

Combinación de tratamientos térmicos y nisina en Concentraciones Parcialmente Bactericidas (PBCs) sobre *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 en un gel modelo

Baldovinos-Sánchez, J.¹ • Minor-Pérez, H.^{1*}

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, nisina, termorresistencia, gel modelo

Key words: *Listeria monocytogenes*, nisin, resistance thermometer, gel model

Introducción

Diversos alimentos como los geles de surimi, elaborados de proteínas de pescado, tienen una estructura molecular donde la fase continua es sólida y la dispersa es líquida. Los geles presentan una densidad similar a los líquidos, sin embargo, su estructura se parece más a un sólido. Para formar los geles se emplean tratamientos térmicos de alrededor de 40°C – 80°C [1]. Esta condición puede emplearse para el diseño de procesos de conservación con bacteriocinas como la nisina, que pertenece al grupo IIa y tiene la característica de tolerancia al calor. Esta propiedad, ha sido poco estudiada aún cuando puede tener un alto potencial de aplicación en alimentos. Algunos autores [2] mencionan que el mecanismo principal de inhibición microbiana en las bacteriocinas del tipo antibiótico y las no

antibiótico, es la formación de poros en la membrana de los microorganismos sensibles, lo que provoca un desbalance iónico y la pérdida de compuestos biológicos como el fosfato inorgánico [2]. La mayoría de las bacteriocinas termorresistentes toleran tratamientos 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 [2]. El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antimicrobiana de la nisina en valores de PBCs (Concentraciones parciales bactericidas) a una temperatura de subpasteurización de 52.5°C en un gel modelo sobre el control de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994.

1 División 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

* hminorperez@yahoo.com.mx



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 diluída de HCl con una concentración de 0.02 N y 0.75% de NaCl [2].

Listeria monocytogenes NCTC 11994 y estudio microbiológico

Listeria monocytogenes NCTC 11994 pertenece a la colección microbiana del Laboratorio de Biotecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, España. Durante este estudio la cepa control se conservó en crioviales a -80°C. Ésta se sembró en medio TSBYE (Tryptic Soy Broth, Bioxon®, México) suplementado con 0.6% de extracto de levadura (w/v Bioxon®, México). La muestra se incubó durante 24 h 37°C para obtener el cultivo de estudio. Este cultivo tiene una concentración de 8.5 – 9 ciclos logarítmicos. Los geles modelo se prepararon con medio de cultivo TSB ((Tryptic Soy Broth, Bioxon®, México) suplementado con 0.6% de extracto de levadura (w/v) (Bioxon®, México) y 0.05% de agar bacteriológico. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado para evaluar el efecto de las variables fijas: concentración de nisina 0 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L y 300 mg/mL y el tiempo de 0 min, 7.5 min, 15 min, 22.5 min y 30. La variable respuesta fue Log UFC/mL de *Listeria monocytogenes* NCTC 1994. En tubos Eppendorf® se agregaron diferentes volúmenes de la solución stock de nisina (104 mg/L) de 0 µL, 25 µL, 50 µL, 75 µL, 80 µL y 100 µL. En cada tubo se agregó un volumen del medio de cultivo TSB con agar (0.5%) de 1000 µL, 975 µL, 950 µL, 925 µL, 925 µL y 900 µL para obtener la concentración de estudio de nisina. Los tratamientos se sometieron a agitación a 350 rpm en un vortex (Labnet®, EUA) durante 1 min y posteriormente se mantuvieron en condiciones en calentamiento a 52.5°C en un baño de temperatura controlada (Polystat Temperature Controller®, Cole-Parmer, EUA). Se empleó la técnica de la gota para realizar las cuentas microbianas a los tiempos de estudio, reportada por Miles and Misra (1938), en

medio TSAYE (Tryptic Soy Agar, Milán, Italia) suplementado con 0.6% de extracto de levadura.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de Bonferroni en el programa GraphPad® para la comparación múltiple de los tratamientos de estudio.

Resultados y discusión

En la Figura 1 se muestran las poblaciones de *Listeria monocytogenes* a los diferentes tiempos de estudio. La mayor reducción se observó a los 30 min con una reducción desde una población inicial de 6 ciclos a valores < 2 ciclos logarítmicos. De acuerdo con el análisis de la prueba de Bonferroni se observó una diferencia altamente significativa entre los tratamientos control (0 mg/L de nisina) y las muestras con nisina en los diferentes tiempos de estudio (Tabla 1). Esta Tabla muestra que a concentraciones (CPBs) de 200 mg/mL y 300 mg/mL se obtuvo la mayor reducción de las poblaciones de *Listeria monocytogenes* hasta alcanzar una inhibición de toda la población (30 min) de *Listeria monocytogenes* que inicialmente tenía una concentración de 6 ciclos logarítmicos. Este comportamiento puede ser explicado debido a que conforme la cepa control es expuesta durante mayor tiempo a la temperatura de 52.5°C posiblemente tenga daño de estructuras celulares como su membrana, lo cual provoca inactivación. Además, posiblemente las células de estudio en estas condiciones sean más sensibles a la nisina. Otra posible explicación se debe a una mejor distribución de la nisina en el sistema de estudio, condición que permite un mayor contacto con la cepa control y de esta forma se favorece la inhibición [3].

Conclusión

En las condiciones experimentales de estudio se observó una reducción significativa de las poblaciones de *Listeria monocytogenes* en los tratamientos con nisina. La mayor reducción se observó a los 30 min con una reducción desde una población inicial de 6 ciclos a valores < 2 ciclos logarítmicos.

Tabla 1. Prueba de Bonferroni para la comparación del efecto de la concentración de nisina (0 mg/L, 50 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L y 300 mg/L) y tiempo sobre la variable respuesta: Log UFC/mL de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 a 52°C

Tratamientos a comparar con la prueba de Bonferroni	Tiempo (min)	Variable de respuesta (Log UFC/mL)		Diferencia	Intervalos de confianza 95%	t	P	Resumen
0 mg/L vs 50 mg/L		0 mg/L	50 mg/L					
	0	6.902	5.338	-1.563	-2.690 to -0.4370	5.264	P<0.001	***
	2.5	6.425	5.450	-0.9750	-2.101 to 0.1515	3.283	P < 0.05	*
	5	7.345	5.359	-1.986	-3.112 to -0.8595	6.687	P<0.001	***
	7.5	6.590	4.793	-1.798	-2.924 to -0.6710	6.052	P<0.001	***
	10	6.913	5.091	-1.823	-2.949 to -0.6960	6.137	P<0.001	***
	15	7.063	5.175	-1.888	-3.014 to -0.7615	6.357	P<0.001	***
	30	6.619	5.121	-1.498	-2.624 to -0.3715	5.044	P<0.001	***
0 mg/L vs 100 mg/L		0 mg/L	100 mg/L					
	0	6.902	4.750	-2.152	-3.278 to -1.025	7.244	P<0.001	***
	2.5	6.425	5.451	-0.9745	-2.101 to 0.1520	3.281	P < 0.05	*
	5	7.345	5.135	-2.210	-3.336 to -1.084	7.441	P<0.001	***
	7.5	6.590	5.426	-1.164	-2.290 to -0.03752	3.919	P<0.01	**
	10	6.913	5.023	-1.891	-3.017 to -0.7640	6.366	P<0.001	***
	15	7.063	5.038	-2.025	-3.151 to -0.8985	6.818	P<0.001	***
	30	6.619	4.760	-1.859	-2.985 to -0.7320	6.258	P<0.001	***
0 mg/L vs 150 mg/L		0 mg/L	150 mg/L					
	0	6.902	5.228	-1.674	-2.800 to -0.5470	5.635	P<0.001	***
	2.5	6.425	5.262	-1.164	-2.290 to -0.03702	3.918	P<0.01	**
	5	7.345	4.820	-2.525	-3.651 to -1.399	8.502	P<0.001	***
	7.5	6.590	5.136	-1.454	-2.580 to -0.3275	4.896	P<0.001	***
	10	6.913	4.386	-2.527	-3.653 to -1.401	8.509	P<0.001	***
	15	7.063	4.831	-2.233	-3.359 to -1.106	7.517	P<0.001	***
	30	6.619	3.750	-2.869	-3.995 to -1.742	9.659	P<0.001	***
0 mg/L vs 200 mg/L		0 mg/L	200 mg/L					
	0	6.902	5.324	-1.578	-2.704 to -0.4510	5.312	P<0.001	***
	2.5	6.425	4.893	-1.532	-2.658 to -0.4055	5.158	P<0.001	***
	5	7.345	5.125	-2.220	-3.346 to -1.093	7.473	P<0.001	***
	7.5	6.590	4.902	-1.689	-2.815 to -0.5620	5.685	P<0.001	***
	10	6.913	4.544	-2.369	-3.495 to -1.243	7.977	P<0.001	***
	15	7.063	4.713	-2.351	-3.477 to -1.224	7.914	P<0.001	***
	30	6.619	3.750	-2.869	-3.995 to -1.742	9.659	P<0.001	***
0 mg/L vs 300 mg/L		0 mg/L	300 mg/L					
	0	6.902	4.776	-2.126	-3.252 to -0.9990	7.157	P<0.001	***
	2.5	6.425	4.469	-1.957	-3.083 to -0.8300	6.588	P<0.001	***
	5	7.345	5.094	-2.251	-3.377 to -1.125	7.579	P<0.001	***
	7.5	6.590	4.838	-1.752	-2.878 to -0.6255	5.899	P<0.001	***
	10	6.913	4.050	-2.864	-3.990 to -1.737	9.642	P<0.001	***
	15	7.063	4.729	-2.334	-3.460 to -1.208	7.859	P<0.001	***
	30	6.619	3.650	-2.969	-4.095 to -1.842	9.995	P<0.001	***

*Significativo

** Muy significativo

***Altamente significativo

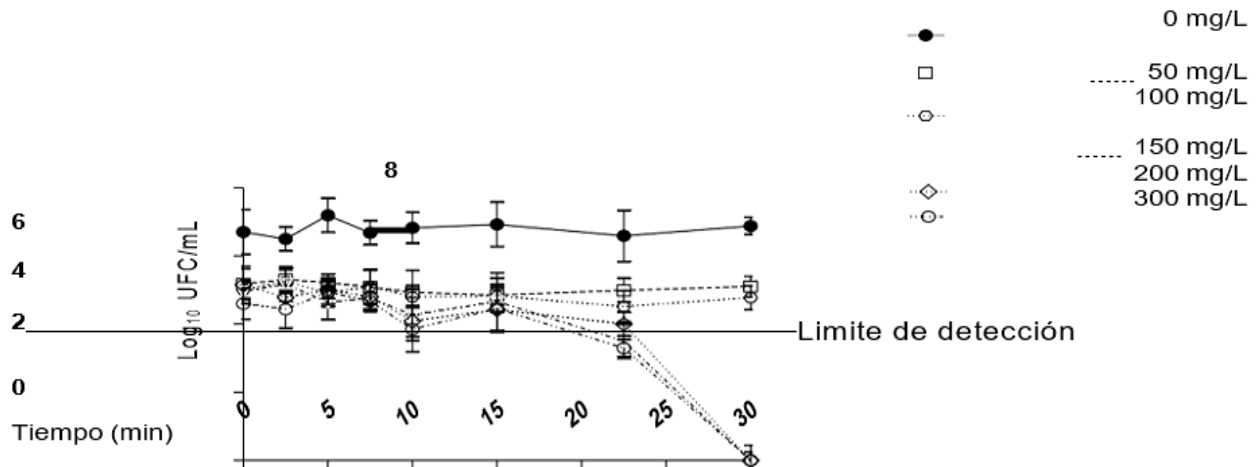


Figura 1. Efecto de la nisina (0-300 mg/L) en un gel modelo de medio TSA (0.5% de agar) sobre *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 a una temperatura de 52.5°C

Referencias

1. Niwa E. (1992). Chemistry of surimi gelation. En: Lannier, T.C., Lee, C. M. (eds), *Surimi Technology*. New York: Marcel Dekker Inc. pp. 389-420
2. 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
3. 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
4. ICMSF. 1996. Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbianos. Editorial Acribia, Zaragoza (España), pp 165-174
5. Miles, AA; Misra, SS, Irwin, JO (1938 Nov). "The estimation of the bactericidal power of the blood." *The Journal of hygiene*, 38 (6): 732-7