subrayar, en función de los resultados obtenidos, la alta frecuencia de aparición de *S. Newport*, ya que la presencia de esta cepa genera restricciones para la comercialización internacional de carnes.

En estudios de Pérez *et al.* (2004) se evaluó la frecuencia de aparición de *Salmonella* en canales de aves. Noventa y un canales de pollos fueron tomadas directamente de la cadena de procesamiento de dos plantas (estado

Zulia, Venezuela), de las cuales 21 resultaron positivas para el aislamiento de *Salmonella* (23,08%). De los casos que resultaron positivos, fueron identificadas por serología cuatro cepas de *S. Enteritidis* y cuatro de *S. Typhimurium*. También fueron aisladas cepas de *Salmonella* del grupo C2 y otras no clasificadas.

Velilla *et al.* (2011) informaron que entre 2009 y 2010 se realizó una investigación para aislar *Salmonella* spp. en tres plantas de faena de pollos situadas en las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos y Córdoba (Argentina). En las plantas de faena se colectaron dos tipos de muestras, de ciegos y de hígados y bazos. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* fue aislada de 5/128 (3,9%) materias fecales de ciegos y de 17/95 (17,8%) órganos macerados. Además, las cepas caracterizadas serológicamente fueron: *Salmonella* Infantis (9 aislados), *S. Thompson* (3), *S. Rissen* (3), *S. Agona* (2), *S. Branderburg* (2), *S. Enteritidis* (2) y *S. Oranienburg* (1), como se indicó en la Introducción de esta Tesis

Merece destacarse la considerable incidencia de *Salmonella* en canales de pollos verificada por los investigadores citados, si bien los grupos serológicos a los que pertenecen los aislados son variables en los distintos países y entre las diferentes plantas procesadoras estudiadas.

5.4. Determinación de la actividad antibacteriana de los SLC obtenidos de cepas de BAL seleccionadas.

Los resultados de estos ensayos se observan en las **Tablas 4 y 5.**

Tabla 4: Halos de inhibición (diámetro medido en mm) generados por SLC de BAL frente a bacterias Gram (+) y Gram (-).

SLC	Microorganismos sensibles				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. Hadar</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>
A	23	12	12	12	12
B	15	16	18	17	13
C	12	14	14	14	15
M	10	12	12	11	10
Q	12	14	13	13	13
R	15	16	13	14	14
V	12	12	11	12	12
W	15	13	15	16	16
X	12	12	12	12	11
Z	12	12	12	13	12

Ensayos testigo (caldo MRS concentrado): no se observaron halos de inhibición. Diámetro de los orificios en la placa de agar: 5 mm. En **Tabla 2** se detallan las cepas productoras de cada SLC.

Los SLC obtenidos de las cepas “B” y “W” produjeron los mayores halos de inhibición en todos los casos, como puede observarse en la **Tabla 4**, pero frente a *Pseudomonas spp.* el halo generado por el SLC “B” fue de menor tamaño.

Así como se detectó actividad inhibitoria frente a cepas bacterianas Gram (+) y Gram (-) en el presente trabajo, otros investigadores también han observado un amplio espectro antibacteriano. Entre ellos puede mencionarse a Manzo *et al.* (en prensa, 2015), quienes trabajaron con *Enterococcus faecalis* DBFIQ E24, caracterizado previamente como productor de sustancias antibacterianas y antifúngicas, y determinaron la capacidad inhibitoria en el crecimiento de *Bacillus cereus* y de *E. coli* debido a dos bacteriocinas producidas por la cepa en estudio.

Del mismo modo, Roldán *et al.* (2011) comprobaron el efecto inhibitorio de una cepa de *Lactobacillus casei* aislada de un alimento cárnico fermentado producido en la región santafesina (Argentina), y de su sobrenadante libre de células (SLC), frente a tres cepas de *Escherichia coli* O157:H7. La cepa de *L. casei* 206/1 se seleccionó entre varias cepas de BAL sobre la base de resultados obtenidos en estudios donde, aplicando la técnica de agar spot, se determinó que su SLC produjo el mayor efecto inhibitorio sobre *E. coli* O157:H7.

Mostrando algunas coincidencias con los resultados detallados en la Tabla 4, Strompfova and Lauková (2007) comprobaron, mediante ensayo de difusión en agar, la capacidad *in vitro* de 5 cepas de *Enterococcus faecium* aisladas del tracto gastrointestinal de pollos, para producir sustancias tipo bacteriocinas activas contra 20 bacterias indicadoras obtenidas de alimentos de origen animal. Catorce de estas cepas indicadoras [13 Gram (+) y 1 Gram (-)] fueron inhibidas por las sustancias tipo bacteriocinas producidas por las cepas de *Enterococcus*.

Tabla 5: Halos de inhibición (diámetro medido en mm) generados por SLC de BAL frente a cepas de *Salmonella*.

SLC	Cepas de <i>Salmonella</i>												
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀	S ₁₁	S ₁₂	S ₁₃
A	10	10	10	11	10	10	10	13	12	10	12	11	10
B	15	15	15	16	16	15	15	12	12	13	12	13	13
C	12	12	16	15	15	16	11	14	13	12	15	15	14
M	12	10	11	11	10	10	10	11	10	11	11	12	12
Q	13	10	11	12	11	12	11	13	10	11	12	13	10
R	8	14	12	12	12	10	10	10	13	13	12	12	13
V	12	10	11	11	9	12	10	13	12	11	12	12	13
W	14	15	12	13	12	14	13	11	12	12	13	15	12
X	12	11	11	11	11	12	11	12	13	12	12	11	12
Z	13	12	10	11	11	11	11	14	13	12	11	12	11

Ensayos testigo (caldo MRS concentrado): no se observaron halos de inhibición.

Diámetro de los orificios en la placa de agar: 5 mm. En **Tabla 2** se detallan las cepas productoras de cada SLC.

S₁: S. Montevideo; S₂: S. Glostrup; S₃: S. Newport; S₄: S. subespecie I O (rugosa): f.g.; S₅: S. Montevideo; S₆: S. Agona; S₇: S. subsp. I; S₈: S. Montevideo; S₉: S. Newport; S₁₀: S. Anatum; S₁₁: S. Newport; S₁₂: S. Newport; S₁₃: S. Bredeney.

Frente a estas cepas bacterianas, el sobrenadante que generó los mayores halos de inhibición fue nuevamente el “B”, y en segundo lugar el “W”.

Kim *et al.* (2015) seleccionaron 488 cepas de BAL aisladas de productos alimenticios, por sus capacidades antimicrobianas contra cuatro serotipos de *Salmonella*: S. Enteritidis, S. Heidelberg, S. Newport y S. Typhimurium, y los aislamientos que mostraron halos de diámetro de 6 mm o mayores fueron considerados positivos cuando se usó el ensayo de difusión en agar. Se seleccionaron 132 aislamientos para obtener los sobrenadantes libres de células, y dichos SLC fueron sometidos a la evaluación del efecto inhibitorio contra los mismos cuatro serotipos de *Salmonella*. En función de los resultados de este ensayo se eligieron 50 cepas, que fueron las que produjeron halos de

inhibición entre 10 y 13 mm. Como conclusión de dicha investigación se destaca el hecho de que varias de las cepas de BAL estudiadas demostraron propiedades probióticas prometedoras, con la habilidad de producir sustancias del tipo de las bacteriocinas, de fuerte actividad antimicrobiana contra las cepas sensibles evaluadas.

Por otra parte, Gutiérrez Ramírez *et al.* (2005) trabajaron en Cuba con dos cepas nativas de BAL del género *Lactobacillus*, aisladas de productos fermentados, las cuales produjeron un extracto complejo de ácidos orgánicos, peróxidos y péptidos con actividad bactericida. Luego obtuvieron extractos de aislados de *Lactobacillus plantarum* y *L. brevis*, cuya capacidad antibacteriana fue estudiada durante diferentes tiempos de acción y a distintos valores de temperatura y pH. Los extractos estudiados por estos autores presentaron, en coincidencia con los resultados obtenidos en esta Tesis, actividad antimicrobiana contra *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* y otros microorganismos patogénicos.

5.5. Caracterización preliminar de los SLC mediante ensayos físico-químicos.

5.5.1. Efecto de la temperatura (100°C durante 10 y 30 min)

Los SLC seleccionados para llevar a cabo esta caracterización, en función de su mayor capacidad inhibitoria, fueron “B” y “W”. Además, y a fin de hacer más completo el estudio, también se ensayaron SLC con actividad algo menor pero considerablemente interesante, como lo son “C”, “Q”, “R” y “V”.

Los microorganismos que se utilizaron como blanco en estos ensayos fueron: *Pseudomonas spp.*, *B. cereus*, *S. Hadar* y los aislados de *Salmonella*

identificados como: S_2 , S_4 , S_6 , S_8 , S_{10} , S_{12} y S_{13} . El estudio de varios serotipos de *Salmonella* se debe a la importancia epidemiológica de este género en los productos de origen aviar.

Se observan en las **Tabla 6** y **7** los resultados obtenidos en estos ensayos.

Tabla 6: Efecto del tratamiento a 100°C durante 10 min sobre la actividad antimicrobiana de los SLC.

SLC	Microorganismos sensibles									
	<i>Ps. spp.</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. Hadar</i>	S_2	S_4	S_6	S_8	S_{10}	S_{12}	S_{13}
B	14	14	12	12	15	11	13	12	12	13
C	9	13	9	8	8	s/h	9	8	s/h	9
Q	12	11	10	s/h	s/h	s/h	8	8	7	8
R	12	14	11	10	10	10	11	10	11	9
V	9	9	10	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h	8
W	12	15	13	12	12	12	12	11	13	10

Halos de inhibición (mm); s/h: ausencia de halo de inhibición; *Ps.*: *Pseudomonas*; Diámetro de los orificios en la placa de agar: 5 mm. En **Tabla 2** se detallan las cepas productoras de cada SLC.

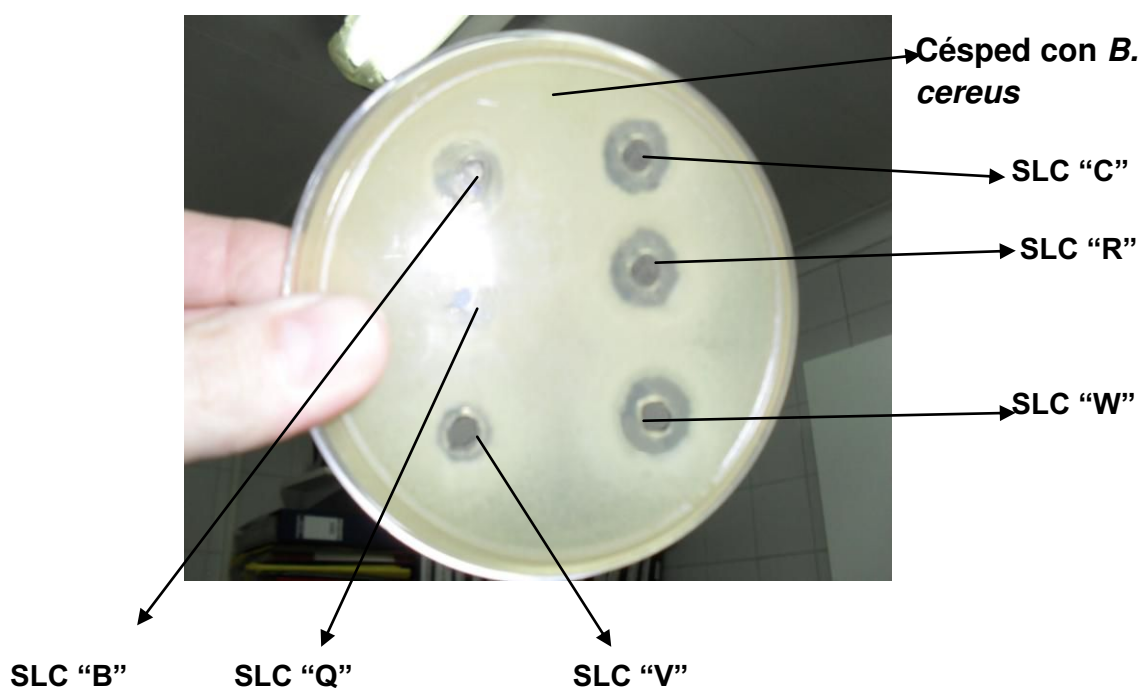
Tabla 7: Efecto del tratamiento a 100°C durante 30 min sobre la actividad antimicrobiana de los SLC.

SLC	Microorganismos sensibles									
	<i>Ps. spp.</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. Hadar</i>	S_2	S_4	S_6	S_8	S_{10}	S_{12}	S_{13}
B	11	12	12	12	12	13	13	13	12	11
C	9	11	9	8	s/h	9	8	9	10	9
Q	8	11	10	s/h	s/h	s/h	8	8	8	7
R	11	11	11	s/h	10	10	10	10	11	11
V	10	10	8	s/h	s/h	8	8	s/h	s/h	8
W	12	12	11	9	11	12	10	11	09	13

Halos de inhibición (mm); s/h: ausencia de halo de inhibición; *Ps.*: *Pseudomonas*; Diámetro de los orificios en la placa de agar: 5 mm. En **Tabla 2** se detallan las cepas productoras de cada SLC.

Comparando estos resultados con los detallados en las **Tablas 4 y 5** se observa que todos los SLC estudiados presentaron termorresistencia en las condiciones ensayadas. Es decir que, en los dos tratamientos realizados a 100°C durante distintos tiempos, ninguno de los SLC ensayados demostró disminución muy marcada o desaparición total de su capacidad inhibitoria contra todas las cepas blanco. Los mayores halos de inhibición fueron los presentados por los SLC “B”, “R” y “W”, lo que indica que son los que poseen sustancias activas con mayor resistencia térmica y los convierte en los más interesantes desde el punto de vista de sus potenciales aplicaciones tecnológicas.

Fig. 5: Halos de inhibición producidos por los SLC “B”, “C”, “Q”, “R”, “V” y “W” contra *Bacillus cereus*, luego del tratamiento térmico a 100°C, 10 minutos



Los investigadores Audisio and Apella (2006) determinaron que la sustancia activa de sobrenadantes de cultivos con actividad antimicrobiana generados por *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* CRL1384 era resistente al calor (121°C por 15 min).

En los estudios de Ndlovu *et al.* (2015) se reportó la presencia de una enterocina en el vino, producida por una cepa de *Enterococcus*, la cual presentaba estabilidad a las temperaturas de 37, 60, 80 y 100°C.

Por su parte, Gaaloul *et al.* (2015) evaluaron las propiedades antimicrobianas de una cepa de *Enterococcus faecium*. Esta cepa fue aislada en Túnez, a partir de leche cruda de vaca, y se determinó su producción de bacteriocina con actividad contra bacterias Gram (+) y Gram (-). Las sustancias antimicrobianas producidas por esta cepa demostraron su estabilidad a temperaturas elevadas.

Los datos informados por los investigadores antes citados son coincidentes con los aquí obtenidos, en cuanto se refiere a la resistencia térmica de las bacteriocinas de BAL detectadas. Cabe añadir que las bacteriocinas termorresistentes, pertenecientes a las Clases I y II de la clasificación establecida por García *et al.* (2010) y Herrero Sánchez (2013) están dentro de las más prometedoras para su utilización como biopreservadores alimentarios. Ello se debe a la posibilidad de aplicarlas a alimentos que luego deberán ser sometidos a una pasteurización o a otros tipos de tratamientos térmicos.

5.5.2. Efecto del pH

En las **Tablas 8, 9, 10, 11, 12 y 13** se observan los resultados de los estudios correspondientes a los efectos del pH sobre la actividad antimicrobiana de los SLC. En la primera Tabla se detallan los resultados correspondientes al ensayo blanco o de referencia, es decir, al efecto antimicrobiano debido a distintos valores de pH del Caldo MRS (Merck) esterilizado.

Los microorganismos sensibles que se utilizaron en estos ensayos fueron: *Pseudomonas* spp., *B. cereus*, *S. Hadar* y las cepas de *Salmonella* *S*₆ y *S*₁₂. En cuanto a los SLC, se usaron para este estudio los identificados como “W”, “R”, “C”, “Q” y “V”.

Tabla 8: Efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano debido al valor de pH del Caldo MRS (Merck) concentrado y esterilizado (ensayo blanco).

Caldo MRS	Microorganismos sensibles					
	pH	<i>S. Hadar</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Ps. spp.</i>	<i>S</i> ₆	<i>S</i> ₁₂
	7	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
	6,5	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
	6	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
	5,5	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
	5	6	7	6	6	6
	4,5	7	11	7	7	8

Halos de inhibición (mm); s/h: ausencia de halo de inhibición; *Ps.*: *Pseudomonas*; Diámetro de los orificios en la placa de agar: 5 mm.

Tabla 9: Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana del SLC “R”.

SLC “R”	Microorganismos sensibles				
pH	<i>S. Hadar</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Ps. spp.</i>	<i>S</i> ₆	<i>S</i> ₁₂
7	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
6,5	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
6	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
5,5	8	7	7	7	7
5	10	11	9	9	8
4,5	12	14	13	11	12

Halos de inhibición (mm); s/h: ausencia de halo de inhibición; *Ps.*: *Pseudomonas*; Diámetro de los orificios en la placa de agar: 5 mm. En **Tabla 2** se detalla la cepa productora del SLC “R”.

Tabla 10: Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana del SLC “C”.

SLC “C”	Microorganismos sensibles				
pH	<i>S. Hadar</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Ps. spp.</i>	<i>S</i> ₆	<i>S</i> ₁₂
7	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
6,5	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
6	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
5,5	8	8	7	7	7
5	6	12	10	11	11
4,5	7	15	14	15	13

Halos de inhibición (mm); s/h: ausencia de halo de inhibición; *Ps.*: *Pseudomonas*.; Diámetro de los orificios en la placa de agar: 5 mm. En **Tabla 2** se detalla la cepa productora del SLC “C”.

Tabla 11: Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana del SLC “V”.

SLC “V”	Microorganismos sensibles				
pH	S. Hadar	B. cereus	Ps. spp	S₆	S₁₂
7	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
6,5	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
6	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
5,5	7	7	6	7	8
5	10	10	10	10	11
4,5	12	10	12	12	11

Halos de inhibición (mm); s/h: ausencia de halo de inhibición; *Ps.*: *Pseudomonas*; Diámetro de los orificios en la placa de agar: 5 mm. En **Tabla 2** se detalla la cepa productora del SLC “V”.

Tabla 12: Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana del SLC “Q”.

SLC “Q”	Microorganismos sensibles				
pH	S. Hadar	B. cereus	Ps. spp.	S₆	S₁₂
7	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
6,5	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
6	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
5,5	7	7	7	8	7
5	8	8	9	10	10
4,5	10	12	12	12	12

Halos de inhibición (mm); s/h: ausencia de halo de inhibición; *Ps.*: *Pseudomonas*; Diámetro de los orificios en la placa de agar: 5 mm. En **Tabla 2** se detalla la cepa productora del SLC “Q”.

Tabla 13: Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana del SLC “W”.

SLC “W”	Microorganismos sensibles				
	S. Hadar	<i>B. cereus</i>	<i>Ps. spp.</i>	S ₆	S ₁₂
pH					
7	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
6,5	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
6	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
5,5	6	6	7	7	7
5	8	7	8	8	10
4,5	11	12	12	10	11

Halos de inhibición (mm); s/h: ausencia de halo de inhibición; *Ps.*: *Pseudomonas*; Diámetro de los orificios en la placa de agar: 5 mm. En **Tabla 2** se detalla la cepa productora del SLC “W”.

Los ensayos de referencia realizados con Caldo MRS (Merck) a distintos valores de pH mostraron que en el rango comprendido entre 4,5 y 5 existe actividad inhibitoria debida exclusivamente a la acidez láctica, siendo en general muy pequeños los halos observados. Cuando se evaluó la influencia del pH sobre la actividad de los diferentes SLC en estudio, se observaron halos considerablemente más grandes en el mismo rango de pH que los ensayos de referencia. A valores de pH mayores a 5 se observaron halos de inhibición del crecimiento generado por la mayoría de los SLC ensayados. A pH 5,5 se comprobó que el SLC “R” formó halos de inhibición frente a todos los microorganismos utilizados como blanco, del mismo modo que lo hicieron los SLC “C”, “Q”, “V” y “W”. Todos estos resultados indican la presencia de compuestos con actividad inhibitoria distintos del ácido láctico en los SLC estudiados, los cuales tendrían un pH óptimo de acción comprendido entre 4,5 y 5,5, dependiendo también este valor óptimo de la especie bacteriana utilizada como blanco de acción de los SLC.

Gutiérrez Ramírez *et al.* (2005) indicaron que la mejor actividad antimicrobiana de los extractos de *Lactobacillus plantarum* y *L. brevis* contra *E. coli* y *Listeria* se lograba a pH 5,5, y que el cambio de pH no presentaba interferencia sobre el extracto de *L. brevis*. Además, ambos extractos fueron estables al calentamiento de 50°C y 80°C, propiedad que es importante porque asegura el control de bacterias patógenas en algunos procesos en la industria alimentaria.

Strompfova and Lauková (2007) hallaron, aplicando la técnica de PCR, los genes estructurales de las sustancias tipo bacteriocina de las cepas de *Enterococcus faecium* aisladas del tracto gastrointestinal de pollos. En este estudio se detectaron genes de enterocina A y genes de enterocina P en todas las cepas. Soluciones de dichas sustancias fueron ajustadas a distintos valores de pH, comprobándose que la mayor actividad en ambas se presentó a pH 5, y la menor entre 7 y 9. También se evaluó la estabilidad después de calentar las soluciones de estas sustancias a 30°C y 60°C durante 1 h, 80°C por 20 minutos y 100°C por 10 minutos, y se observó que no hubo diferencias en la actividad inhibitoria.

5.6. Caracterización enzimática

A fin de realizar una caracterización primaria de los SLC, se estudió la posible presencia en su composición de compuestos inhibitorios de naturaleza proteica, para lo cual se evaluó la acción ejercida sobre su actividad por las siguientes enzimas proteolíticas: pepsina, tripsina, pronasa E y proteinasa K. También se evaluó la potencial presencia de peróxido de hidrógeno en los SLC, mediante ensayos con la enzima catalasa.

En esta etapa de la investigación, se repitió el uso de los SLC que se utilizaron en las pruebas de tratamientos térmicos, y las cepas sensibles fueron las mismas que se emplearon en las pruebas de pH.

Los resultados obtenidos se detallan en las **Tablas 14, 15, 16, 17, 18 y 19**.

Tabla 14: Efecto de tratamientos enzimáticos sobre la actividad antimicrobiana del SLC “B”.

Enzimas	Microorganismos sensibles				
	<i>S. Hadar</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Ps. spp.</i>	<i>S</i> ₆	<i>S</i> ₁₂
SLC “B” (s/e)	17	17	14	15	14
B + proteinasa K	12	12	12	13	13
B + tripsina	13	10	12	12	13
B + pepsina	12	12	13	13	12
B + pronasa E	12	12	12	12	12
B + catalasa	12	9	13	12	12

Halos de inhibición (mm); s/h: ausencia de halo de inhibición; *Ps.*: *Pseudomonas*; (s/e): sin agregado de enzimas; Diámetro de los orificios en la placa de agar: 5 mm. En **Tabla 2** se detalla la cepa productora del SLC “B”.

Tabla 15: Efecto de tratamientos enzimáticos sobre la actividad antimicrobiana del SLC “C”.

Enzimas	Microorganismos sensibles				
	<i>S. Hadar</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Ps. spp.</i>	<i>S</i> ₆	<i>S</i> ₁₂
SLC “C” (s/e)	15	15	16	16	16
C + proteinasa K	11	15	12	11	12
C + tripsina	11	12	12	12	12
C + pepsina	10	15	11	11	12
C + pronasa E	11	14	13	11	11
C + catalasa	12	13	13	12	12

Halos de inhibición (mm); s/h: ausencia de halo de inhibición; *Ps.*: *Pseudomonas*; (s/e): sin agregado de enzimas; Diámetro de los orificios en la placa de agar: 5 mm. En **Tabla 2** se detalla la cepa productora del SLC “C”.

Tabla 16: Efecto de tratamientos enzimáticos sobre la actividad antimicrobiana del SLC “R”.

Enzimas	Microorganismos sensibles				
	<i>S. Hadar</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Ps. spp.</i>	<i>S</i> ₆	<i>S</i> ₁₂
SLC “R” (s/e)	13	13	13	11	11
R + proteinasa K	7	7	7	7	8
R + tripsina	6	7	8	9	8
R + pepsina	8	7	7	10	7
R + pronasa E	7	s/h	8	7	9
R + catalasa	8	8	7	7	7

Halos de inhibición (mm); s/h: ausencia de halo de inhibición; *Ps.*: *Pseudomonas*; (s/e): sin agregado de enzimas; Diámetro de los orificios en la placa de agar: 5 mm. En **Tabla 2** se detalla la cepa productora del SLC “R”.

Tabla 17: Efecto de tratamientos enzimáticos sobre la actividad antimicrobiana del SLC “V”.

Enzimas	Microorganismos sensibles				
	<i>S. Hadar</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Ps. spp.</i>	<i>S</i> ₆	<i>S</i> ₁₂
SLC “V” (s/e)	11	13	12	11	12
V + proteinasa K	7	8	7	7	8
V + tripsina	7	7	8	7	8
V + pepsina	9	10	7	7	7
V + pronasa E	8	8	6	8	7
V + catalasa	6	8	7	6	7

Halos de inhibición (mm); s/h: ausencia de halo de inhibición; *Ps.*: *Pseudomonas*; (s/e): sin agregado de enzimas; Diámetro de los orificios en la placa de agar: 5 mm. En **Tabla 2** se detalla la cepa productora del SLC “V”.

Tabla 18: Efecto de tratamientos enzimáticos sobre la actividad antimicrobiana del SLC “Q”.

Enzimas	Microorganismos sensibles				
	<i>S. Hadar</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Ps. spp.</i>	<i>S₆</i>	<i>S₁₂</i>
SLC “Q” (s/e)	13	12	12	13	12
Q + proteinasa K	7	9	11	10	8
Q + tripsina	7	9	8	9	7
Q + pepsina	9	10	9	9	8
Q + pronasa E	7	10	11	9	9
Q + catalasa	9	8	8	9	10

Halos de inhibición (mm); s/h: ausencia de halo de inhibición; *Ps.*: *Pseudomonas*; (s/e): sin agregado de enzimas; Diámetro de los orificios en la placa de agar: 5 mm. En **Tabla 2** se detalla la cepa productora del SLC “Q”.

Tabla 19: Efecto de tratamientos enzimáticos sobre la actividad antimicrobiana del SLC “W”.

Enzimas	Microorganismos sensibles				
	<i>S. Hadar</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Ps. spp.</i>	<i>S₆</i>	<i>S₁₂</i>
SLC “W” (s/e)	14	15	16	15	16
W + proteinasa K	8	9	10	9	11
W + tripsina	10	9	11	10	11
W + pepsina	10	10	11	10	12
W + pronasa E	9	10	11	12	11
W + catalasa	10	8	11	10	11

Halos de inhibición (mm); s/h: ausencia de halo de inhibición; *Ps.*: *Pseudomonas*; (s/e): sin agregado de enzimas s; Diámetro de los orificios en la placa de agar: 5 mm. En **Tabla 2** se detalla la cepa productora del SLC “W”.

En base a los datos obtenidos se determinó que los tratamientos con enzimas proteolíticas siempre produjeron una reducción considerable, aunque variable, en los diámetros de los halos de inhibición para los distintos sobrenadantes frente a las diferentes cepas blanco. Los valores promedio de 11 a 17 mm se redujeron al rango comprendido entre 6 y 13 mm. Si bien se trata sólo de un ensayo de caracterización primaria, el efecto de los tratamientos con enzimas proteolíticas indica la probable presencia de compuestos proteicos o peptídicos en la composición de todos los SLC ensayados.

Por otra parte, también se observó una considerable disminución del diámetro de los halos de inhibición luego de los tratamientos de todos los SLC con la enzima catalasa, lo que sugiere *a priori* la presencia simultánea de H₂O₂ como agente inhibidor en los SLC estudiados.

Wu *et al.* (2014) investigaron la estabilidad de la actividad antimicrobiana a distintos valores de temperatura y pH de los sobrenadantes libres de células (SLC) de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus fermentum*. También estudiaron el efecto sobre esos SLC de tratamientos con distintas enzimas proteolíticas, aplicando el ensayo de difusión en agar. El SLC del cultivo de *Lactobacillus casei* mostró estabilidad al calor, y una buena actividad antimicrobiana en condiciones de bajo pH; se encontró, además, que éste era sensible a las enzimas proteolíticas tales como tripsina, proteasa neutra y papaína, pero no así a pepsina.

Zhang *et al.* (2013) aislaron la cepa de *Lactobacillus plantarum* BM-1 a partir de un producto cárnico fermentado chino tradicional, la que producía una sustancia activa contra una amplia gama de bacterias Gram (+) y Gram (-).

Esta sustancia, llamada Bacteriocina BM-1, demostró ser sensible a las enzimas proteolíticas, estable a valores de pH comprendidos en el intervalo de 2,0 a 10,0, y también resistente a un tratamiento térmico de 15 min a 121°C.

Oh *et al.* (2000) determinaron que la cepa *Lactobacillus acidophilus* 30SC podría ser un potencial cultivo probiótico. Esta cepa produjo un compuesto antimicrobiano estable al calor (95 °C, 20 min), de naturaleza proteica, demostrada por su sensibilidad a tratamientos con pronasa E y proteinasa K, mientras que la enzima catalasa no tuvo ningún efecto sobre la actividad inhibidora, lo que sugiere que la misma no se debe a peróxido de hidrógeno. La sustancia fue completamente estable a pH 6 y 7, y un 50% de la actividad se mantuvo a valores de pH comprendidos entre 3 y 10.

Por su parte Tulini *et al.* (2011) estudiaron la bacteriocina producida por la cepa de *Enterococcus faecium* 130, aislada de un alimento, la cual fue caracterizada y purificada. La misma presentó estabilidad en el rango de pH comprendido entre 2 y 10, y no perdió actividad después de un calentamiento a 100 °C durante 15 minutos.

Pringsulaka *et al.* (2012) aislaron bacterias del ácido láctico de carne fermentada y productos de pescado de Tailandia. De un total de 93 muestras, obtuvieron 152 cepas de BAL. Al realizar la prueba de actividad antimicrobiana de todas estas cepas mediante el método de difusión en agar, sólo seis aislados presentaron actividad. Alícuotas de SLC obtenidos de cultivos de estos aislados fueron tratadas con catalasa, tripsina, actinasa, proteasa XIII, ficina, tripsina de páncreas porcino, α -quimotripsina y pepsina. La actividad inhibitoria no se vió afectada por la adición de catalasa, y resultó completamente inactivada después del tratamiento con las enzimas

proteolíticas. Estos resultados confirmaron que los compuestos inhibidores producidos por estas cepas eran de naturaleza proteica y poseían características típicas de bacteriocinas. No se observaron cambios de la actividad de los SLC a valores de pH comprendidos entre 2,0 y 8,0, como tampoco luego de un tratamiento térmico de 15 minutos a 121 °C.

La actividad antimicrobiana de la bacteriocina producida por *L. plantarum* LP 31 fue eliminada completamente mediante tratamientos con tripsina y pepsina; parcialmente disminuida por acción de papaína, lipasa y lisozima y también levemente modificada por la acción de amiloglucosidasa y α -amilasa, pero no fue afectada por catalasa (Müller *et al.*, 2008). También se determinó que la actividad antimicrobiana del SLC que contiene a esta bacteriocina fue estable en el rango de pH comprendido entre 5 y 5,5, mostró una inactivación parcial o total a pH entre 6 y 7, y a pH 4,5 la actividad fue incrementada debido al efecto adicional de la acidez. El tratamiento térmico a 100°C durante 10 y 30 minutos no redujo la actividad inhibitoria de este SLC.

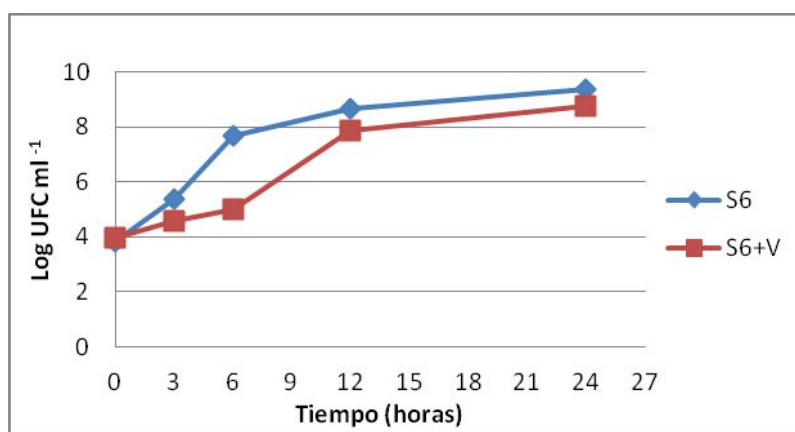
5.7. Determinación del modo de acción

5.7.1. Cinéticas de crecimiento a 37°C

Los SLC identificados como “Q”, “V” y “W” obtenidos de cultivos de tres cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aisladas de intestino de pollo, fueron seleccionados para determinar el modo de acción de las sustancias antibacterianas presentes en ellos, en función de que los mismos produjeron los mayores halos de inhibición en todos los ensayos previos. En las Figuras siguientes (**Fig. 6 a 11**) se muestra la cinética de crecimiento de dos de las diferentes serovariedades de *Salmonella* aisladas de canales de pollo y del

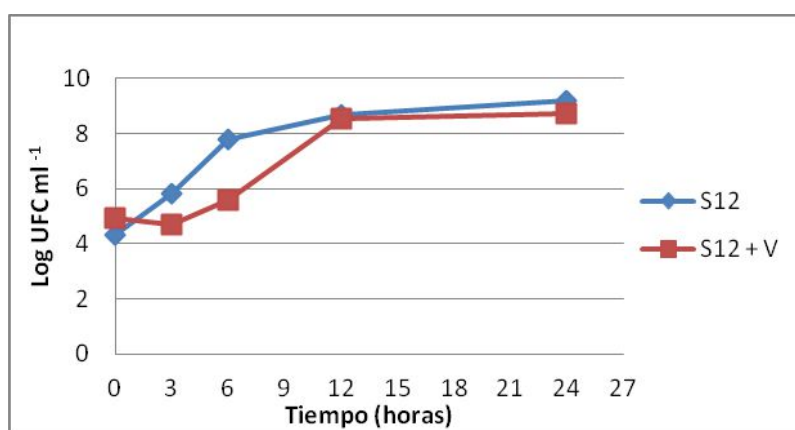
alimento aviar, que corresponden a *Salmonella* Agona y *Salmonella* Newport (S_6 y S_{12}), respectivamente. Dichas curvas fueron trazadas, comparativamente, en el caldo de cultivo tradicional (NB, Merck) libre de SLC y en el mismo medio con el agregado de los SLC antes mencionados.

Fig. 6: *Salmonella* S_6 con y sin la adición de SLC “V”.



S_6 : *Salmonella* Agona “V”: SLC de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Fig. 7: *Salmonella* S_{12} con y sin la adición de SLC “V”.

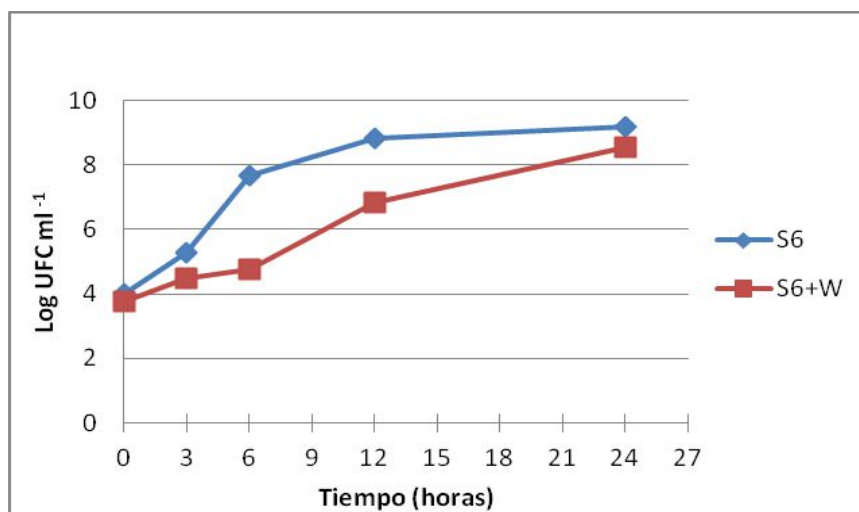


S_{12} : *Salmonella* Newport “V”: SLC de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

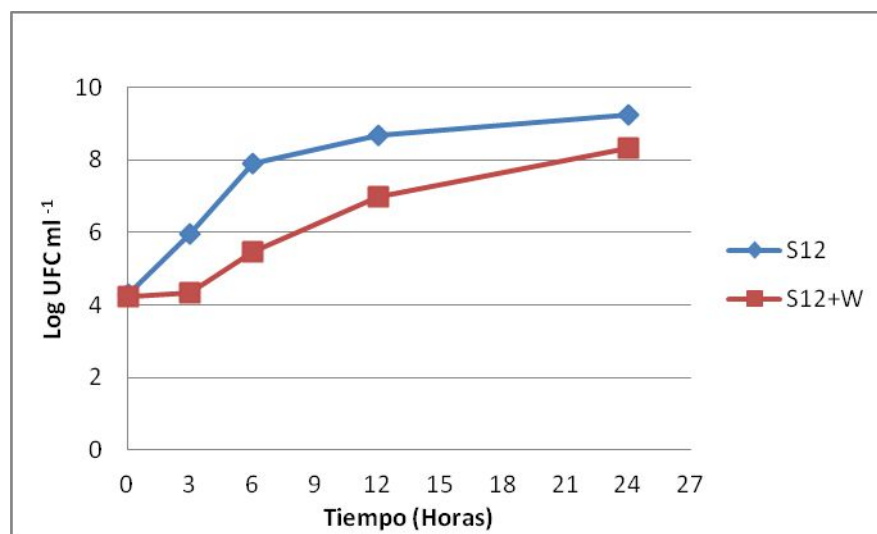
En las **Fig. 6** y **7** se aprecia que el agregado del SLC “V” produjo, en general, un efecto similar en el desarrollo de las cepas S_6 y S_{12} . En el caso de S_6+V se observa un retraso en la velocidad de crecimiento en su fase inicial, en cambio en $S_{12}+V$ se presenta una leve disminución en los recuentos celulares registrados en esa etapa.

Independientemente de los valores intermedios de los recuentos observados en ambos cultivos de salmonella, al finalizar el análisis a las 24 h, éstos presentaron números de células microbianas casi idénticos, tanto con la adición como sin el agregado del SLC en estudio.

Fig. 8: *Salmonella* S_6 con y sin la adición de SLC “W”.

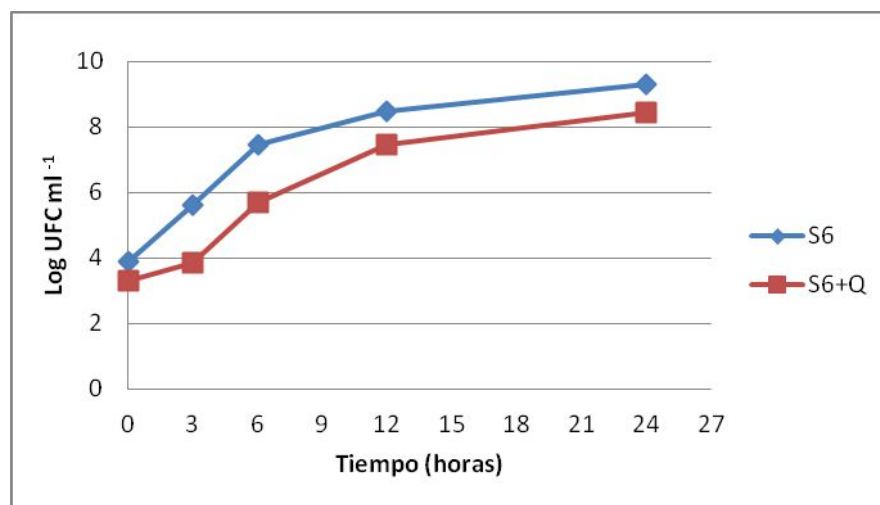


S_6 : *Salmonella* Agona “W”: SLC de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

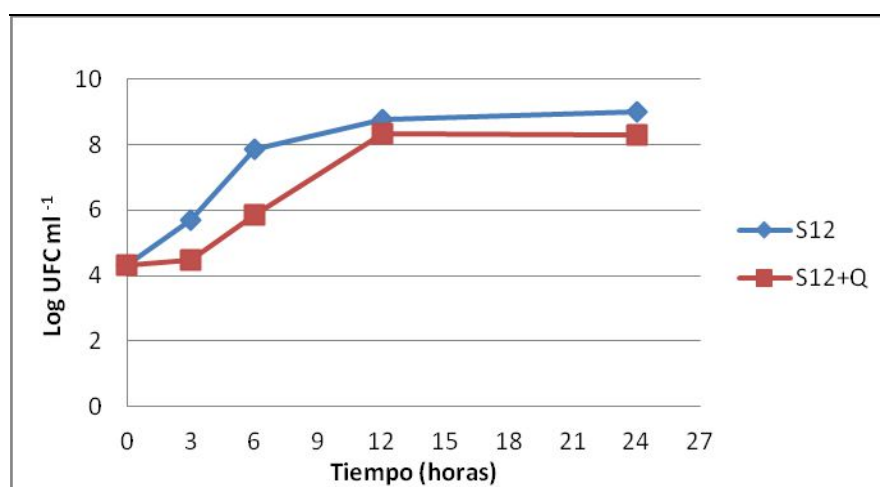
Fig. 9: *Salmonella* S_{12} con y sin la adición de SLC "W".

S_{12} : *Salmonella* Newport "W": SLC de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

La cinética de crecimiento seguida por las cepas en este ensayo con el agregado del SLC "W", fue similar al comprobado en el ensayo con el SLC "V", como puede verse en las **Fig. 8** y **9**. En esta oportunidad se observa nuevamente la generación de una fase lag bien definida para la cepa S_{12+W} , durante las tres primera horas de cultivo. Por otra parte, se determinó que tanto con "V" como con "W", ambas cepas alcanzaron valores muy parejos en las concentraciones celulares a las 24 h de cultivo, pero S_{12+W} muestra una diferencia algo más marcada en los valores de conteos de UFC (aprox. 1 log) con y sin el SLC en estudio.

Fig. 10: *Salmonella* S₆ con y sin la adición de SLC “Q”.

S₆: *Salmonella* Agona. “Q”: SLC de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Fig. 11: *Salmonella* S₁₂ con y sin la adición de SLC “Q”

S₁₂: *Salmonella* Newport. “Q”: SLC de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*

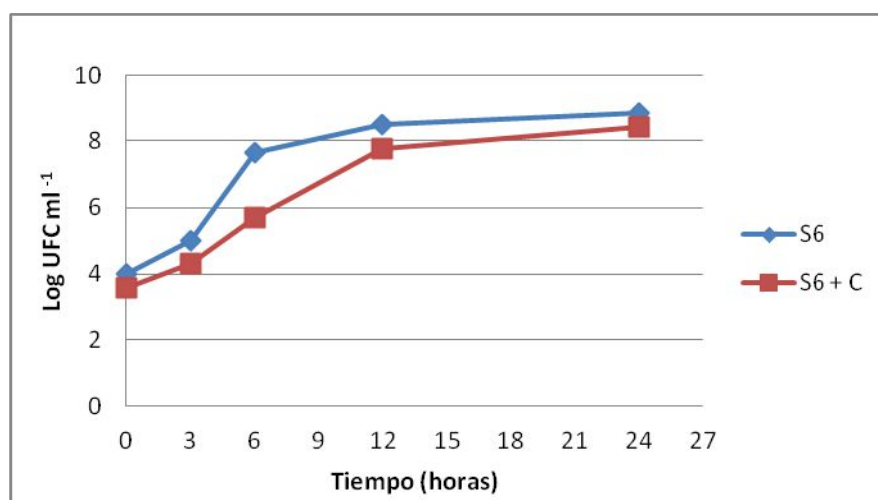
En el caso del agregado del SLC “Q”, se observa en las **Fig. 10** y **11** que ninguna de las cepas alcanzó una diferencia superior a log 1 UFC/ml después de las 12 h del tiempo de cultivo ensayado. Debe notarse aquí que con la cepa S₆ el agregado del sobrenadante registra una leve disminución de la pendiente de la curva, lo que significa una disminución de la velocidad de crecimiento. En

cambio para la cepa S_{12} el agregado del sobrenadante genera una marcada fase lag inicial.

Las figuras siguientes (**Fig. 12 a 15**) corresponden a ensayos que se llevaron a cabo con SLC obtenidos de otras cepas de BAL en estudio, según se detalla a continuación:

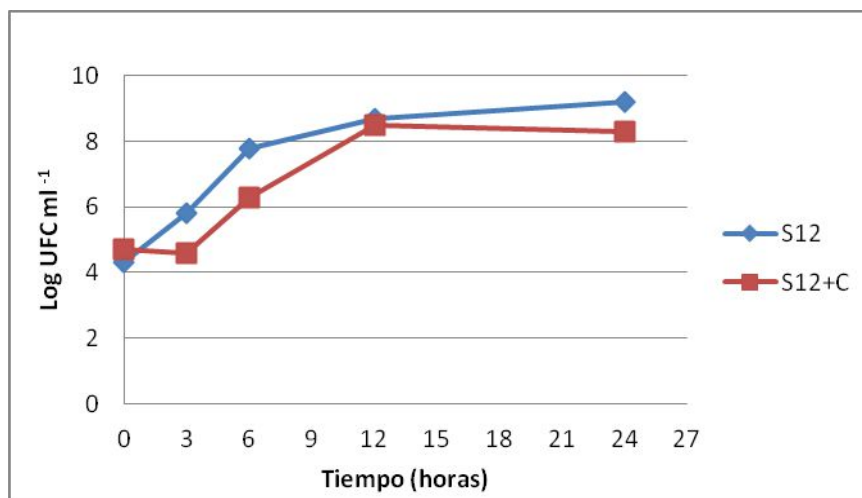
En las **Fig. 12 y 13** se describe el efecto del agregado del SLC “C”, obtenido de una cepa de *Lactobacillus brevis*, y en las **Fig. 14 y 15** el agregado corresponde al SLC “R”, obtenido de la cepa de *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus*, sobre la cinética del crecimiento de las dos serovariedades de *Salmonella* utilizadas en estos ensayos.

Fig. 12: *Salmonella* S_6 con y sin la adición de SLC “C”.



S_6 : *Salmonella* Agona. “C”: SLC de *Lactobacillus brevis*

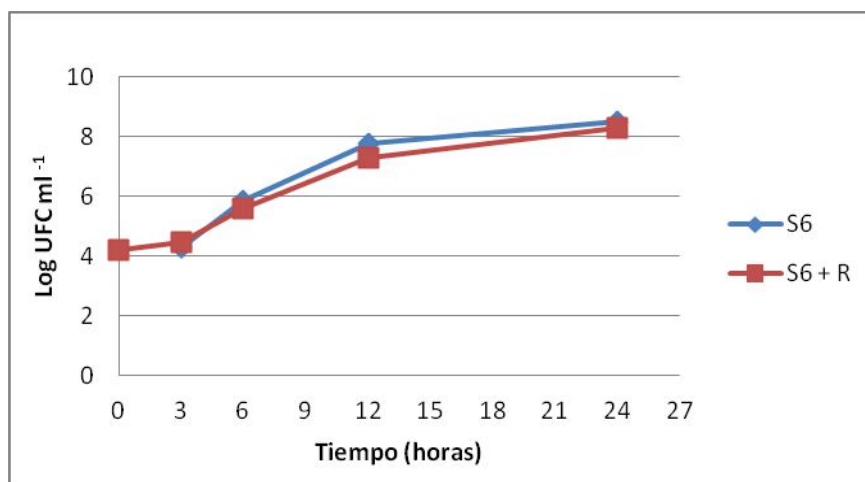
Fig. 13: *Salmonella* S₁₂ con y sin la adición de SLC “C”.



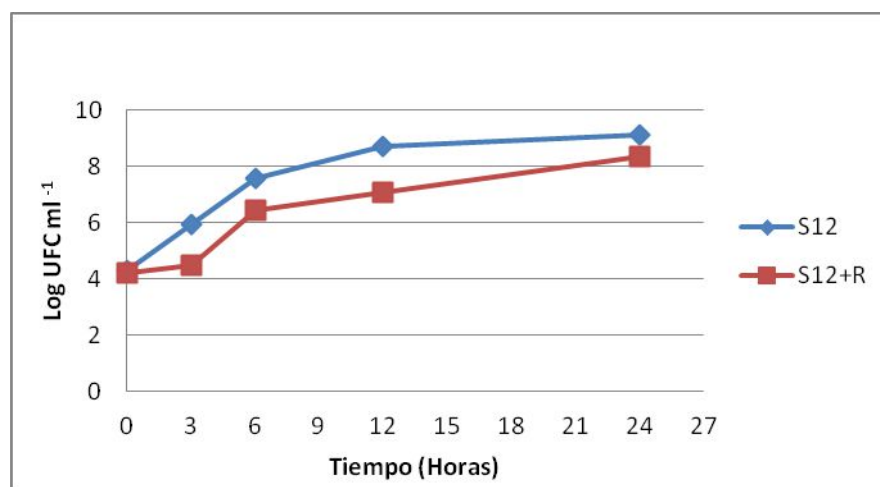
S₁₂: *Salmonella* Newport.

“C”: SLC de *Lactobacillus brevis*

Fig.14: *Salmonella* S₆ con y sin la adición de SLC “R”.



S₆: *Salmonella* Agona. “R”: SLC de *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus*

Fig. 15: *Salmonella* S₁₂ con y sin la adición de SLC “R”.

S₁₂: *Salmonella* Newport. “R”: SLC de *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus*

Por el agregado de los SLC “C” y “R” se han registrado los siguientes efectos:

- S₆+C registró una diferencia con S₆ sin el agregado del SLC en la fase de crecimiento exponencial y a partir del día 12 los números de recuento registrados fueron prácticamente iguales.

- Al finalizar el tiempo de desarrollo no se observaron diferencias en los valores de concentración celular para ninguna de las cepas de *Salmonella* cultivadas en presencia o ausencia del SLC “C”, aunque la cepa S₁₂ mostró una diferencia en la población final algo mayor que la S₆ en presencia del sobrenadante.

- Las pequeñas diferencias en los valores de conteo de UFC en las cepas estudiadas de *Salmonella* con y sin el agregado del SLC “C” nos demuestran sus bajos efectos inhibitorios en las condiciones establecidas para este estudio.

- En el caso del agregado del SLC "R", la cepa S_6 no presentó diferencias en el desarrollo en ninguna de las fases del crecimiento, como puede observarse en la **Fig. 14**.

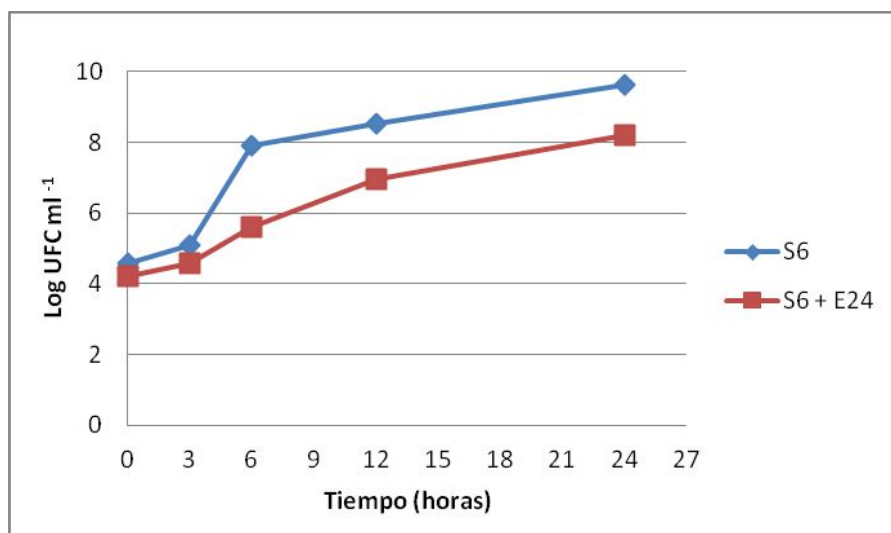
-Por su parte S_{12} mostró un retraso de 3 h en el inicio del desarrollo de esta cepa, igualmente que con los anteriores SLC evaluados, y diferencias aproximadamente constantes pero poco relevantes en los valores de sus concentraciones celulares entre S_{12} y S_{12} +“R” durante toda la curva del crecimiento. En este caso tampoco se determinó una importante diferencia en el valor final de la concentración celular alcanzada (**Fig. 15**).

Si se comparan los resultados logrados por el agregado de los diferentes sobrenadantes estudiados, puede afirmarse que el mayor efecto inhibitor del crecimiento de las cepas evaluadas fue el producido por el agregado del SLC “W”, y también que la mayor sensibilidad frente a todos los SLC ensayados fue la presentada por la cepa S_{12} .

En general se puede decir que en todos los ensayos de la determinación del modo de acción de los SLC a 37°C sobre las dos cepas de *Salmonella* estudiadas, el comportamiento de ambas fue bastante similar para los diferentes SLC en los tiempos de cultivo ensayados y, además, que los valores finales de concentración celular no difirieron apreciablemente en ninguno de los cultivos del estudio. Sin embargo, debido a la extensión de la fase lag generada por el agregado de SLC para la cepa S_{12} , en varios casos no menor de tres horas, podría justificar su futura utilización en tecnologías alimentarias, dado que no permite un aumento de la población celular durante el tiempo rutinario de preparación de productos alimenticios, a las temperaturas habituales de cocinas y ambientes de cocina.

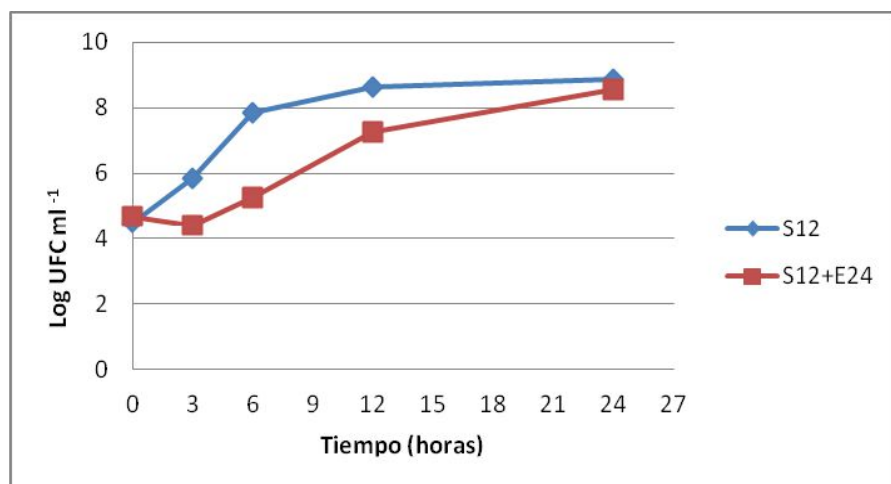
Además de los SLC obtenidos de cultivos de las cepas de BAL aisladas de intestinos de pollos analizados hasta aquí, se ensayaron también los SLC provenientes de la cepa de *Enterococcus faecalis* E₂₄ (E₂₄) y de una cepa de *Lactobacillus casei* (Lc), aisladas de alimentos lácteos y pertenecientes ambas a la colección propia de la Cátedra de Microbiología y Biotecnología (FIQ-UNL). Los resultados obtenidos se detallan en las Fig. 16 a 19.

Fig. 16: *Salmonella* S₆ con y sin la adición de SLC “E₂₄”.



S₆: *Salmonella* Agona. “E₂₄”: SLC de *Enterococcus faecalis* E₂₄

Fig. 17: *Salmonella* S₁₂ con y sin la adición de SLC “E₂₄”.

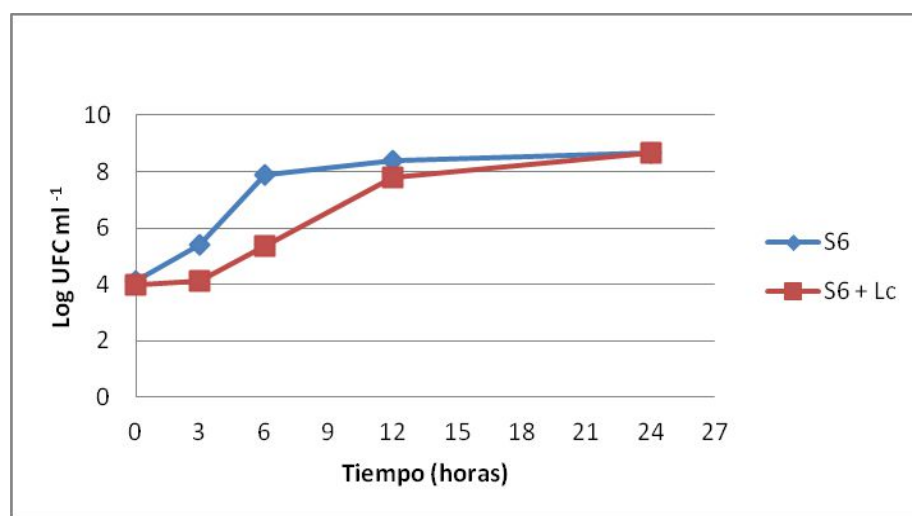


S₁₂: *Salmonella* Newport “E₂₄”: SLC de *Enterococcus faecalis* E₂₄

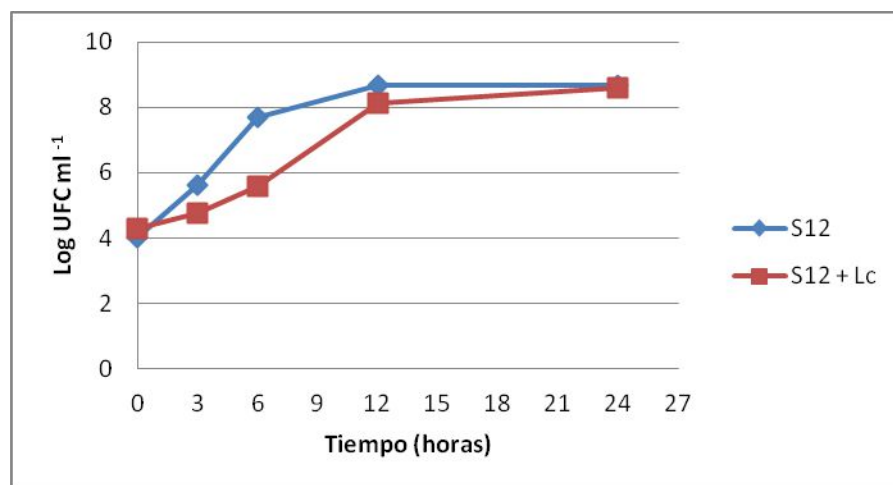
En la **Fig. 16** se puede observar que, con la adición del SLC E_{24} , si bien se presentó una reducción considerable en las concentraciones celulares de S_6 en el tiempo de cultivo ensayado (24 h), en las 3 primeras horas no se generó un retraso importante en la velocidad de multiplicación celular.

Con S_{12} , en cambio, se puede observar en la **Fig. 17** una leve disminución en los valores de conteo de UFC durante la fase lag generada por el SLC “ E_{24} ”, en las 3 horas iniciales del cultivo, y una buena diferencia en los valores poblacionales durante la mayor parte del tiempo de multiplicación, excepto al finalizar el mismo. Estos resultados demuestran que el uso de este SLC consigue una situación similar a la lograda por el uso de los sobrenadantes anteriormente analizados; es decir que, si bien se informan diferencias en los valores intermedios de las concentraciones celulares, al finalizar el estudio (24 h) estos valores resultaron prácticamente idénticos, con y sin el agregado del SLC evaluado.

Fig. 18: *Salmonella* S_6 con y sin la adición de SLC “Lc”.



S_6 : *Salmonella* Agona “Lc”: SLC de *Lactobacillus casei*

Fig. 19: *Salmonella* S₁₂ con y sin la adición de SLC “Lc”.S₁₂: *Salmonella* Newport“Lc”: SLC de *Lactobacillus casei*

En la **Fig. 18** y **19** el agregado del SLC de *Lactobacillus casei* (Lc) mostró efectos similares en ambas cepas a lo largo del estudio, pero una fase lag de alrededor de 3 h fue presentada por la cepa S₆, a diferencia de situaciones anteriores. Por lo contrario, S₁₂ no generó ningún retraso en el inicio del desarrollo

Diferencias a veces considerables en los valores de las concentraciones celulares se mantuvieron hasta las 12 h de cultivo, y después de ese tiempo y hasta las 24 h finales las cinéticas de crecimiento con y sin el agregado del SLC resultaron prácticamente coincidentes.

A diferencia de los resultados obtenidos con las cepas de BAL ensayadas en el presente estudio, Roldán *et al.* (2011) demostraron que el SLC generado por el cultivo de *L. casei* 206/1 poseía una gran capacidad inhibitoria contra *E. coli* O157:H7. Este SLC ejerció una acción bacteriostática durante las primeras 12 horas de propagación, no permitiendo que el patógeno se desarrollase y manteniéndolo aproximadamente en los mismos niveles de

concentración celular que presentaban los inóculos iniciales. Luego de ese tiempo la acción del SLC se convirtió en bactericida, dado que al cabo de 24 horas de incubación no se detectaron células viables de ninguna de las tres cepas de *E. coli* O157:H7 estudiadas.

Cuando se analizan los resultados obtenidos en estos ensayos desde el punto de vista de la aplicación práctica de los sobrenadantes en productos alimenticios frescos, cabe decir que éstos no pueden ser mantenidos tanto tiempo (24 h o más) a temperatura de 37°C, ya sea por un posible aumento del número de células de los microorganismos patógenos y/o de alteración presentes en dicho producto, como por la pérdida de calidad del mismo. Por consiguiente, se estima que a dicha temperatura, que es óptima para el desarrollo de *Salmonella*, la presencia de alguno de estos SLC en productos frescos, podría colaborar con su situación de estabilidad microbiana por cortos tiempos, sin que se aumente considerablemente el riesgo de exposición al patógeno.

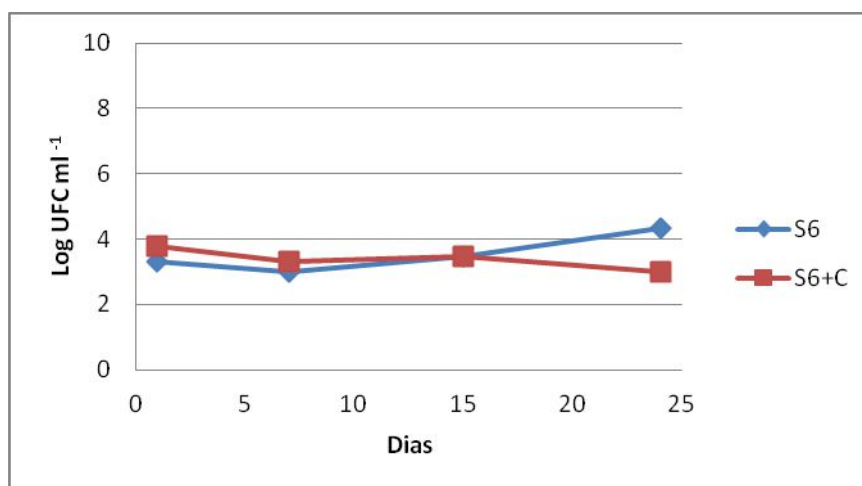
5.7.2. Cinéticas de crecimiento a 6,5°C ± 0,3

En el estudio realizado por Archelasqui (2012) con cepas nativas de *Salmonella* aisladas de pollo, se analizó la influencia de las variables T, pH y a_w en el crecimiento o inhibición de las mismas. En dicho estudio se determinó que hubo serovariedades capaces de desarrollar a T de 5,5°C si los restantes factores del crecimiento microbiano se encontraban en sus condiciones óptimas durante el cultivo. Sin embargo, cuando se realizaron combinaciones de estos factores (pH y a_w) en condiciones extremas, las cepas fueron incapaces de desarrollar inclusive a 7°C.

Sobre esta base, se consideró importante extender los estudios del presente trabajo a la evaluación del crecimiento de estas cepas de *Salmonella* a la temperatura de refrigeración de 6,5°C, con y sin el agregado de diferentes SLC. Además, si se tiene en cuenta la vida útil de los productos aviares, buenos resultados obtenidos en estas condiciones darían mayores referencias para la potencial aplicación de los SLC en los procesos de conservación de los mismos.

En las **Figuras 20** a **27** se pueden observar los resultados obtenidos en los ensayos de determinación de las cinéticas de crecimiento de las cepas S_6 y S_{12} a 6,5°C, durante 24 días, en presencia y ausencia de los SLC “C”, “W”, “Lc” y “E₂₄”.

Fig. 20: *Salmonella S₆* con y sin la adición de SLC “C”.

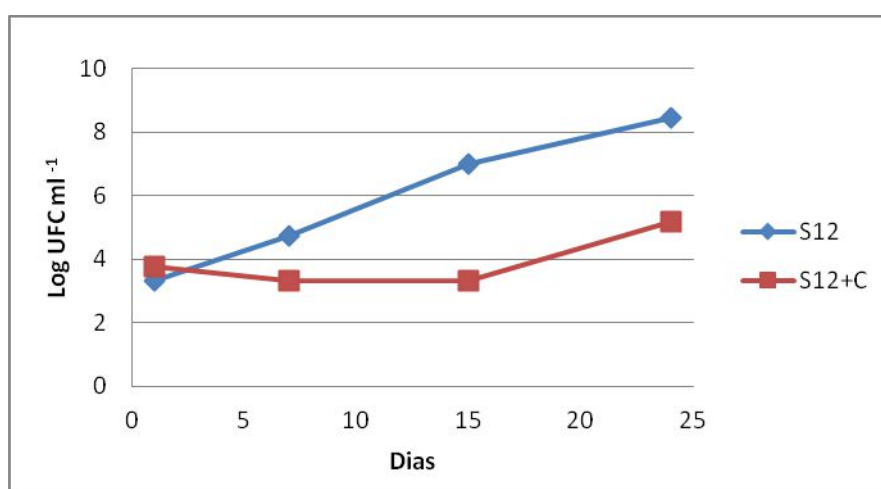


S_6 : *Salmonella Agona* “C”: SLC de *Lactobacillus brevis*

En esta **Fig. 20**, se observa que la cepa S_6 se mantiene estable en los valores de conteo de UFC/ml hasta el día 15, en el que comienza su desarrollo en el medio de cultivo libre del SLC. En cambio, con el agregado del SLC “C” se observó el mismo comportamiento de la cepa hasta el día 15, pero a partir

de allí se produjo una leve disminución de la población de la cepa (de aproximadamente un orden logarítmico), hecho que permite concluir que no se produjo un efecto importante bactericida, pero evidentemente bacteriostático al tiempo ensayado.

Fig. 21: *Salmonella* S_{12} con y sin la adición de SLC "C".

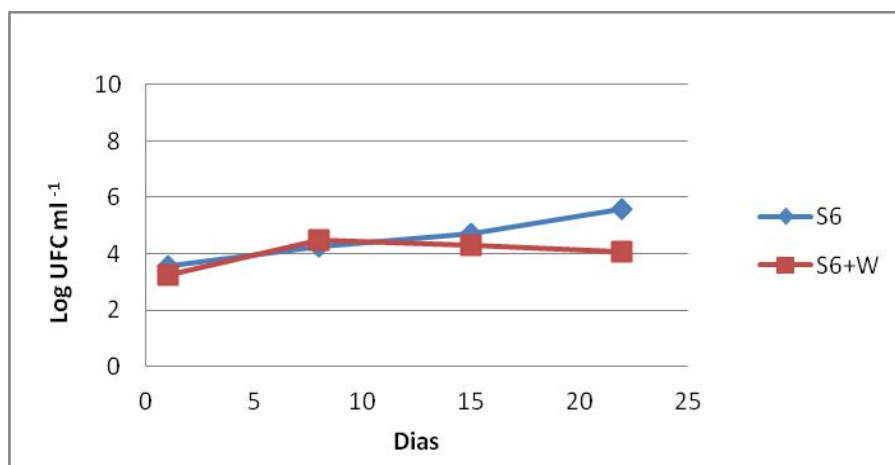


S_{12} : *Salmonella* Newport

"C": SLC de *Lactobacillus brevis*

Según se muestra en la **Fig. 21** la cepa S_{12} presentó un desarrollo característico normal en el medio libre de SLC, y el agregado del SLC "C" produjo un marcado retraso en el inicio del desarrollo de la cepa y hasta el día 15; el recuento final de la población, en este caso, dió un valor considerablemente menor en comparación con el de la cepa sin el agregado del SLC.

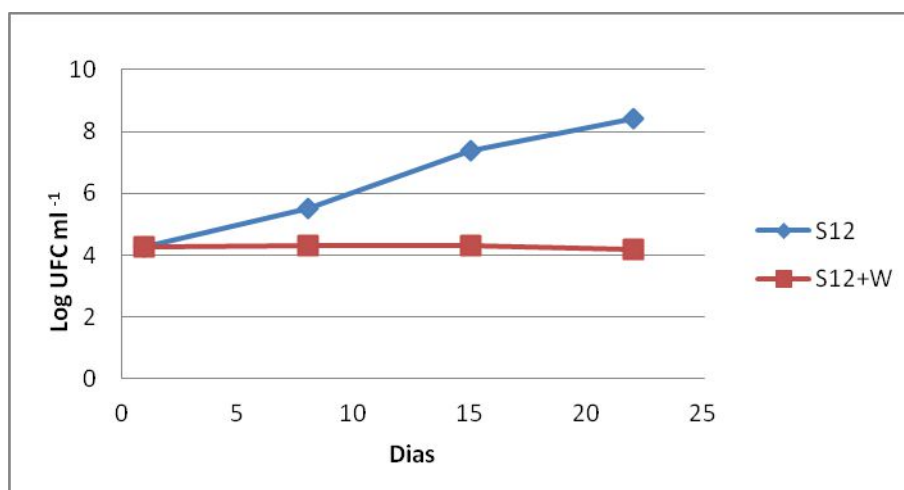
Fig. 22: *Salmonella* S₆ con y sin la adición de SLC “W”.



S₆: *Salmonella agona* “W”: SLC de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

La cepa S₆ presenta, según se observa en la **Fig. 22**, un comportamiento similar al mostrado en la **Fig. 20**, tanto en su cultivo normal como con el agregado del correspondiente SLC.

Fig. 23: *Salmonella* S₁₂ con y sin la adición de SLC “W”.

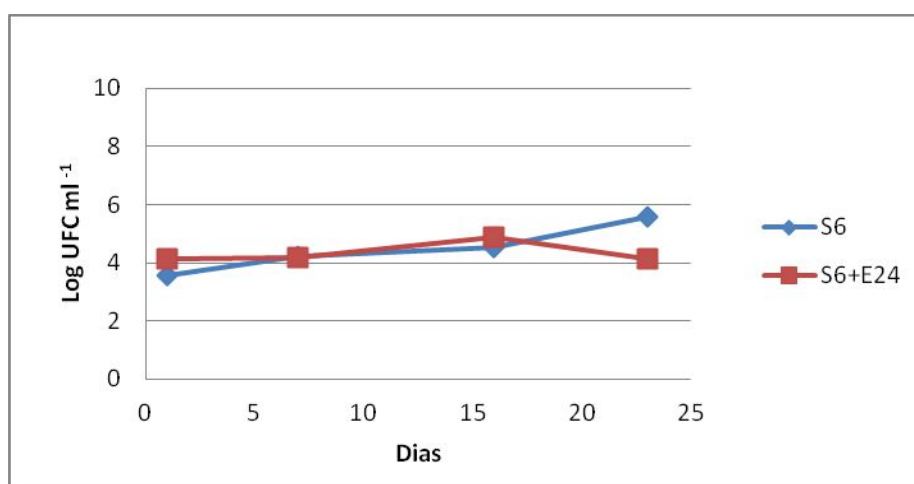


S₁₂: *Salmonella Newport*

“W”: SLC de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

En la **Fig. 23** se aprecia que la cepa S_{12} muestra un crecimiento importante en el medio de cultivo sin el agregado de SLC, e incubado a temperatura de refrigeración durante 24 días. Cuando se adicionó el SLC “W”, no hubo desarrollo de la cepa en todo el tiempo de estudio transcurrido.

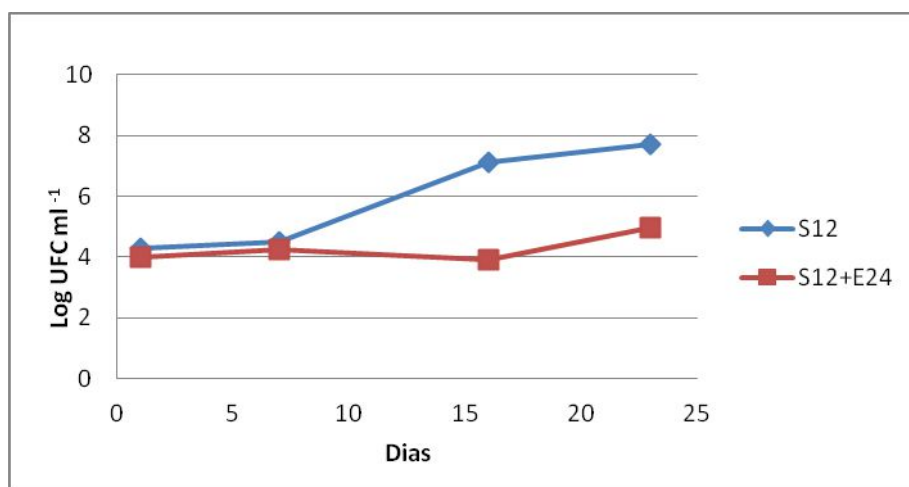
Fig. 24: *Salmonella S₆* con y sin la adición de SLC “E₂₄”.



S_6 : *Salmonella agona* “E₂₄”: SLC de *Enterococcus faecalis* E₂₄

En la **Fig. 24**, se observa que la cepa S_6 presentó un leve crecimiento constante (2 log) en los 24 días de cultivo en el medio sin el agregado de SLC. Con el SLC “E₂₄” adicionado, se obtuvo una leve disminución de la concentración celular final, siendo ésta de poca consideración.

Fig.25: *Salmonella* S₁₂ con y sin la adición de SLC “E₂₄”.

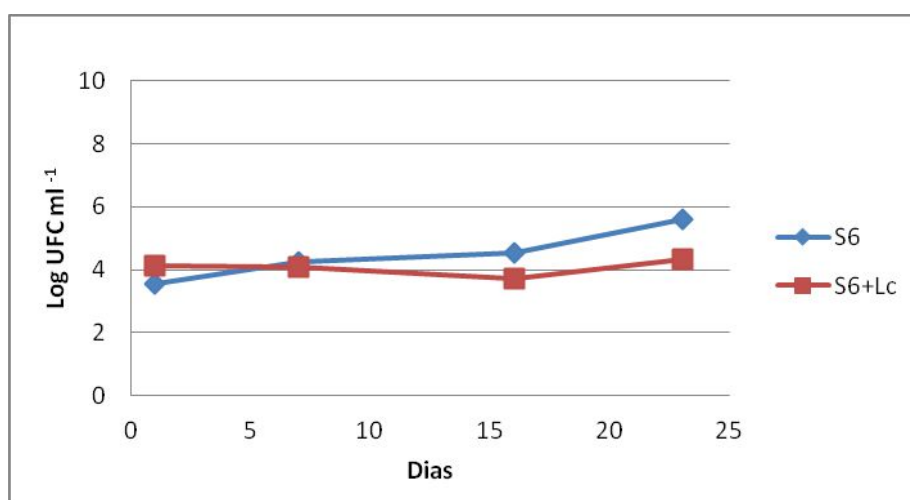


S₁₂: *Salmonella* Newport

“E₂₄”: SLC de *Enterococcus faecalis* E₂₄

La cepa S₁₂ sin el agregado de SLC “E₂₄” presenta en la **Fig. 25** una fase lag cercana a los 7 días. Posteriormente, se registra un crecimiento importante a la temperatura estudiada hasta los 24 días. Cuando se adicionó dicho SLC, tampoco hubo desarrollo pero en este caso se prolongó hasta el día 15, y un leve aumento en la concentración celular, menor a 1 log, se detectó al finalizar el estudio a los 24 días.

Fig. 26: *Salmonella* S₆ con y sin la adición de SLC “Lc”

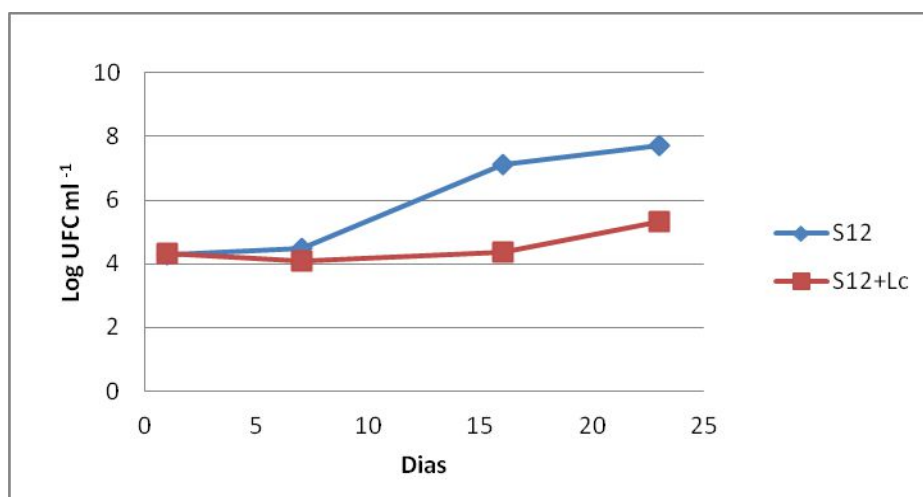


S₆: *Salmonella* Agona

“Lc”: SLC de *Lactobacillus casei*

En la **Fig. 26** se observa una leve disminución en el crecimiento de la cepa con el agregado del SLC “Lc” respecto al presentado en el cultivo de S_6 sin el agregado de dicho sobrenadante. Como en casos anteriores, la cepa S_6 no presentó un desarrollo significativo en ninguna de las condiciones de cultivo con o sin el SLC.

Fig. 27: *Salmonella* S_{12} con y sin la adición de SLC “Lc”.



S_{12} : *Salmonella* Newport

“Lc”: SLC de *Lactobacillus casei*

La **Fig. 27** muestra la evolución de la cepa S_{12} , con un aumento de aprox. 4 log sin el agregado de SLC al medio de cultivo, en el lapso de 24 días, mientras que con el agregado del inhibidor no hubo desarrollo hasta el día 15 y luego se produjo un aumento de sólo 1 log en la concentración celular, en la última etapa del estudio.

Los resultados obtenidos a lo largo de las experiencias realizadas con cepas de *Salmonella* S_6 tanto con como sin el agregado de los diferentes SLC, indican que el cultivo de esta bacteria en todas las situaciones presentó un

lento y escaso desarrollo a la temperatura de 6,5°C, no mayor de 2 log en 24 días. Tampoco se generó, con el agregado de cualquiera de los SLC en estudio, una marcada reducción del número de células al final del período de conservación en refrigeración. Esto permite concluir que no sería justificable la aplicación de los SLC frente a S₆, dado que la baja temperatura actúa por sí misma en el control del patógeno por el tiempo habitual y aún más prolongado de refrigeración de productos avícolas.

Por otra parte, la cepa S₁₂ sí tuvo la posibilidad de crecer adecuadamente en sus condiciones de cultivo habituales libre de inhibidores y a la temperatura de refrigeración en estudio, aumentando su concentración celular en aproximadamente 4 log al cabo de los 24 días de ensayo. Por el agregado de los diferentes SLC, se extendió la fase lag hasta el día 15, y a partir de allí permitió el crecimiento del número de células microbianas. A los 24 días se pudo registrar un leve aumento de la población de aproximadamente log 1 ufc/ml en cada situación. Es importante notar que la adición del SLC "W" a 6,5°C produjo el efecto inhibitorio más importante sobre esta cepa, ya que no pudo multiplicarse en ninguna etapa del estudio.

Los resultados obtenidos al trabajar a 6,5°C demuestran que todos los SLC de las cepas de BAL ensayadas, y en especial el obtenido de una de las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, identificado como "W", constituyen una muy buena alternativa para mejorar la calidad e inocuidad de matrices alimentarias de origen aviar almacenadas bajo refrigeración. Esta aseveración cobra especial importancia si se tiene en cuenta que la cepa inhibida en mayor grado correspondió a *Salmonella* Newport, una de las serovariedades reconocidas como de gran incidencia en brotes de enfermedades transmitidas

por alimentos y por su alta resistencia a los antimicrobianos, cuestión que la convierte en un microorganismo de gran significación para la salud pública y para la comercialización de los productos de la industria avícola.

Por lo tanto, estos resultados son prometedores y estimulan a seguir trabajando en la búsqueda de cepas silvestres de BAL, aisladas del mismo ecosistema involucrado en la producción de aves; cepas que puedan generar compuestos proteicos o péptidos bioactivos que constituyan una herramienta útil en la inocuidad de los productos elaborados por este tipo de industrias, de alto consumo en todo el mundo.

Por su parte, Sriwira and Intarapichet (2007) investigaron los productos antimicrobianos producidos por BAL en su potencial capacidad de extender la vida útil de albóndigas de pollo almacenadas a 4°C durante 21 días. Se estudiaron cinco cepas de bacterias lácticas: *Lactobacillus acidophilus* TISTR1338, *Pediococcus acidilactici* TISTR051, *Pediococcus acidilactici* TISTR424, *Pediococcus acidilactici* TISTR425 y *Lactococcus lactis* TISTR1401. Asimismo, estos autores aislaron dos cepas de bacterias sensibles o blanco de albóndigas preparadas en una cocina doméstica y las identificaron como *Bacillus* spp. (PN2-3) y *Staphylococcus saprophyticus* (PN2-1). Se evaluó la actividad de los sobrenadantes crudos de las BAL sobre las bacterias blanco, utilizando estos SLC para cubrir las albóndigas a través de un baño, y se determinó que el SLC del cultivo de *Lactococcus lactis* TISTR1401 fue el que produjo mayor inhibición sobre ambas cepas blanco. En otra experiencia las muestras se trataron con nisina y los SLC producidos. Éstas fueron envasadas en aire o al vacío y se almacenaron a 4°C durante 21 días. Los resultados indican que las muestras, ya sea las tratadas con nisina como las ensayadas

con los diferentes SLC, presentaron recuentos menores a las control (alrededor de 1,5 log), en ambos tipos de envases. A su vez, las muestras tratadas envasadas al vacío mostraron conteos menores que las envasadas aeróbicamente (≤ 1.2 log). Estos resultados indican que el SLC del *L. lactis* TISTR1401 podría ser usado en combinación con envasado al vacío para extender la vida útil de productos de pollo.

Si se comparan los resultados informados por Sriwira and Intarapichet (2007) con los obtenidos por los estudios experimentales de esta Tesis, se puede observar que el uso de todos los SLC estudiados, y en particular el SLC “W”, en combinación con almacenamiento en frío, produjo una mayor reducción en el número de células blanco (aproximadamente 4 log) que la obtenida por aquellos autores en productos alimenticios bajo condiciones similares.

Vásquez *et al.* (2009a) evaluaron la extensión de vida útil de la carne de res fresca aplicando distintos tratamientos. Filetes de costilla (*longissimus dorsi*) fueron almacenados durante 12 días a 3°C y se trataron con: a) extracto crudo de bacteriocinas producidas por la cepa nativa de *Lactobacillus plantarum* LPBM10; b) con ácido láctico ajustado a pH 5.74; y c) con agua destilada estéril como tratamiento control. Las muestras se evaluaron por medio de análisis microbiológicos y por determinaciones de pH, textura, pérdida de peso y sensoriales. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para microorganismos psicrotrofos y coliformes fecales, dando mejor resultado el tratamiento con extracto crudo de bacteriocinas, que tuvo efecto germicida.

Por su parte, Nieto-Lozano *et al.* (2006) evaluaron el efecto inhibitor de la bacteriocina producida por una cepa de *Pediococcus acidilactici* contra

Listeria monocytogenes y *Clostridium perfringens* en la superficie de carne cruda. Las muestras fueron tratadas con la bacteriocina e inoculadas con cada una de las bacterias patógenas. El tratamiento se realizó con la bacteriocina en distintas concentraciones y las muestras se almacenaron a 15 °C durante 72 h. En esta situación se redujo el recuento de *L. monocytogenes* en 1, 2 y 3 ciclos log al finalizar el tiempo de estudio. Para las muestras almacenadas a 4 °C durante 21 días se obtuvo una reducción de 2,5 ó 3,5 ciclos log en las muestras tratadas con las mayores concentraciones de bacteriocina. Por el contrario, con la cepa de *C. perfringens* se observó un efecto solamente bacteriostático.

5.8. Análisis sensorial

Se eligió la cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* identificada como “W” en la **Tabla 2** para la producción del SLC utilizado en el análisis sensorial de supremas de pollo tratadas con el mismo. Esta bacteria fue seleccionada en base a sus excelentes propiedades inhibitorias en contra de cepas de *Salmonella* a temperatura de refrigeración.

Se ensayaron diferentes concentraciones del SLC tales como: 1/10 (SC₃), 1/5 (SC₂), 1/2.5 (SC₁) y sin concentrar (SC₀).

5.8.1. Evaluación del color:

En el día cero, es decir inmediatamente después de hechos los tratamientos de rociado, el 66 % de los panelistas observaron que las muestras tratadas con el SLC “W”, en todas las concentraciones ensayadas, presentaban una tonalidad amarillenta. Además, se determinó que son más notables las diferencias de color de las muestras rociadas con la concentración 1/10 (SC₃) que con el resto

de las concentraciones del estudio, si se comparan las muestras tratadas con las muestras utilizadas como control, rociadas sólo con agua de red. Al cuarto día de conservación a 4°C no se encontraron diferencias significativas entre las muestras control y las tratadas con diferentes concentraciones del SLC. Se trabajó con una escala de 5 puntos, desde muy claro a muy oscuro, dando los valores medios ponderados (\bar{x}_p) entre 2,5 y 3, lo que equivale a una intensidad media, tanto para las control como para las tratadas.

5.8.2. Evaluación del olor:

Al inicio del ensayo, el 83 % de los panelistas reportaron la existencia de olores más intensos en las muestras tratadas con el SLC en sus distintas concentraciones (**Fig. 28**, **Fig. 29** y **Fig. 30**). De ellos, el 50% los consideró mucho más intensos que el de las muestras no tratadas.

Fig. 28: Evaluación del olor por parte de una integrante del panel de evaluadores



Fig. 29: Porciones de pollo rociadas con las distintas concentraciones del SLC "W"



Al cuarto día, según la metodología de ordenamiento-ranking (ASTM, 1968), no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las muestras control (rociadas con agua de red). En cambio, en las muestras con tratamiento se encontró que el olor de las muestras tratadas con el SLC en la concentración SC_0 (sin concentrar) y en la SC_3 (1/10) diferían significativamente de las tratadas con la concentración intermedia SC_2 al nivel $\alpha \leq 0,01$. De esta manera se confirmó que la muestra tratada con SC_0 es la que presentaba menos olor, la rociada con SC_3 la mayor intensidad de olor, y las muestras rociadas con SC_1 y SC_2 (1/2.5 y 1/5 respectivamente) mostraban intensidades intermedias.

Fig. 30: Comparación de muestras de porciones de canales de pollo rociadas con diferentes concentraciones del SLC "W".



Para esta evaluación también se trabajó con una escala de 5 puntos, que en este caso era desde muy suave a muy fuerte. El 83 % de los panelistas dijo que el olor de las muestras control era muy suave, y entre un 50 y un 75 % del panel informó que las muestras tratadas presentaban olores desde muy suaves a de intensidad media, considerando los valores medios ponderados (\bar{x}_p) entre 1,33 y 3,33.

El grado de intensidad del aroma de las muestras tratadas con el SLC está dado por el olor propio de las porciones de pollo más el aroma correspondiente al SLC en sus distintas concentraciones. Dado que el panel de evaluadores consideró que las porciones de canales de pollo, tanto las blanco como las muestras tratadas con SLC, no presentaban aromas desagradables al finalizar el tiempo de almacenamiento (4 días a 4°C), se puede concluir que las muestras tratadas resultaron de calidad aceptable.

Vásquez *et al.* (2009a), en su investigación sobre filetes de carne tratados con: a) extracto crudo de bacteriocinas producidas por la cepa nativa de *Lactobacillus plantarum* LPBM10; b) con ácido láctico ajustado a pH 5.74; y c) con agua destilada estéril como tratamiento control, durante un período de almacenamiento de 12 días, informaron que los cambios que dieron los mejores puntajes de la evaluación sensorial fueron para los atributos de apariencia, color y aroma en los primeros días. También informaron que a medida que avanzaba el tiempo de almacenamiento los valores de los atributos evaluados disminuían el valor de aceptación. Los filetes de carne tratados con ácido láctico tuvieron mejor aceptación en apariencia y color, pero obtuvieron los menores puntajes en aroma desde el día 10. En cambio en las muestras tratadas con extracto crudo, el límite máximo de aceptabilidad se ubicó en el día 12.

Ogunbanwo and Okanlawon (2006) estudiaron la inmovilización en una película comestible de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus brevis* OG1 y la influencia de su aplicación en el aspecto sensorial y en la inocuidad de productos de pollo almacenados a 4°C por 21 días. Esta metodología fue efectiva en la reducción de la carga microbiológica, comparando con muestras sin tratar.

La densidad celular en las muestras estudiadas por estos investigadores fue ≥ 8 log al final del tiempo de refrigeración, cuando se estudiaron sin tratamiento o con alginato, mientras que en las muestras tratadas con alginato-bacteriocina, este valor fue < 6 log. En cuanto a los atributos sensoriales - aspecto y olor, las muestras tratadas con alginato-bacteriocina fueron completamente aceptables. Estos resultados indican que la inmovilización de la

bacteriocina en una película comestible podría extender la vida útil del pollo refrigerado hasta 14 días sin que se vea afectado su olor característico a fresco y su aspecto general, e incrementar su inocuidad para consumo humano.

En esta Tesis, los resultados logrados por la aplicación directa de rociado de un SLC en porciones de pollo indicaron que se produjeron cambios sensoriales en las muestras, pero no fueron lo suficientemente significativos como para generar rechazo en los participantes del panel de evaluadores.

6. CONCLUSIONES

El uso del SLC "W" a 6,5°C, produjo un efecto inhibitorio total sobre una de las cepas de *Salmonella* evaluadas (S_{12}), ya que se determinó que ésta no pudo desarrollarse en ningún momento del estudio. Dicho resultado es sumamente interesante dado que se trata de *Salmonella* Newport, la cual es una serovariedad de esta bacteria de gran significado en salud pública por sus características de gran resistencia a antimicrobianos, y varios países regulan como decomisible los productos cárnicos en los que se encuentra presente, más que por la frecuencia de aparición. Y la otra cepa estudiada, *S. Agona*, en cambio, está muy presente en brotes.

Con la cepa S_6 (*Salmonella* Agona) dicho proceso de inhibición fue considerablemente menor. En el caso de esta cepa sólo se comprobó por una ligera extensión de su fase lag y una reducción de hasta 2 log de la concentración inicial de células en el transcurso de 20 días de refrigeración.

Estos resultados experimentales nos indican que la combinación Temperatura + SLC puede ser un proceso adecuado de control de *Salmonella* para productos refrigerados, pero ello dependerá de la cepa en cuestión, hecho que podría dificultar la efectividad de su uso. A pesar de ello, debe tenerse en cuenta que los resultados obtenidos abren un camino interesante para explorar por medio de futuras investigaciones.

El uso de la nisina, que actualmente está aprobado en varios países del mundo (USA, UE, etc) en una amplia variedad de productos alimenticios, desafortunadamente tiene la desventaja de la elevada dosis necesaria para obtener el efecto antimicrobiano deseado. Este depende, además, de varios

factores tales como el proceso y las condiciones de almacenamiento, las materias primas utilizadas, la carga bacteriana y la formulación del producto, y también del costo relativamente alto de su aplicación. Por consiguiente, su uso es limitativo económicamente, en especial para los productos del mercado de menor valor agregado. Además, la nisina tiene muy escasa o nula actividad contra las bacterias Gram (-), a menos que previamente se las someta a tratamientos físico-químicos que alteren su pared celular y permitan el ingreso de esta bacteriocina, para ponerse en contacto con la membrana celular y ejercer allí su acción.

Si nos referimos a los SLC producidos por BAL, seguramente los costos de su producción y posterior utilización son inferiores a los correspondientes a la nisina, pero se debe tener presente que la cantidad de sobrenadante necesaria para el duchado de canales en una planta de procesamiento es muy elevada, y los cuidados necesarios para su mantenimiento en esterilidad y frío, costosos.

Sin embargo, se ha demostrado (Simonetta *et al.*, datos no publicados) que se pueden producir SLC de BAL con buena actividad antibacteriana utilizando suero de quesería como medio de cultivo. Siendo éste un desecho de la industria quesera, carente casi por completo de valor económico, su utilización permitiría reducir notablemente los costos de producción de los SLC. Además, también se ha demostrado que los SLC que contienen bacteriocinas termorresistentes (que son las de mayor interés para la industria alimentaria) pueden ser sometidos a tratamientos de liofilización y de secado spray sin que se pierda su actividad inhibitoria, lo cual minimizaría las complicaciones inherentes al transporte y

almacenamiento, ya que se podría prescindir de la refrigeración y de los grandes volúmenes de SLC líquidos.

La apropiada capacitación de manipuladores para su aplicación también implica gastos a considerar, los cuales de hecho no se pueden eludir.

A todo lo detallado previamente debe agregarse el hecho de que, para utilizar bacteriocinas puras en biopreservación alimentaria, debe lograrse la aprobación de su uso como antimicrobiano en alimentos por parte de los organismos nacionales o internacionales de regulación (FDA, ANMAT, etc.), y hasta ahora, el único aditivo con las características mencionadas que ha sido aceptado por dichos organismos regulatorios es la nisina producida por cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Sin embargo, los SLC de BAL no son considerados como aditivos, sino como ingredientes alimentarios, y éstos no están sometidos a las aprobaciones y regulaciones de los organismos estatales de control. Tratándose además de SLC obtenidos de cultivos de bacterias que ostentan el grado de GRAS, también ellos son considerados como tales, y no necesitan de ninguna autorización especial que habilite su incorporación a distintas matrices alimentarias.

De lo expuesto se deduce que, si bien las bacteriocinas puras son más efectivas que los SLC de BAL, la utilización de los mismos puede resultar más económica y evitar los largos y costosos trámites legales que implica la autorización de un aditivo alimentario.

La producción del SLC "W" fue realizada a partir de una cepa silvestre de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, lo cual permite inferir que su SLC podría contener

nisina. Sin embargo, la actividad directa de este SLC frente a las bacterias Gram (-) demuestra que en él debe estar presente otra sustancia antimicrobiana, dado que la nisina no es activa por sí misma frente a este tipo de bacterias. Este hecho, sumado a los resultados obtenidos en la caracterización enzimática del SLC, permite concluir que esa otra sustancia es de naturaleza proteica o peptídica, lo que sugiere la presencia de otra bacteriocina en su composición, acompañada o no por nisina.

Cabe acotar además que el SLC "W" fue el sobrenadante que ha presentado las mejores características inhibitorias frente a los distintos microorganismos blanco a los que fue enfrentado, tanto Gram (+) como Gram (-), por lo que no sólo podría ser útil para el control de *Salmonella* sino también para el control de otras especies bacteriana alterantes de alimentos o causantes de ETA.

Además de las características inhibitorias de los SLC sobre cepas de interés para la salud del hombre, otra propiedad a destacar de los mismos es que cuando fueron aplicados a porciones de pollo no produjeron cambios significativos a nivel sensorial, en las características de olor y color. Esto permite afirmar que el público consumidor aceptaría, o por lo menos no cuestionaría su aplicación como agentes de biopreservación. Todo lo anteriormente expuesto permite finalmente concluir que los resultados experimentales logrados son alentadores y constituyen un avance en una temática hasta ahora muy poca explorada, como lo es la de la biopreservación de alimentos de origen aviar.

Es posible por lo tanto afirmar que el proceso en la investigación de estos temas resultará en una nueva generación de conservantes y aditivos alimentarios, que podrán proveer en un futuro cercano una alternativa segura y económica a las existentes en el panorama actual.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abee, T., Krockel, L. and Hill, C. (1995). Bacteriocins: Modes of Action and Potentials in Food Preservation and Control of Food Poisoning in. *Int. J. Food Microbiol.*, **28**: 169-185.

Adams, M. R. and Nicolaidis, L. (2008). Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control*, **8**: 227–239.

Akhtar, M. S., Imran, M. B., Nadeem, M. A., and Shahid, A. (2012). Antimicrobial peptides as infection imaging agents: better than radiolabeled antibiotics. *Int. J. of Peptides*, 1-19.

Allison, G. E. and Klaenhammer, T. R (1996). Functional analysis of the gene encoding immunity to lactacin F, *lafI*, and its use as a *Lactobacillus*-specific, food-grade genetic marker. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 4450-4460.

Álvarez-Ordoñez, A., Fernandez, A., Bernardo, A. and López, M. (2010a). Acid tolerance in *Salmonella Typhimurium* induced by culturing in the presence of organic acids at different growth temperatures. *Food Microbiol*, **27**: 44-49, 0740-0020.

Álvarez-Ordoñez, A., Fernandez, A., Bernardo, A. and López, M. (2010b). Arginine and lysine decarboxylases and the Acid Tolerance Response of *Salmonella Typhimurium*. *Int. J. of Food Microbiol.*, **136**: 278-282, 0168-1605

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. and Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1 Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, **17**: 454-461.

Anónimo (2009). Ministerio de Agricultura y Ganadería, Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud, Ministerio de Salud. Prevalencia de *Salmonella* spp. en carnes frescas y subproductos de pollo. (Informe técnico, Costa Rica, 2011).

Anukam, K. C., Osazuwa, E. O., Osadolor, H. B., Bruce, A. B. and Reid, G. (2008). Yogurt Containing Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. reuteri* RC-14 Helps Resolve Moderate Diarrhea and Increases CD4 Count in HIV/AIDS Patients. *J Clin. Gastroenterol*, **42**: 239–243.

Archelasqui, R., Jiménez, S., y Pirovani, M. E. (2012). Estudio del efecto de aw, pH y temperatura en el crecimiento de cepas autóctonas de *Salmonella* aisladas de pollo. Congreso Latino Americano de Ciencias Aplicadas a la Industria CLICAP, San Rafael, Mendoza.

ASTM (1968). Manual on Sensory Testing Methods *Special Technical Publication 434*, Philadelphia 19103. ISBN 0-8031-0018-3.

Audisio, M. C. and Apella, M. C. (2006). Bacteriocin production by *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* CRL1384 with anti-*Listeria* and anti-*Salmonella* effects. *Res. J. Microbiol.*, **1**: 61-69.

Aymerich, T., Martin, B., Garriga, M., Vidal-Corou, M. C., Bover-Cid, S. and Hugas, M. (2006). Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.*, **100**: 40-49.

Axelsson, L. T., Chung, T. C., Dobrogosz, W. J. and Lingren, S. E. (1989). Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease*, **2**: 131–136.

Axelsson, L. T. (1993). "Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology" En: Salminen, S., Von Wright, A. (Eds.) "Lactic Acid Bacteria". Marcel Dekker, inc. New York.

Axelsson, L. (2002) Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: *Lactic Acid Bacteria*. Eds. Salminen, S. & von Wright, A. Marcel Dekker, Inc. New York. USA, : 1-63.

Barefoot, S. F. and Klaenhammer, T. R. (1984). Purification and characterization of *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **26**: 328-334.

Belfiore, C., Castellano, P. and Vignolo, G. (2007). Reduction of *Escherichia coli* population following treatment with bacteriocins from lactic acid bacteria and chelators. *Food Microbiol.*, **24**: 223–229.

Bernadeau, M., Dousset, X., Metivier, A., Sorokine, O., Anglade, P., Boyaval, P. and Marison D. (2008). Purification and amino acid sequences of piscicocins VIa y VIb, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* VI that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 4410-4416.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9^{ne} edition. (1984). Sección 12: 999-1103 y Sección 14: 1208-1260.

Bhunja, A. K., Johnson, M. C., Ray, B. and Kalchayanad, N. (1991). Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.*, **70**: 25-33.

Bolder, N. M., (1997). Decontamination of meat and poultry carcasses. *Trends in Food. Sci.& Technol.*, **8**: 221-226.

Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I. B., Prajapati, J. B., Seto, Y., Schure, E. T., Boven, A. V., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijelaars, S. and Hansen, H. B. (2012). Erratum to "Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use". *Int. J. of Food Microbiol.*, **154**: 87–97.

Broadbent, J. R., Chou, Y. C., Gillies, K. and Kondo, J. K. (1989). Nisin inhibits several gram-positive, mastitis-causing pathogens. *Dairy Sci.*, **72**: 3342-3345.

Brötz, H. and Sahl, H. (2000). New insights into the mechanism of action of lantibiotics diverse biological effects by binding to the same molecular target. *J. Antimicrob. Chemother.*, **46** (1): 1-6. doi: 10.1093/jac/46.1.1

Buchanan, R. L., Stahl, H. G. and Whiting, R. C. (1989). Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. of Food Prot.*, **52** (12): 844-851.

Buchanan, R. L., Smith, J. L., McColgan, C., Marmer, B. S., Golden, M. and Dell, B. (1993). Response surface models for the effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the aerobic and anaerobic growth of *Staphylococcus aureus* 196E. *J. of Food Safety*, **13**: 159-175.

Caffer, M. I., Alcain, A., Pangópulo, M. y Terragno, R. (2007). Evolución de la salmonelosis en Argentina, en el período 2004 - 2006. En: XI Congreso Argentino de Microbiología, organizado por la Asociación Argentina de Microbiología, Córdoba, Argentina. Comunicación Oral N° 7-20320.

Carminati, D., Giraffa, G. and Bossi, M. (1989). Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, **52**: 614-617.

Carr, F. J, Chill, D. and Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.*, **28**(4): 281-370.

Carrasco, M. S., Scarinci, H. E. and Simonetta, A. C. (2002). Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Argentinian dairy products. *The Australian J. of Dairy Techonol.*, **57** (1): 15-19.

CEPA (Centro de Empresas procesadoras Avícolas). (2013) doi:http://www.aviculturaargentina.com.ar/evolucion_avicultura.htm. Fecha de consulta: 05/2013.

CEPA (2014). Doi: www.aviculturaargentina.com.ar/estadisticas.php. Doi:www.aviculturaargentina.com.ar/institucional.php?s=evolucion_de_la_avicultura.

Chen, X., Tian, F., Liu, X., Zhao, J., Zhang, H. P., Zhang, H. and Chen, W. (2010). In vitro screening of lactobacilli with antagonistic activity against *Helicobacter pylori* from traditionally fermented foods. *J. of Dairy Sci.*, **93**: 5627-5634.

Cleveland, J., Monteville, I. J., Nes, I. F. and Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. of Food Microbiol.*, **71**:1-2.

Coallier-Ascah, J. and Idziak, E. S. (1985). Interaction between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus flavus* on production of aflatoxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**: 163-167.

Comisión del Codex Alimentarius. (2005). Código de Prácticas de Higiene para la Carne (CAC/RCP 58). Vol. 10. Disponible en: www.codexalimentarius.net/download/standards/.../CXP_058s.pdf

Comisión del Codex Alimentarius (2009). Programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Informe de la Cuadragésima Primera reunión del Comité del Codex sobre Higiene de los Alimentos, San Diego, Estados Unidos de América. ALINORM 10/33/13.

Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.*, **46**: 269-280.

Daeschel, M. A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as preservatives. *Food Technol.*, **43**: 164-167.

Dahl, T. A., Midden, W. R. and Hartam, P. E. (1989). Comparison of killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *J. Bacteriol.*, **171**: 2188-2194.

De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. (eds.). (1994). Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, genetics and applications. *Blackie Academic & Professional, London*.

Dimitrellou, D., Kandyli, P., Sidira, M., Koutinas, M. and Kourkoutas, Y. (2014). Free and immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 393 on whey protein as estarter cultures for probiotic Feta-type cheese production. *J. of Dairy Sci.*, **97**: 4675–4685.

Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L., and Prévost, H. (2006). The Continuing Story of Class II_a Bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70** (2): 564-582.

EFSA (European Food Safety Authority). (2009). The community summary report on food-borne outbreaks in the European Union in 2007. *The EFSA Journal* 271.

EFSA, (2015). Scientific Report of EFSA and ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, zoonotic Agents and food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 13, 1, 3991, 4-6.

Elegado, F. B., Guerra, M. A. R. V., Macayan, R. A., Mendoza, H. A. and Lizaran, M. B. (2004). Spectrum of bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* BS and fingerprinting by RAPD-PCR. *Int. J. Food Microbiol.*, **95**: 11-18.

Elliker, P. R., Sandine, W. E., Hauser, B. A. and Moseley, W. K. (1964). Influence of culturing cottage cheese dressing with different organisms on flavour and keeping quality. *J. Dairy Sci.*, **47**: 680.

Ennahar, S., Sonomoto, K and Ishizaki, A. (1999). Class IIa Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Antibacterial Activity and Food Preservation. *J. of Biosci. and Bioengi.*, **87**(6): 705-716.

FAO/WHO (2002). Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens. *FAO/WHO Microbiological Risk Assessments Series*, N°2, 300 p. ISBN 92 9 156229 3 (WHO). ISBN 92 5 104872 X (FAO).

FAO/WHO (2010). Programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios. Disponible en: ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/CCFA/CCFA42/fa42_05bs.pdf

FAO/WHO (2011). *Joint FAO/WHO. Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission*. Thirty-fourth Session Geneva, Switzerland, 4-9 July 2011.

FAO/WHO, JECFA (2007). Monographs 4. Compendium of Food Additive specifications. Pag.53. ISBN 978-92-5-105866-4.

FAO/WHO, JECFA. (2011). WHO Food Additives Series: 64. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. ISBN 978-924-166064-8 (pag.543). Aliphatic Acyclic and Alicyclic α -diketones and related α -hydroxyketones (pag.87).

Faura, C. y Angulo, L. (2008). Cap. 1: “Un patógeno con historia” en *La salmonella, de actualidad desde siempre*. Extraído el 19/05/2011 desde <http://www.avicultura.com/salmonella/salmonella-en-avicultura-capitulo1.pdf>.

Fernández, A., Horn, N., Gasson, M. J., Dodd, H. M. and Rodríguez, J. M. (2004). High-level coproduction of the bacteriocins nisin A and lactococcin A by *Lactococcus lactis*. *J. of Dairy Research*, **71**, 216-221.

Gaaloul, N., Braiek, O., Hani, K., Volski, A., Chikindas, M. L. and Ghrairi, T. (2015). Isolation and characterization of large spectrum and multiple bacteriocin-producing *Enterococcus faecium*s rain from raw bovine milk. *J. of Appl. Microbiol.*, **118** (2): 343-355.

Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L. and Omar, N. B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. of Food Microbiol.*, **120**: 51-70.

Gaggia, F., Di Gioia, D., Baffoni, L. and Biavatl, B. (2010). The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact on food safety. *Trends in Food Sci. and Technol.*, **22**: S58–S66.

García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A. and Martínez, B. (2010). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Sci. and Technol.*, **21**: 373-382.

Gatti, M., Bottari, B., Lazzi, C., Neviani, E. and Mucchetti, G. (2014). Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. Invited review. *J. of Dairy Sci.*, **97**: 573-591.

Gilliland, S. E. and Speck, M. L. (1975). Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactobacilli and pediococci in non-fermented refrigerated foods. *J. Food Sci.*, **40**: 446-450.

González-Martínez B. E., Gomez Treviño, M. y Jiménez-Salas, S. (2003). Bacteriocinas de probióticos. *Rev. de Salud Pública y Nutrición*, **4**(2): 1-8.

Grande Burgos, M. J., Lucas, R., Lopez Aguayo, M. C. y Pérez Pulido, R. (2011). Bioconservación de Alimentos Cárnicos, **24** (1): 111-123. Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental. Disponible en: [file:///C:/Users/User/Downloads/Dialnet Bioconservación De Alimentos Cárnicos-4247301.pdf](file:///C:/Users/User/Downloads/Dialnet%20Bioconservación%20De%20Alimentos%20Cárnicos-4247301.pdf)

Gutierrez Ramirez, L. A., Montoya Campuzano, O. I. y Ruiz Villadiego, O. S. (2005). Evaluación del potencial bactericida de los extractos de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento *in vitro* de *E. coli*, *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes*. *Revista CENIC Ciencias Biológica*, **36**. ISSN: 0253-5688. Ed. CENIC. Cuba

Haugaard, N. (1968). Cellular mechanisms of oxygen toxicity. *Physiol. Rev.*, **48** (11): 311-373.

Heckly, R. J. (1978). Preservation of Microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.*, **24**: 1-53.

Hernández Cruza P. (2008). Bacterias Lácticas productoras de bacteriocinas Dpto de Bromatología y Nutrición III. Fac. de Veterinaria. Universidad Complutense. Madrid, España. Disponible en: http://pendientedemigracion.ucm.es/info/otri/complutecno/fichas/tec_phernandez2.htm.

Herrero-Sanchez, M. E. (2013). Evaluación de bacteriófagos y bacteriocinas para la eliminación de *Listeria monocytogenes*. Tesis de Maestría en Biotecnología Alimentaria. Universidad de Oviedo. España. Disponible: [http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/18225/6/TFM Maria%20Esther%20Herrero%20Sanchez.pdf](http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/18225/6/TFM%20Maria%20Esther%20Herrero%20Sanchez.pdf).

Hildeng-Hauge, H., Mantzilas, D., Moll, G. N., Konings, W. N., Driessen, A. J. M., Eijsink, V. C. H. and Nissen-Meyer, J. (1998). Plantaricin A is an amphiphilic α -helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial activities through different mechanisms. *Biochemistry*, **37**:16026-16032.

Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria for the Biopreservation meat and meat Products. *Meat Science*, **40** (1): 150-139.

Hughenoltz, J. (1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **12** (1-3): 165-178.

Hurst, A. (1981). Nisin. : 85-123. En: *Advances in Applied Microbiology*. Perlman, D. and Laskin, A. I. (eds.). Academic Press, Inc. New York.

ICMSF (International Commission of Microbiological Specifications for Foods) (1980). *Ecología microbiana de los alimentos 1. Factores que afectan a*

la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. Ed. Acribia. Cap. 7 Ácidos orgánicos. 132-141.

ICMSF (International Commission of Microbiological Specifications for Foods) (1996) *Microorganisms in foods. 5. Salmonella*. (1st.ed), Chapman & Hall, London, UK.

Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, **59**: 171-200.

James, C. Goksoy, E. O., Corry, J. E. L. and James, S. J. (2000). Surface pasteurization of poultry meat using steam at atmospheric pressure. *J. of Food Engineering*, **45**: 111-117

James, R., Penfold, C. N., Moore, G. and Rand Kleanthous, C. (2002). Killing of *E. coli* cells by E group nuclease colicins. *Biochimie.*, **84**: 381-89.

Jay, J. M. (1982a). Effect of diacetyl on foodborne microorganisms. *J. Food Sci.*, **47**: 1831-1836.

Jay, J. M. (1982b). Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**: 525-532.

Jiménez, S. M., Salsi, M. S., Tiburzi, M. C. and Pirovani, M. E. (2002). A comparison between broiler chicken carcasses with and without visible faecal contamination during the slaughtering process on hazard identification of *Salmonella* spp. *J Appl. Microbiol.*, **93**: 593–598.

Jiménez, S. M., Caliusco, M. F., Tiburzi, M. C., Salsi, M. S. and Pirovani, M. E. (2007). Predictive models for reduction of *Salmonella* Hadar on chicken skin during single and double sequential spraying treatments with acetic acid. *J. of Appl. Bacteriol.*, **103**: 528-535.

Jiménez, S. M. (2008). *Salmonella* en aves, Argentina. Reporte en Reunión Técnica Internacional FAO/OMS sobre Evaluación de Riesgos Microbiológicos en Alimentos. Bogotá, Colombia, del 1 al 3/10/08.

Jiménez, S. M., Tiburzi, M. C., Salsi, M. S., Moguilevsky, M. A. and Pirovani, M. E. (2009). Survival of *Salmonella* on refrigerated chicken carcasses and subsequent transfer to cutting board. *Letters in Appl. Microbiol.*, **48**: 687-691. Blackwell Science LTD, UK. ISSN 0266 8254.

Jimenez, S. M., Archelasqui, R., Salsi, M. S., Tiburzi, M. C., Moguilevsky, M. A., and Pirovani, M. E. (2015). Assessment of fate of Argentinean *Salmonella* serotypes studied under different conditions of growing factors. *J. of Virology and Microbiol.*, IBIMA Publishing. ISSN 2326 7011. ID 985090. EnPrensa.

Juneja, V. K. (2007). Thermal inactivation of *Salmonella* spp. in ground chicken breast or thigh meat. *Int. J. of Food Sci. and Technol.*, **42**: 1443–1448.

Keener, K. M., Bashor, M. P., Curtis, P. A., Sheldon, B. W. and Kathariou, S. (2004). Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. *Compr. R. Food. Sci. Saf.* **3**: 105–116.

Kim, K. Y., Frank, J. F. and Craven, S. E. (1996). Attachment of *Salmonella* on modified Poultry skin surface. *J. of Food Sci.*, **61** (2): 442-448.

Kim, J. Y, Young, J. A., Gunther, N. W., and Lee, J. (2015). Inhibition of *Salmonella* by bacteriocin-producing lactic acid bacteria derived from U.S. kimchi and broiler chicken. *J. of Food Safety*, **35** (1): 1-12.

Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, **70**: 337-349.

Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Meaney, W. J., Ross, R. P. and Hill, C. (2010). Efficacy of a teat dip containing the bacteriocin lacticin 3147 to eliminate Gram-positive pathogens associated with bovine mastitis. *J. of Dairy Research*, **77**: 231-238

Konings, W. R. and Otto, R. (1983). Energy transduction and solute transport in streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J.*, **49** (3): 247-257.

Lauková, A., Marekova, M. and Javorsky, P. (1993) Detection and antimicrobial spectrum of a bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM4231. *Lett. Appl. Microbiol.*, **1**: 257–260.

Lee, J., Joo, Y., Park, C., Kim, S. H., Hwang, I. K., Ahn, J. S. and Mheen, T. I. (1999). Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* -559 Isolated from Kimchi. *J. of Bioscience and Bioengineering*, **88** (2): 153-159.

Leistner, L. (1992). Food preservation by combined methods. *Food Res. Int.*, **25**: 151-158.

Li, Y., Slavik, M., Walker, J. and Xlong, H. (1997). Pre-chill spray of chicken carcasses to reduce *Salmonella thyphirimurium*. *J. of Food Sci.*, **62** (3): 605-607.

Lloyd, A. G. and Drake, J. J. (1975). Problems posed by essential food preservatives. *Br. Med. Bull.*, **31** (3): 214-219.

López, J. E., Ochoa, Z. A., Anaya, L. J. L., Martinez, T. M., y Medina, M. E. (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revi. Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, **39** (3): 49 57

Magnusson, J. and Schnurer, J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **67**: 1–5.

Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J. and Schnürer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Letters*, **219**: 129-135.

Maldonado, R. y Llanca, L. (2007). Efecto de la incorporación de nisina sobre la supervisión de *Staphylococcus aureus* en queso de mano. *Rev. Fac. Agron.*, **33**:147- 163.

Malik, R. K., Kumar, N., Nageswara Rao, K. and Mathur, D. K. (1994). Bacteriocins antibacterial proteins of lactic acid bacteria: a review. *Microbiol. Alim. Nutr.*, **12**: 117-132.

Manca de Nadra, M. C., Sandino de Lamelas, D. and Strasser de Saad, A. M. (1998). Pediocin n5p from *Pediococcus pentosaceus*: adsorption on bacterial strains. *Int. J. Food Microbiol.*, **39**: 79-85.

Mani-López, E., Palou, E. and López-Malo, A. (2014). Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. *J. of Dairy Sci.*, **97**: 2578- 2590.

Manzo, R. M., Cardoso, M. M., Tonarelli, G. G. and Simonetta, A. C. (2015). Purification of two bacteriocins produced by *Enterococcus faecalis* DBFIQ E24 strain isolated from raw bovine milk. *Int. J. of Dairy Technol.*, **68**: 1-12. doi: 10.1111/1471-0307.12258.

Martín, R., Delgado, S., Maldonado, A., Jiménez, E., Olivares, M., Fernández, L., Sobrino, O. J. and Rodríguez, J. M. (2009). Isolation of

lactobacilli from cow milk and evaluation of their probiotic potential. *J. of Dairy Sci.*, **76**: 418-425.

Marciset, O., Jeronimus-Stratingh, M. C., Mollet, B. and Poolman, B. (1997). Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin that functions without a receptor. *J. Biol. Chem.*, **272**: 14277-14284.

Martinez Magro, M. I., Martinez Corbacho, J. M., Herranz Sorribes, C, Suárez Gea, A. M. y Rodriguez Gomez, J. M. (2000). Las Bacteriocinas de las Bacterias Lácticas. 1- Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. *Alimentaria*, **314**: 59-66.

Medina, M. y Picón, A. (2011). Seguridad, tecnología y calidad de alimentos. *Actualidad. SEM* **52**: 47-48. Disponible en: <http://www.sem microbiologia.org/pdf/actualidad/52/SEM-52%2027.pdf>

Meghrous, J., Lacroix, C. and Simard, R. E. (1999). The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. *Food Microbiol.*, **16**: 105-114.

Michels, P. A. M., Michels, J. P. J., Boonstra, J. and Konings, W. N. (1979). Generation of an electrochemical proton gradient in bacteria by the excretion of metabolic end products. *FEMS Microbiol. Lett.*, **5** (5): 357-364.

Mohankumar, A. and Murugalatha, N. (2011). Characterization and Antibacterial Activity of Bacteriocin Producing *Lactobacillus* Isolated from Raw Cattle Milk Sample. *Int. J. of Biology.*, **3**: 128-143

Moll, G. N., Konings, W. N. and Driessen, A. J. M. (1999). Bacteriocins: mechanisms of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J.*, **76**: 185-198.

Monroy Dosta, M. C., Castro Barrera, T., Fernández Perrino, F. J. y Mayorga Reyes, L. (2009). Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Contactos*, **73**: 63–72.

Moragues, L., Rozeck, C. y Simonetta, A, (2003). Caracterización preliminar de sustancias tipo bacteriocinas producidas por cepas de enterococos. *Revista Arg. de Lactol.*, **22**: 21-32. ISSN 0327-5418.

Müller, D. M., Carrasco, M. S., Tonarelli, G. G., and Simonetta, A. C. (2008). Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* Ip 31 strain isolated from dry-fermented sausage. *J. Appl. Microbiol.*, **106**: 2031-2040.

Muriana, P. M. (1996). Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *J. Food Prot. Suppl.*, 54-63.

Naidu, A. S., Unal, R. and Tulpinsky, J. (2006). Bacteriocins: antimicrobial activity and applications. En: Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A. and Levin, R. E. (Eds). *Food Biotechnol.* Segunda ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1391-1437.

Ndlovu, B., Schoeman, H., Franz, C. M. A. P. and Toit, M. (2015). Screening, identification and characterization of bacteriocins produced by wine-isolated LAB strains. *J. of Appl. Microbiol.*, **118** (4): 1007-1022.

Nes, I. F., Diep, D. P., Havarstein, L. S., Bruberg, M. B., Eijsink, V. and Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J.*, **70**: 113-128.

Nieto-Lozano, J. C., Reguera-Useros, J. I., Peláez-Martínez, M. C. and Hardisson de la Torre, A. (2006). Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* on Spanish raw meat. *Meat Science*, **72**: 57–61.

Niku-Paavola, M. L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T. and Haukara, A. (1999). New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.*, **86** (1): 29-35.

Ogunbanwo, S. T. and Okanlawon, B. M. (2006). Microbial and sensory changes during the cold storage of chicken meat treated with bacteriocin from *Lactobacillus brevis* OG1. *Pakistan J. of Nutrition*, **5** (6): 601-605.

Oh, S., Kim, S. H. and Worobo, R. W. (2000). Characterization and Purification of a Bacteriocin Produced by a Potential Probiotic Culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *J. of Dairy Sci.*, **83**: 2747–2752.

OIE, 2007. Código Sanitario para los Animales Terrestres. Décimosexta edición. Sección 27, Cap.2.7.12 y Cap. 2.7.13. ISBN 978-92-9044-690-3.

Okereke, T. and Montville, T. J. (1991). Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, **55**: 349-353.

Olsen, J. E., Brown, D. J., Madsen, M. and Bisgaard, M. (2003). Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. *J. of App. Microbiol.*, **94** (5): 826-835.doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.

OMS. (2015). Doi: http://www.who.int/topics/food_safety/es/

Özer, B., Grandison, A., Robinson, R. and Atamer, M. (2003). Effects of lactoperoxidase and hydrogen peroxide on rheological properties of yoghurt. *J. of Dairy Res.*, **70**: 227-232.

Parente, E. and Ricciardi, A. (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**: 628-638.

Park, S. H., Itoh, K., and Fujisawa, T. (2003). Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804. *J. Appl. Microbiol.*, **95**: 294-300.

Pérez, C., Rivera, S., Pirela de Vera, A., Rincón, H., Mavárez, Y. y Román, R. (2004). Aislamiento de *Salmonella* en canales de aves y evaluación de la efectividad de diferentes medios de enriquecimiento y selectivos. *Rev. Científ. FCV-LUZ.* **14** (2): 177-185

Piard, J. C. and Desmazeaud, M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 1 Oxygen metabolites and end products from catabolism. *Lait.*, **71**: 525–541.

Piard, J. C. and Desmazeaud, M. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 2 Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait.*, **72**: 113–142.

Pringsulaka, O., Thongngam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul, K. and Rangsiruji, A. (2012). Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food Control*, **23**: 547-55.

Raccach, M., Baker, R. E., Rengens Tein, J. M. and Mulnix, J. (1979). Potential applications of microbial antagonism to extended storage atability of a flesh type of food. *J. Food Sci.*, **44**: 43-46

Racach, M. and Geshell, D. J. (1995). The inhibition of *Listeria monocytogenes* in milk by dehydrated pediococcal spent medium. *Food Microbiol.*, **12**: 229-235.

Ray, B. and Daeschel, M. (eds.). (1992). Food biopreservatives of microbial origin. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA.

Reddy, S. G., Hanrickson, R. L. and Olson, H. (1970). The influence of lactic culture on ground beef quality. *J. Food Sci.*, **35**: 789-791.

Reddy, S. G., Chen, M. L. and Patel, P. J. (1975). Influence of lactic cultures on the biochemical bacterial and organoleptic changes in beef. *J. Food Sci.*, **40**: 314-318.

Revol-Junelles, A. M., Mathis, R., Krier, F., Fleury, Y., Delfour, A. and Lefebvre, G. (1996). *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 syntetizes two distinct bacteriocins. *Lett. Appl. Microbiol.*, **23** (2): 120-124.

Roldán, M. L., Otero, J. L., Villarreal, F., Baroni, M. R., Carrasco, M. S., Álvarez, C., Russell-White, K., Méndez, E. A. and Simonetta, A. C. (2011). Efecto inhibitor de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157:H7. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, **31** (1): 37-41. ISSN 1315-2556.

Ross, R. P., Morgan, S. and Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. of Food Microbiol.*, **79**: 3-16.

Roth, L. A. and Clark, D. S. (1975). Effect of lactobacilli and carbon dioxide on the growth of *Microbacterium thermosphactum* on the fresh beef. *Can. J. Microbiol.*, **21**: 629-632.

Sakai, S., Nonobe, E., Satow, T., Imakawa, K. and Nagaoka, K. VNBCCC. (2008). Production of hydrogen peroxide by a small molecular mass

compound in milk from Holstein cows with high and low milk somatic cell count. *J. of Dairy Res.*, **75**: 335-339.

Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. F. R., Isolauri, E., Moreau, M. C., Roberfroid, M. and Rowland, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Brit. J. Nutr.*, **80** (suppl. 1): S147–S171.

San Martín, P. M. C. (2010). Bacterias ácido-lácticas con Actividad antibacteriana aisladas de vegetales frescos: evaluación de su potencial utilización para el biocontrol de *Listeria monocytogenes* en hortalizas frescas cortadas. Tesina Ing. Alimentos Universidad del Bío-Bío. Facultad de ciencias de la salud y de los alimentos. Escuela de Ingeniería en Alimentos. Chillán, Chile.

Sang, Y. and Blecha, F. (2008). Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Animal Health Research Rev.*, **9**: 227-235.

Schillinger, U. and Lucke, F. (1989). Antibacteria; activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 1901-1906.

Schillinger, U. (1990). Bacteriocins of lactic acid bacteria. Pp. 55-74. En: Bills, D. D. And Kung, S. (eds.). *Biotechnol. and Food Safety*. Butterworth-Heinemann, Boston.

Schillinger, U. Geisen, R. and Holzapfel, W. H. (1996). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Foods Sci. Technol.*, **7**: 158-164.

Signorini, M., Ponce-Alquicira, E. and Guerrero-Legarreta, I. (2003). Proteolytic and Lipolytic Changes in Beef Inoculated with Spoilage

Microorganisms and Bioprotective Lactic Acid Bacteria. *Int. J. of Food Properties*, **6**: 147-163.

Silva Rivas, R. N. (2004). Acción Antimicrobiana de dos bacteriocinas lácticas sobre *Listeria monocytogenes* adherida a una superficie de acero inoxidable. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fas586a/pdf/fas586a-TH.back.1.pdf>

Simonetta, A. C., Moragues de Velasco, L. G. and Frisón, L. N. (1997). Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **24**: 139-143.

Siragusa, G. (1995). The effectiveness of carcass decontamination system for controlling the presence of pathogens of the surfaces of meat animal carcasses. *J. of Food Safety*, **15**: 229-238.

Smulders, F. J. M., and Greer, G. C. (1998). Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programs for muscle foods: prospects and controversies. *Int. J. of Food Microbiol.*, **44**: 149-169. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00123-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00123-8)

Sobrino, O. J., Rodriguez, J. M., Moreira, W. L., Fernández, M. F., Sanz, B. and Hernández, P. E. (1991). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. *Int J. Food Microbiol.*, **13**: 1-10.

Sofos, J. N. and Smith, G. C. (1998). Nonacid meat decontamination technologies: Model studies and commercial applications. *Int. J. Food Microbiol.*, **44**: 171-188.

Spelhaug, S. R. and Harlander, S. K. (1989). Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* y *Pediococcus pentosaceus*. *J. Food Prot.*, **52**: 856-862.

Stevens, K. A., Sheldon, B. W., Klapes, N. A. and Klaenhammer, T. R. (1991). Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 3612-3615.

Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J.*, **70**: 331-345.

Strasser de Saad, A. M., Pateris, S. E. and Manca de Nadra, M. C. (1993). Stability of pediocin N5p. *Microbiol. Alim. Nutr.*, **11**: 371-375.

Strompfová, V. and Lauková, A. (2007). *In vitro* study on bacteriocin production of *Enterococci* associated with chickens. *Anaerobe*, **13**: 228-237.

Susani, T. A., Neviani, E., Carminati, D. and Giraffa, G. (1995). Inibizione in latte di *Clostridium tyrobutiricum* e *Propionibacterium* spp. da batteriocine prodotte da enterococchi. *Industria Latte*, **31**: 3-15.

Sriwira, M. and Intarapichet, K. (2007). "Selection of Lactic Acid Bacteria for Bacteriocins Production and Application for Extending Shelf-Life of Chicken Meatballs". School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand, 1-5 Disponible en el sitio: <http://iat.sut.ac.th/food/FIA2007/FIA2007/paper/P3-05-CP.pdf> .

Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocin of a group B *Streptococcus*: partial purification and characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **7**: 764-772.

Tahara, T. and Kanatani, K. (1996). Isolation, partial characterization and mode of acidocin j1229, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JMC 1229. *J. Appl. Bacteriol.*, **81**: 669-677.

Talarico, T. L. and Dobrogosz, W. J. (1989). Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**: 674-679.

Tessi, M. A., Rafaghelli, R. C., Tiburzi, M. C., Jiménez, S. M., Masset, P. y Moguevsky, M. A. (1993). Calidad microbiológica de canales de pollos descontaminadas por inmersión en ácidos orgánicos y conservadas al vacío a 4°C. *La Industria Cárnica Latinoamericana*, **19** (91): 17-26. Publitec S.A.E.C.y M. (Ed). ISSN 0325-3414.

Thomas C. J. and McMeekin, T. A. (1980). Contamination of broiler carcass skin during commercial processing procedures: and electron microscopic study. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **40** (1): 133-144.

Tichaczek, P. S., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Vogel, R. F. and Hammes, W. P. (1992). Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *Lactobacillus sake* LTH673. *Syst. Appl. Microbiol.*, **15**: 460-468.

Tseng, C. P. and Montville, T. J. (1993). Metabolic Regulation of End Product Distribution in Lactobacilli: Causes and Consequences. *Biotechnol. Prog.*, **9**: 113-121.

Tulini, F. L., Gomes, B. C. and De Martinis, E. C. P. (2011). Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* 130 isolated from mozzarella cheese. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, **31** (1): 155-159.

Uribe, C. y Suárez, M. C. (2006). Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colombia Médica*, **37**(2).

Extraído en 2010, desde http://colombiamedica.univalle.edu.co/Vol37No2/html/PDF/cm_37n2a10.pdf

USDA (Departamento de Agricultura de EEUU) FSIS (Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria). (2008). Aislamiento e identificación de *Salmonella* en Productos de Carne, Aves y Huevo. *Guía de Laboratorio de Microbiología* (MLG 4.04). Disponible en:

http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_4_04.pdf

Vanegas Lopez, M. C., Ossa Canencio, J. A., Gardeazábal Acuña, P. A. y Durango, A. C. (2011). Bacterias ácido lácticas (BAL) como alternativa de conservación de la carne de res empacada en atmósfera modificada. *Rev. Asoc. Colom. Ciencia y Tecnol. de Alimen.* **20** (22): 18-27. ISSN 2027-291X. Disponible en: www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/35.

Vásquez, M. S. M., Suárez, M. H. and Montoya, O. I. (2009a). Evaluation of bacteriocines as protective means for the biopreservation of refrigerated meat. *Rev. Chil Nutr.*, **36** (3): 228-238.

Vásquez, M. S. M., Suárez, M. H. y Zapata B. S. (2009b). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Rev. Chil. Nutr.*, **36** (1): 64-71.

Velilla, A., Malena, R. C., Terzolo, H. R., Caffer, M. I., Alcain, A., Roge A. y Padín, V. (2011). Serovariedades de *Salmonella entérica* aisladas de pollos de engorde en Argentina. En XXII Congreso Latinoamericano de Pollo, 2011. Disponible en:

<http://www.engormix.com/MAavicultura/sanidad/articulos/salmonella-en-pollos-t3540/165-p0.htm>

Vignolo, G. M., Suriani, F., Ruiz Holgado, A. A. P. and Oliver, G. (1993) Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.*, **75**: 344–349.

Wachsman, M. B., Farias, M. E., Takeda, E., Sesma, F., de Ruiz Holgado, A. P., de Torres, R. A. and Coto, C. E. (1999). Antibacterial activity of enterocin CRL35 against herpesviruses. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, **12** (4): 293-299.

Whyte, P., Mc Gill, K. and Collins, J. D. (2002). An assessment of steam pasteurization and hot water immersion treatments for the microbiological decontamination of broiler carcasses. *Food Microbiol.*, **20**: 111-117.

White, P. L., Naugle, A. L., Jackson, C. R., Fedorka-Cray, P. G., Rose, B. E., Pritci-lard, K. M., Levine, P., Saint, P. K., Schroeder, C. M., Dreyfuss, M. S., Tan, R., Holt, G. K., Harman, J. N. and Buchanan, S. (2007). *Salmonella enteritidis* in Meat, Poultry, and Pasteurized Egg Products Regulated by the U.S. Food Safety and Inspection Service, 1998 through 2003. *J. Food. Prot.*, **70** (3): 582-591.

Wiseman, D. W. and Marth, E. H. (1981). Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of *Streptococcus lactis*. *Mycopathologia*, **73**: 49–56.

Wu, Y. L., Qi, K., Tu, J., Wang, X. Y, Zhang, M. and Fu, R. Y. (2014). Study on optimization of metabolic conditions for bacteriocin production from *Lactobacillus* and its antimicrobial characteristics. *Sci. and Technol. of Food Industry*, **21**: 140-145.

Yanagida, F., Chen, Y. S., Onda, T. and Shinohara, T. (2005). Durancin L28-1A, a new bacteriocin from *Enterococcus durans* L28-1, isolated from soil. *Lett. Appl. Microbiol.*, **40**: 430–435.

Zapata, M. V., Jiménez, S. M., Sabbag, N. y Russell-White, K. (2009). Actividad antimicrobiana de extractos crudos de bacteriocinas (sobrenadantes de cultivos de BAL libres de células) y efectos sensoriales por su aplicación en porciones de pollo. III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos”. Córdoba.Fecha: 15-17/04/2009.

Zhang, H., Liu, L., Hao, Y., Zhong, S., Liu, H., Han, T. and Xie, Y. (2013). Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BM-1 isolated from a traditionally fermented Chinese meat product. *Microbiol. and Immunol.*, **57** (11):746-755.

Zhou, K., George, S. M., Li, P. L. and Baranyi, J. (2012). Effect of periodic fluctuation in the osmotic environment on the adaptation of *Salmonella*. *Food Microbiol.*, **30**: 298-302.