

Efecto de nisina (PBCs)/tratamiento térmico (60°C) y nisina (PBCs)/medio de recuperación sobre *Listeria monocytogenes*

Huerta Alcántara, A.¹, Raso Pueyo, J.² y Minor Pérez, H.¹

¹División de Ingeniería Química y Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Av. Tecnológico s/n Esq. Av. Carlos Hank González (Av. Central), Col. Valle de Anáhuac, C. P. 55210, Ecatepec de Morelos, Estado de México, México, E-mail: hminorperez@yahoo.com.mx

²Universidad de Zaragoza, España

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, nisina, termorresistómetro, tratamientos térmicos

Introducción

La nisina es un péptido bioactivo que tiene actividad antimicrobiana y se ha empleado para el control del crecimiento de microorganismos patógenos de los alimentos como *Listeria monocytogenes* o *Clostridium botulinum* [1,2]. Algunas bacteriocinas toleran tratamientos térmicos superiores a los 60°C a diferentes tiempos de calentamiento, y algunas como las bacteriocinas producidas por *Carnobacterium piscicola*, *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus* toleran tratamientos de 100°C a tiempos de 10-60 min [3,4]. Sin embargo, esta propiedad bioquímica ha sido poco estudiada, aún cuando puede tener un alto potencial de aplicación en alimentos sometidos a tratamientos térmicos; tanto para procesos de conservación (e.g. pasteurización) o para la elaboración de productos que requieran calor para su elaboración (e.g. para productos tipo Surimi que son sometidos a calentamiento gradual para obtener un gel). Las estrategias de aplicación de la nisina en diversos sistemas alimentarios deben evaluar su aplicación en medio de tratamiento (e.g. durante el tratamiento térmico, TT) o en medio de recuperación (después del TT) para mejorar el control de bacterias como *Listeria monocytogenes*. Así mismo, se debe evitar el desarrollo de mecanismo de resistencia de la bacteria control por exposición a elevadas concentraciones de nisina. En este estudio se evaluó la combinación de nisina en Concentraciones Parcialmente Bactericidad (PBCs, por sus siglas en inglés) y la temperatura de 60°C sobre el control de *Listeria monocytogenes* CECT 5672. Se evaluaron dos sistemas: aplicación de nisina en medio de tratamiento (durante el TT) y nisina en medio de tratamiento (TT) + nisina en medio de recuperación (medio de cultivo TSA, 37°C).

Metodología

*Preparación de la nisina

La muestra de nisina (Sigma. Aldrich), con una concentración inicial de 10⁶ UI/g se diluyó en agua destilada estéril y se ajustó el pH a 2.0 para mejorar su solubilidad. Se utilizó una solución diluida de HCl con una concentración de 0.02 N y 0.75% de NaCl [5].

**Listeria monocytogenes* CETC 5672 y condiciones de crecimiento

Listeria monocytogenes CETC 5672 pertenece a la colección microbiana del Laboratorio de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España. Durante este estudio la cepa control se conservó en crioviales a -80°C. Ésta se sembró por estría cruzada en medio TSAYE (Tryptic Soy Broth, Bioxon, México) suplementado con 0.6% de extracto de levadura (w/v Bioxon, México) y 1.5% de agar bacteriológico (w/v Bioxon, México). La muestra se incubó a 37°C por 24 h. Una colonia de la bacteria control se utilizó para inocular en caldo TSBYE (Tryptic Soy Broth, Bioxon, México) con 0.6% de extracto de levadura (w/v Bioxon, México) y se incubó a 37°C por 12 h. Se tomaron 100 µL de este pre-cultivo para ser inoculados en 5 mL de TSBYE y la muestra se incubó a 37°C durante 24 h para obtener el cultivo de estudio. Un volumen de 9 mL del cultivo se centrifugo a 4000 rpm durante 15 min a 25°C (Centrífuga Eppendorf 5804 R, Alemania). El pellet se resuspendió en 1 mL de agua estéril y se inyectó un volumen de 200 µL en un termoresistómetro TR-SC [7]. En el TR-SC se utilizó una solución amortiguadora pH 7.0. Las cuentas microbianas se realizaron con la técnica de la gota [6] en medio TSAYE (Tryptic Soy Broth, Milán, Italia). Se evaluaron dos sistemas: aplicación de nisina en medio de tratamiento (durante el TT) y nisina en medio de tratamiento (TT) + nisina en medio de recuperación (medio de cultivo TSA) a diferentes concentraciones. Se empleo la técnica de la gota [6] para la cuenta en placa.

***Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación múltiple de medias con la prueba de Duncan, utilizando el paquete estadístico SAS System, Windows™ Versión 6.12, USA.

Resultados y discusión

En la Tabla 1 se muestra que el modelo lineal obtenido para el estudio a la temperatura de 60°C, se observa un efecto significativo ($P < 0.0001$) de los factores tiempo, nisina y tipo de tratamiento sobre la variable respuesta (Log UFC/mL de *Listeria monocytogenes* CECTC 5672). El modelo describe la influencia de los factores investigados en forma independiente: tiempo (A), concentración de nisina (B), tratamiento (C) y el efecto de las interacciones (A*B, A*C, B*C y A*B*C). Estos parámetros, para la temperatura de estudio tuvieron un efecto significativo sobre la variable respuesta (Tabla 2). El coeficiente de determinación para el modelo lineal 60°C indican que el 2.26% respectivamente de la variación total en la respuesta no puede ser explicado por el modelo desarrollado. Los valores F_0 para los parámetros de cada modelo fueron útiles para explicar el grado de significancia de los efectos de las variables y sus interacciones (Tabla 2, 3 y 4). A la temperatura de 60°C el parámetro que tuvo un mayor efecto significativo fue el tipo tratamiento (C) de estudio (NMT, NMT+NMR). El segundo parámetro con mayor significancia fue la concentración de nisina (B) y por último el tiempo (A). Esto significa que a la temperatura de 60°C los cambios en la variable C (tratamiento) tienen un efecto mayor significativo sobre el control de *Listeria monocytogenes* CECTC 5672. Este comportamiento puede ser explicado debido a que la cepa control puede tener daño subletal durante la aplicación de nisina en el tratamiento térmico, condición que posiblemente la haga sensible a la nisina aplicada en el medio de recuperación (medio TSA).

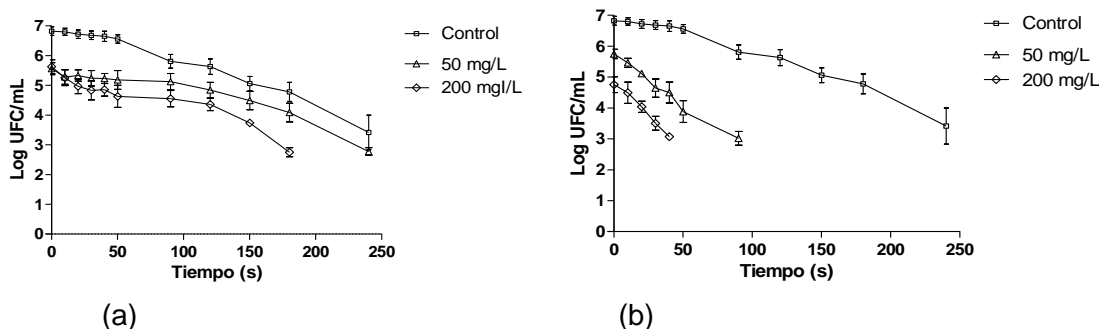


Figura 1. Efecto: (a) nisina (0 mg/L, 50 mg/L y 200 mg/L) en medio de tratamiento (NMT; 60°C/240 s) y la (b) nisina (0 mg/L, 50 mg/L y 200 mg/L) en medio de tratamiento (60°C/240 s) + nisina en medio de recuperación (NMT-NMR, 0 mg/L, 50 mg/L y 200 mg/L) sobre *Listeria monocytogenes* CECTC 5672

Tabla 1. ANOVA para el efecto de la nisina (PBCs), tiempo (s), nisina (NMT, NMT+NMR) sobre el control de *Listeria monocytogenes* CECTC 5672 a una temperatura de 60°C

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > f
Modelo	64	539.202	8.425	45.34	0.0001
Error	67	12.450	0.185		
Total	131	551.653			

R-Square= 0.9774

*Los valores de "Prob > F" menores que 0.050 indican que los parámetros evaluados son significativos

Tabla 2. ANOVA para el efecto de los factores: concentración de nisina, tiempo (s), nisina (NMT, NMT+NMR) sobre el control sobre *Listeria monocytogenes* CECT 5672 a la temperatura de 60°C.

Fuente de variación	Valor de F	Pr > F
Temperatura: 60°C		
A -Tiempo (s)	116.84	0.0001
B -Nisina (PBCs)	408.98	0.0001
C - Tratamiento (NMT, NMT+NMR)	476.19	0.0001
A*B	0.11	1.0000
A*C	13.76	0.0001
B*C	109.24	0.0001
A*B*C	4.24	0.0001

Tabla 3. Prueba de Duncan para la comparación del efecto de la concentración de nisina (PBCs) sobre *Listeria monocytogenes* CECT 5672 a la temperatura de 60°C

Temperatura: 60°C		
Concentración mg/L	Promedio (Log UFC/mL)	Prueba de Duncan*
0	5.793	A
50	3.935	B
200	3.211	C

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes con una $\alpha = 0.05$

Tabla 4. Prueba de Duncan para la comparación del efecto del tiempo (s) y el tratamiento sobre el control de *Listeria monocytogenes* CECT 5672 a la temperatura de 60°C

Tiempo (s)	Temperatura: 60°C		Temperatura: 60°C		Prueba de Duncan*
	Promedio (Log UFC/mL)	Prueba de Duncan*	Tratamiento (NMT, NMT+NMR)	Promedio (Log UFC/mL)	
0	6.0117	A	NMT	5.104	A
10	5.564	B	NMT+NMR	3.46	B
20	5.374	C B			
30	5.267	C B			
40	5.030	C			
50	4.631	D			
90	4.161	E			
120	3.481	F			
150	2.983	G			
180	2.835	G			
240	1.796	H			

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes con una $\alpha = 0.05$

Conclusiones

En las condiciones experimentales evaluadas se encontró que los parámetros tiempo (A), concentración de nisina (B) y tipo de tratamiento (NMT, NMT+NMR), así como las interacciones de estudio tuvieron un efecto significativo sobre la inhibición de *Listeria monocytogenes*. La mayor inactivación de la cepa control en la temperatura de 60°C fue en el tratamiento de NMT+NMR a la concentración de 200 mg/L. Se puede emplear

la combinación de tratamiento térmico, nisina (PBCs), tanto en NMT, como NMT+NMR para el diseño de alimentos sometidos a tratamiento térmicos.

Referencias

- 1.ICMSF. 1996. Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbianos. Editorial Acribia, Zaragoza (España), pp 165-174
- 2.Joerger, M.C. y Klaenhammer, T.R. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Journal of Bacteriology* 167:439-446
- 3.Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. e Ishizaki, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosíntesis, structure and activity. *FEMS microbiology Reviews* 34:85-106
- 4.Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12:39-86
- 5.Gallo, L.I., Pilosof, A.M.R., Jagus, R.J. 2007. Effective control of *Listeria innocua* by combination of nisin, pH and low temperature liquid cheese. *Food control*. 18:1086-1092
- 6.Miles, AA; Misra, SS, Irwin, JO (1938 Nov). The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of hygiene*, 38 (6): 732–49.
- 7.Condón,S., Arrizubieta, M. y Sala, F. 1993. Microbial resistance determinations by the multipoint systems with the thermoresistometer TR-SC. *Journal of Microbiological Methods*, 18, 357-366