

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**  
**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA**  
**ALIMENTARIA**

**“Evaluación de bacteriófagos y bacteriocinas  
para la eliminación de *Listeria*  
*monocytogenes*.”**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**  
**POR**

**María Esther Herrero Sánchez**

**JULIO, 2013**





Master en Biotecnología Alimentaria  
Universidad de Oviedo  
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España  
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



**PROFESORES TUTORES:**

Dra. Dña. Ana Rodríguez González y Dra. Dña. Pilar García Suárez

**CERTIFICAN:**

Que Dña. María Esther Herrero Sánchez ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 7ª promoción curso 2012-2013.

Oviedo, 8 de Julio de 2013

Dña. Ana Rodríguez

VºBº

Mario Díaz Fernández

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

Dña. Pilar García

# **AGRADECIMIENTOS**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que de una forma u otra han colaborado en la realización de este Proyecto.

En primer lugar agradecer a mis Directoras, la Dra. Ana Rodríguez González y la Dra. Pilar García Suárez, bajo cuya supervisión he realizado este Proyecto. Muchísimas gracias por la dedicación y la paciencia tenida conmigo.

A la Dra. Beatriz Martínez Fernández por sus conocimientos y aportaciones.

A todo el personal del IPLA, en especial a mis compañeras de laboratorio por toda la ayuda recibida cuando lo necesité.

Al grupo “Confidential” del Master, por todos esos momentos vividos. Gracias a ellas el estudio ha sido mucho más llevadero.

A todos los profesores que me han impartido clase por su dedicación y enseñanza.

Finalmente dar las gracias a mi familia, en particular a mis padres, por el apoyo recibido en cada una de las decisiones tomadas a lo largo de mi vida.

# ÍNDICE

# ÍNDICE

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES.....	6
2.1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	6
2.2. Importancia de <i>L. monocytogenes</i> en la industria alimentaria.....	9
2.3. Métodos de conservación de alimentos: bioconservación.....	9
2.4. Eficacia de las bacterias lácticas, bacteriocinas y bacteriófagos como sistemas de bioconservación.....	10
2.4.1. Bacterias de ácido láctico.....	11
2.4.2. Bacteriocinas.....	11
2.4.3. Bacteriófagos.....	14
2.4.3.1. Características generales.....	14
2.4.3.2. Aplicaciones de los bacteriófagos como antimicrobianos.....	16
2.5. Estudios de resistencia cruzada y sinergismo.....	19
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
3.1. Cepas bacterianas, bacteriófagos y condiciones de cultivo.....	22
3.2. Bacteriófagos.....	24
3.2.1. Propagación de bacteriófagos. Cálculo de título.....	24
3.2.1.1. Propagación en medio sólido.....	24
3.2.1.2. Propagación en medio líquido y cálculo de la MOI óptima..	25
3.2.2. Determinación de la MIC de los bacteriófagos.....	26

3.2.3.	Determinación del rango de huésped de los fagos.....	27
3.2.4.	Identificación de cepas resistentes a los fagos.....	28
3.3.	Bacteriocinas.....	28
3.3.1.	Obtención de bacteriocinas.....	28
3.3.2.	Cuantificación de la actividad de las bacteriocinas.....	29
3.3.3.	Determinación de la MIC de las bacteriocinas.....	30
3.3.4.	Identificación de cepas resistentes a las bacteriocinas.....	30
3.4.	Ensayos de sinergismo.....	31
3.4.1.	FWLLm1 y FWLLm3.....	31
3.4.2.	Nisina, FWLLm1 y FWLLm3.....	32
3.4.3.	C <sub>23</sub> , FWLLm1 y FWLLm3.....	33
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1.	Obtención de los bacteriófagos FWLLm1 y FWLLm3 y cálculo de la MOI óptima para su propagación.....	34
4.2.	Rango de huésped de los bacteriófagos.....	36
4.3.	Selección de bacteriocinas efectivas frente a <i>L. monocytogenes</i> 2000/47.....	42
4.4.	Cálculo de la MIC de los antimicrobianos frente a <i>L. monocytogenes</i> 2000/47.....	43
4.4.1.	MIC de los bacteriófagos.....	43
4.4.2.	MIC de las bacteriocinas.....	46
4.5.	Sinergismo entre bacteriófagos.....	46
4.6.	Sinergismo entre nisina, FWLLm1 y FWLLm3.....	48
4.7.	Sinergismo entre C <sub>23</sub> , FWLLm1 y FWLLm3.....	52
5.	CONCLUSIONES.....	56
6.	ABREVIATURAS.....	57

<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>58</b>
-----------------------------	-----------

**RESUMEN**  
**ABSTRACT**

## RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado la capacidad lítica de dos bacteriófagos FWLLm1 y FWLLm3 como posible método de biocontrol frente a *Listeria monocytogenes*. Así mismo y con el mismo objetivo se valoró el efecto antimicrobiano de dos bacteriocinas (nisina y coagulina C23) y su uso combinado con los bacteriófagos buscando un efecto sinérgico.

Los resultados obtenidos muestran que tanto el uso individual de los bacteriófagos como de las bacteriocinas producen una disminución del crecimiento microbiano de dicha bacteria con respecto al cultivo control. Posteriormente, se observa un crecimiento de bacterias resistentes a los antimicrobianos. Cuando bacteriófagos y bacteriocinas se combinan, solo en el caso del fago FWLLm3 se observa un efecto sinérgico con ambas bacteriocinas. En particular con coagulina C23, y en las condiciones fijadas en el experimento, la inhibición de *L. monocytogenes* 2000/47 es total.

A la vista de estos resultados se propone el uso combinado de la coagulina 23 y el bacteriófago FWLLm3 como método de biocontrol para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* 2000/47.

## ABSTRACT

In this work, the lytic ability of two bacteriophages (FWLLm1 and FWLLm3) has been studied as a putative biocontrol strategy against *Listeria monocytogenes*. Likewise, the antimicrobial effect of two bacteriocins (nisin and coagulin C23) and its combined use with both bacteriophages looking for a synergistic effect, has been evaluated.

The results showed that both the individual bacteriophages and the bacteriocins produced a decrease of bacterial growth compared with to the control cultures. Afterwards, an increase of antimicrobial-resistant bacteria occurred. Regarding the combined treatment of bacteriophages and bacteriocins, a synergistic effect between phage FWLLm3 and both bacteriocins was observed. In particular, the bacteriocin C23 in combination with phage FWLLm3 showed a complete inhibition of *L. monocytogenes* 2000/47.

In view of these results, we propose the combined use of the bacteriophage FWLLm3 and coagulin C23 as a biocontrol method for inhibiting the *L. monocytogenes* 2000/47.

# **LISTA DE FIGURAS Y TABLAS**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Porcentaje de casos de listeriosis humana hospitalizados durante el año 2011.....	2
<b>Figura 2:</b> Imagen de <i>L. monocytogenes</i> al microscopio electrónico.....	6
<b>Figura 3:</b> Representación esquemática de las diferentes etapas de los ciclos de vida de un bacteriófago.....	16
<b>Figura 4:</b> Crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en medio Oxford.....	23
<b>Figura 5:</b> Método de dilución seriada de una suspensión de fago.....	25
<b>Figura 6:</b> Determinación de la MIC de las bacteriocinas.....	27
<b>Figura 7:</b> Halos de inhibición de bacteriocinas sobre <i>L. monocytogenes</i> 2000/47.....	29
<b>Figura 8:</b> Determinación de la MIC de las bacteriocinas en placa microtiter.....	30
<b>Figura 9.1:</b> Imagen del fago FWLLm1 al microscopio electrónico.....	34
<b>Figura 9.2:</b> Imagen del fago FWLLm3 al microscopio electrónico.....	35
<b>Figura 10:</b> Sensibilidad de la cepa <i>L. monocytogenes</i> 412P y <i>L. monocytogenes</i> 409 a los fagos.....	39
<b>Figura 11:</b> Actividad de las bacteriocinas frente a <i>L. monocytogenes</i> 2000/47.....	43
<b>Figura 12:</b> Inhibición de <i>L. monocytogenes</i> con distintas concentraciones de fagos en placa microtiter.....	44
<b>Figura 13:</b> Inhibición de <i>L. monocytogenes</i> por la acción del fago FWLLm1 a distintas concentraciones.....	45
<b>Figura 14:</b> Inhibición de <i>L. monocytogenes</i> por la acción del fago FWLLm3 a distintas concentraciones.....	45
<b>Figura 15:</b> Inhibición de <i>L. monocytogenes</i> por la acción de distintas bacteriocinas en placa microtiter.....	46

<b>Figura 16:</b> Capacidad antimicrobiana de los fagos FWLLm1 y FWLLm3 frente a <i>L. monocytogenes</i> 2000/47.....	47
<b>Figura 17:</b> Efecto antimicrobiano de nisina y fagos frente a <i>L. monocytogenes</i> 2000/47.....	49
<b>Figura 18:</b> Evolución del título de fagos en cultivos infectados en presencia de nisina.....	50
<b>Figura 19:</b> Efecto antimicrobiano de la bacteriocina C23 (876 UA/ml) y fagos frente a <i>L. monocytogenes</i> 2000/47.....	52
<b>Figura 20:</b> Evolución del título de fagos en cultivos infectados en presencia de la bacteriocina C23 (876 UA/ml).....	53
<b>Figura 21:</b> Efecto antimicrobiano de la bacteriocina C23 (1641 UA/ml) y fagos frente a <i>L. monocytogenes</i> 2000/47.....	54
<b>Figura 22:</b> Evolución del título de fagos en cultivos infectados en presencia de la bacteriocina C23 (1641 UA/ml).....	55

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Aplicación de las bacteriocinas en distintos alimentos.....	12
<b>Tabla 2:</b> Clasificación de los bacteriófagos según su morfología y su ácido nucleico..	15
<b>Tabla 3:</b> Aplicaciones de los bacteriófagos destinados a la mejora de la seguridad alimentaria.....	18
<b>Tabla 4:</b> Cepas productoras de bacteriocinas utilizadas en el trabajo.....	23
<b>Tabla 5:</b> Propagación de bacteriófagos en medio líquido a distintas densidades ópticas.....	26
<b>Tabla 6:</b> Inhibición de <i>L. monocytogenes</i> con fagos.....	31
<b>Tabla 7:</b> Inhibición de <i>L. monocytogenes</i> con fagos y nisina.....	32
<b>Tabla 8:</b> Inhibición de <i>L. monocytogenes</i> con fagos y C23.....	33
<b>Tabla 9:</b> Resultados de la propagación de los bacteriófagos en medio líquido y MOI..	36
<b>Tabla 10:</b> Sensibilidad/resistencia de las cepas bacterianas a los fagos mediante el protocolo del “spot”.....	39
<b>Tabla 11:</b> Sensibilidad de las cepas al fago FWLLm1.....	40
<b>Tabla 12:</b> Sensibilidad de las cepas al fago FWLLm3.....	41

# **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

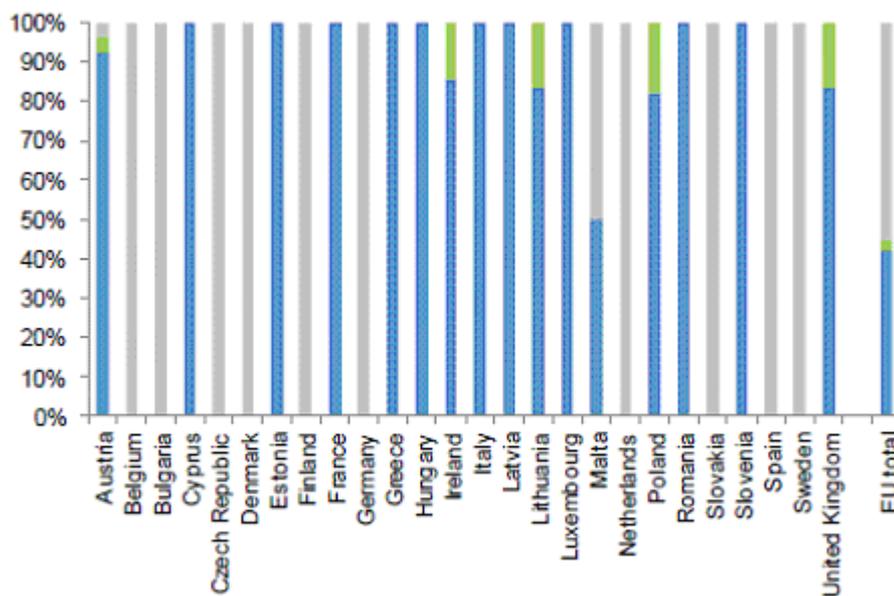
# 1. INTRODUCCIÓN

Las toxiinfecciones alimentarias son un grave problema de salud pública siendo una preocupación no sólo en los países en vía de desarrollo sino también en los desarrollados. Las causas de las mismas son muy variables y van desde una materia prima contaminada, una manipulación incorrecta o la conservación inadecuada de los alimentos. En cualquier caso, las consecuencias asociadas son lo suficientemente importantes para que el sector implicado aplique todo tipo de estrategias para evitar dicha contaminación.

En el año 2011 en la Unión Europea, según el Informe sobre tendencia y fuentes de zoonosis, agentes zoonóticos y brotes de origen alimentario, se registraron 5.648 brotes de origen alimentario siendo los agentes causales, entre otros, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria*, *E. coli*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Yersinia* y como principales alimentos implicados los huevos, alimentos mezclados, el pescado y los productos pesqueros (EFSA Journal 2013;11(4):312).

De estas enfermedades alimentarias, la listeriosis humana es una zoonosis poco frecuente pero grave, con una alta morbilidad, hospitalización y mortalidad en las poblaciones vulnerables. En 2011, se notificaron en la UE 1.476 casos humanos confirmados, observándose una disminución del 7,8% en comparación con el año 2010. Además de todas las enfermedades zoonóticas bajo vigilancia de la UE, la listeriosis fue la que causó la enfermedad humana más grave, con 93,6% de los casos hospitalizados (Figura 1) y 134 casos mortales (tasa de mortalidad del 12,7%).

*Listeria monocytogenes* es un patógeno que cuando se encuentra en los alimentos, puede causar serias enfermedades, principalmente en grupos de alto riesgo como inmunocomprometidos, mujeres embarazadas y neonatos. *L. monocytogenes* es una importante causa de abortos, septicemia o infección del SNC. Antiguamente, los brotes se vinculaban con una gran variedad de alimentos, especialmente carnes procesadas (salchichas, paté, productos precocidos); en la actualidad, la mayoría se vinculan al consumo de leche cruda o quesos elaborados con leche sin pasteurizar.



**Figura 1: Porcentaje de casos de listeriosis humana hospitalizados durante el 2011.**  
■ Hospitalizados. ■ No hospitalizados. ■ No se tienen datos (EFSA Journal 2013;11(4):312).

La importancia de la listeriosis para la salud pública no siempre es reconocida, sobre todo porque es una enfermedad relativamente rara, en comparación con otras más comunes como la salmonelosis. Sin embargo, debido a su alta tasa de letalidad, la listeriosis se encuentra entre las causas más frecuentes de muerte por enfermedades transmitidas por alimentos ocupando la segunda posición, después de la salmonelosis.

La aparición de un brote alimentario en general, no sólo ocasiona daños de salud pública sino que conlleva repercusiones económicas para la industria alimentaria implicada como son las sanciones administrativas y la responsabilidad penal tal y como establece la Ley 17/11 de Seguridad Alimentaria y Nutrición, indemnizaciones a los afectados, retirada de los lotes implicados y su reprocesado o destrucción, quejas de los consumidores y mala reputación de la empresa afectada.

Los cambios que se han producido en los últimos años, como la globalización en el suministro de alimentos o el incremento de alimentos crudos o poco cocinados, explican en gran medida el número de toxiinfecciones alimentarias confirmadas en los distintos países.

Pese a los avances logrados en materia de higiene y seguridad alimentaria, sigue siendo necesario el desarrollo de nuevas estrategias que permitan reducir y controlar la

presencia de patógenos en alimentos, sin olvidar la importancia que tienen un buen sistema de vigilancia, la aplicación de buenas prácticas de higiene (Good Hygienic Practices; GHP) y la implementación de planes de análisis de peligros y puntos de control críticos (Hazard Analysis and Critical Control Points HACCP). Debe tenerse en cuenta que muchos de los patógenos citados anteriormente pueden ser prevenibles si se practican buenas condiciones de manipulación y conservación.

Hasta ahora, la aplicación de tratamientos térmicos intensos y el uso de conservantes químicos han sido las metodologías mayoritariamente empleadas por la industria para asegurar la inocuidad de los alimentos y alargar su vida útil (Raso y BarbosaCánovas, 2003).

Teniendo en cuenta las nuevas exigencias del consumidor hacia alimentos frescos o mínimamente procesados así como un rechazo general a los aditivos químicos adicionados, es lógico que las industrias alimentarias busquen nuevos métodos de conservación que satisfagan dichas exigencias, lo que ha hecho que desde los departamentos de I+D así como por parte de los centros de investigación se estudien nuevos mecanismos que inhiban el crecimiento microbiano.

Como alternativa, desde hace algunos años se potencia el uso de tecnologías no térmicas que respeten las características nutricionales, sensoriales y funcionales del producto, así como la adición de conservantes naturales de origen animal, vegetal o microbiano (Somolinos y col., 2009).

Principalmente se persigue la combinación de ambas estrategias porque en algunos casos la aplicación conjunta es más efectiva que la aplicación por separado, con lo que se minimiza al máximo el posible efecto de éstas sobre las características del alimento, es lo que se conoce como “Tecnología de barreras” (Leinster, 2000).

Una de las estrategias de conservación de los alimentos que está teniendo un gran impacto en el momento actual es la denominada bioconservación. Este sistema de conservación explota la capacidad de microorganismos reconocidos como seguros (GRAS, generally regarded as safe) y/o de sus metabolitos para inhibir el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos en los alimentos. La finalidad es obtener alimentos con óptimas condiciones higiénico-sanitarias y menos procesados.

En la bioconservación se utilizan principalmente bacterias del ácido láctico y/o sus productos, pero también cabe la posibilidad de utilizar bacteriófagos y proteínas derivadas de ellos (García y col., 2010).

Como productos de las bacterias del ácido láctico podemos señalar las bacteriocinas, péptidos con capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos. Además las bacteriocinas, presentan una serie de características que las hacen idóneas para su uso, como son sus propiedades físico-químicas que las hacen resistentes a tratamientos térmicos, su degradación por enzimas digestivos haciéndolas inocuas para el hombre y su fácil difusión en cualquier alimento.

Por otro lado los bacteriófagos, enemigos naturales de las bacterias, pueden actuar como agentes antimicrobianos y tienen la ventaja de ser un sistema inocuo para los consumidores ya que son específicos de bacterias. Además, su uso en combinación con otros tratamientos puede reducir, o incluso eliminar, el número de microorganismos patógenos en distintos puntos de la cadena alimentaria (materia prima, superficies de trabajo, manipuladores de alimentos almacenados).

Este trabajo se ha centrado en *Listeria monocytogenes*, un patógeno de gran riesgo para la salud, no tanto por el número de casos sino por los efectos que tienen para un determinado rango de la población. Por otro lado, su gran ubicuidad, su presencia sobre todo en alimentos listos para el consumo que no sufren un tratamiento posterior y las repercusiones económicas que conlleva la aparición de un brote, justifican la investigación en nuevos sistemas de eliminación de esta bacteria.

Basándose en el conocimiento previo de la eficacia de los bacteriófagos y las bacteriocinas en la eliminación de patógenos así como en el sinergismo que puede darse entre estos dos antimicrobianos, se planteó el objetivo de este trabajo: “Evaluación de bacteriófagos y bacteriocinas para la eliminación de *L. monocytogenes*”, que se llevará a cabo a través de los siguientes subobjetivos:

- 1.- Estudiar la capacidad lítica de los fagos FWLLm1 y FWLLm3 como método de biocontrol. Determinación de su rango de huésped.
- 2.- Evaluarla actividad antimicrobiana de varias bacteriocinas frente a la cepa de *L. monocytogenes* 2000/47.

3.- Determinar el posible sinergismo entre ambos bacteriófagos y las bacteriocinas frente a *L. monocytogenes* 2000/47.

**CONSIDERACIONES  
TEÓRICAS Y  
EXPERIMENTALES**

## 2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES

### 2.1-*Listeria monocytogenes*.

*L. monocytogenes* (Figura 2) es un bacilo Gram-positivo, anaeróbico facultativo, no formador de esporas, y que presenta una motilidad típica a 20-25°C, pero no a 35°C.

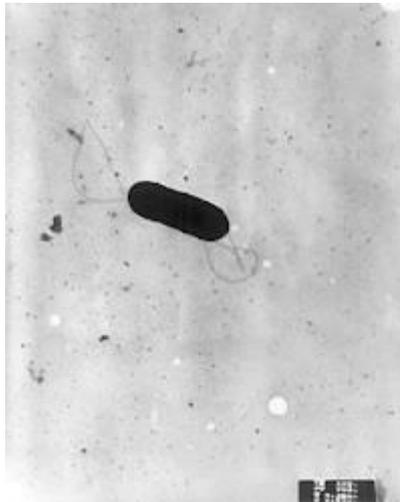


Figura 2. Imagen de *L. monocytogenes* al microscopio electrónico  
([http://es.wikipedia.org/wiki/Listeria\\_monocytogenes](http://es.wikipedia.org/wiki/Listeria_monocytogenes)).

En la actualidad se distinguen seis especies de *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* y *L. grayi*. Además, se han propuesto dos subespecies de *L. ivanovii*; *L. ivanovii* subespecie *ivanovii* y *L. ivanovii* subespecie *londoniensis* (Boerlin y col., 1992).

*L. monocytogenes* es el principal patógeno para humanos del género *Listeria* (Jones, 1990). La caracterización de *L. monocytogenes* más allá del nivel de especie se ha venido haciendo hasta hace poco mediante el serotipado y el fagotipado. El serotipado ha demostrado la existencia de 13 serovariedades que pueden provocar enfermedad,

pero el 95% de los aislamientos en humanos pertenecen únicamente a 3 serovariedades: 1/2a, 1/2b y 4b.

*L. monocytogenes* es una bacteria ampliamente distribuida en el medio ambiente, y potencialmente puede contaminar casi todas las materias primas. Dado que su presencia no se puede eliminar completamente, se tiende a reducir su incidencia y concentración en alimentos a través de medidas de higiene efectivas (Codex Alimentarius, 1996).

Esta bacteria posee dos propiedades que contribuyen especialmente a su amplia diseminación en el medio ambiente: i) a pesar de no formar esporas, es capaz de sobrevivir durante períodos de tiempo prolongados en medios diferentes; y ii) es un microorganismo psicotrofo, es decir, que puede desarrollarse a baja temperatura. Así, esta bacteria crece a una temperatura entre 4 y 45°C, tolera un pH entre 4,3 y 9,4 y una actividad de agua ( $A_w$ ) de 0,92 (adaptado de ICMSF, 1998).

La enfermedad provocada por la ingestión de la bacteria puede manifestarse en forma leve ó severa y toma un promedio de unas 3 semanas para que aparezcan los primeros signos. Lo hace con síntomas parecidos a los de la gripe, tales como fiebre, dolores musculares y escalofríos. A veces se presentan malestares estomacales, como náuseas ó diarrea. Si la infección se propaga hacia el sistema nervioso, pueden presentarse síntomas tales como dolores de cabeza, confusión, pérdida de equilibrio, rigidez del cuello (tortícolis) o convulsiones. Si la mujer embarazada contrae la enfermedad pueden experimentar solo leves síntomas parecidos a los provocados por la gripe, pero la infección puede provocar un parto prematuro y hasta llegar a ser fatal para el feto, dado que puede ser transmitida a través de la placenta. En la embarazada –como en la mayoría de los adultos que contrajeron la listeriosis, la meningitis es la forma más frecuente en que se desarrolla esta infección. Otra sintomatología consiste en la infección de los ojos, con dolor y enrojecimiento, o en la sangre o los ganglios linfáticos. En algunos casos, la infección produce insuficiencia cardiaca.

## **2.2. Importancia de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria.**

*L. monocytogenes* se ha convertido en uno de los principales agentes patógenos transmitidos por los alimentos listos para su consumo (RTE) que afectan principalmente a determinadas poblaciones de riesgo.

En 2011 los principales patógenos transmitidos por los alimentos de mayor a menor número de casos en España fueron: *Campylobacter jejuni*, *Salmonella spp*, *Yersinia enterocolitica* y *Listeria monocytogenes*. De ésta última se declararon 91 casos en todo el territorio nacional, y en concreto 49 casos en personas mayores de 60 años (Boletín Epidemiológico Semanal vol.20, nº 8, 2012).

Son muchos los alimentos tanto crudos como procesados que pueden vehicular *L. monocytogenes*, entre ellos carne y productos cárnicos de vacuno, cerdo, aviar u otras especies, y sobre todo en la presentación de alimentos listos para consumo; también leche cruda, quesos u otros productos lácteos listos para consumo, productos de la pesca, frutas y vegetales.

*L. monocytogenes* tiene características únicas y específicas que le permiten adaptarse fácilmente al entorno alimentario (FSAI, 2005b) (Luber y col., 2011). Se desarrolla adecuadamente a temperaturas de refrigeración, lo que le permite mantener la viabilidad en el interior o en las superficies de los alimentos, que generalmente se conservan a bajas temperaturas. El hecho de que se encuentre ampliamente distribuida en el medio ambiente, facilita que sea altamente contaminante en las plantas procesadoras, llegando a desarrollarse en las superficies de contacto con los alimentos, y pasando incluso al producto final.

Esta bacteria suele llegar a las plantas de procesado mediante la tierra proveniente de los zapatos y la vestimenta del personal que trabaja en la fábrica, así como en el transporte utilizado. También es frecuente que sea transportada por medio de animales que excretan la bacteria o que tengan la piel contaminada, y mediante vegetales crudos contaminados. Todo ello hace que *L. monocytogenes* sea un problema importante en la producción de alimentos, sobre todo en aquellos listos para su consumo en los que la bacteria puede crecer, y que no van a recibir un tratamiento térmico durante la producción, así como para aquellos alimentos que se pueden contaminar durante la producción.

Una característica muy importante de cara a la contaminación en la industria alimentaria es la capacidad de *L. monocytogenes* para formar “biofilms” o biopelículas sobre las superficies de contacto como máquinas loncheadoras y utensilios de acero. Esto dificulta enormemente su eliminación, supone un punto de contaminación, y contribuye a la contaminación cruzada de alimentos.

Debido al riesgo que supone la ingesta de alimentos contaminados con esta bacteria y el hecho de que sea muy difícil, por su ubicuidad, conseguir su ausencia total en la industria alimentaria, se han establecido unos límites de contaminación de los alimentos que son seguros.

Así se ha procedido a la implantación de los sistemas de autocontrol en las industrias alimentarias que persiguen la producción de alimentos seguros, a lo que se une la obligación de cumplir con el Reglamento (CE) N° 2073/2005 (UE, 2005), relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Éste establece que los niveles de *L. monocytogenes* no pueden superar las 100 UFC/g de alimento durante toda la vida útil de un producto. En productos listos para el consumo, que puedan favorecer el crecimiento del patógeno, se requiere la ausencia de la bacteria en 25 g a la salida de fábrica, a menos que el productor pueda demostrar que el producto no superará las 100 UFC/g durante la vida útil.

Es por ello que se están investigando nuevos métodos de control de *Listeria*, que ayuden a reducir los casos de listeriosis y las pérdidas económicas, garantizando alimentos aptos para el consumo.

### **2.3. Métodos de conservación de alimentos: la bioconservación.**

Los métodos tradicionales de conservación de alimentos basados en tratamientos térmicos, aunque eficaces para garantizar su seguridad, tienen algunos efectos negativos sobre el producto, como la pérdida o reducción de ciertos nutrientes y la alteración de sus características sensoriales. Por esta razón, tanto los centros de investigación especializados como los departamentos I+D de las industrias alimentarias están realizando un esfuerzo en desarrollar dos tipos de alternativas: i) nuevas tecnologías de conservación con tratamientos alternativos a los térmicos o mejora de los ya existentes y, ii) búsqueda de procesos de conservación de alimentos sin aplicación de calor, es decir, no térmicos.

Los tratamientos de conservación de alimentos no térmicos, denominados también tecnologías suaves, son poco agresivos y tienen la ventaja de ofrecer productos muy semejantes a los frescos y, por tanto, muy acordes con las demandas actuales del mercado. Se ha observado que los consumidores muestran un rechazo general a las

sustancias añadidas a los alimentos (aditivos artificiales), pero no desean perder las garantías en materia de seguridad alimentaria.

Existe una gran variedad de tratamientos no térmicos, entre los que podemos destacar el uso de campos eléctricos, altas presiones, irradiación o la bioconservación.

La bioconservación es una tecnología alternativa de conservación de alimentos que se basa en la utilización de sustancias naturales o bioconservantes. Dentro de ellos se incluyen los bacteriófagos, la microbiota natural o controlada de los alimentos y/o sus productos antibacterianos. Entre éstos últimos tenemos determinadas sustancias bioquímicas y bacteriocinas, que son antimicrobianos naturales que inhiben microorganismos patógenos y alterantes aumentando la vida útil y la seguridad de los alimentos.

## **2.4. Eficacia de bacterias lácticas, bacteriocinas y bacteriófagos como sistemas de bioconservación.**

### **2.4.1. Bacterias del ácido láctico.**

El consumo de alimentos fermentados parece tener su origen hace más de 7.000 años, en la civilización Sumeria. Las bacterias lácticas son los principales componentes en la elaboración y maduración de productos lácteos fermentados, aunque también podemos encontrar otras bacterias como *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium*, levaduras como *Debaryomyces* y *Kluyveromyces* o mohos como *Penicillium* y *Geotrichum*.

Dentro de las bacterias lácticas se incluye un amplio número de géneros que se definen como bacterias Gram-positivas, generalmente catalasa-negativas, microaerófilas o anaerobias facultativas, no formadoras de esporas y con un contenido de G + C en el ADN inferior a 50–55%. Se encuentran divididas en 11 géneros: *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*.

El desarrollo de determinados patógenos en alimentos refrigerados mínimamente procesados ha despertado el interés por la bioconservación, en la que las bacterias lácticas juegan un papel fundamental.

Puede abordarse inoculando las cepas bacterianas que crecerán y producirán sustancias antagonistas, o bien añadiendo el producto de la fermentación de un microorganismo o dichas sustancias concentradas y/o purificadas.

Estos sistemas de bioconservación no pueden sustituir las buenas prácticas de elaboración, pero ofrecen un parámetro adicional de procesado para mejorar la seguridad y asegurar la calidad de los alimentos.

En la actualidad se considera a las bacterias lácticas microorganismos GRAS (Generally Recognized As Safe) por lo que su utilización y/o la de sus metabolitos como bioconservantes está recibiendo una gran atención (Stiles, 1996). Los principales mecanismos de antagonismo microbiano de las bacterias lácticas son la competencia por nutrientes y la formación de ácido láctico y acético, con el consiguiente descenso del pH.. Además, pueden producir otras sustancias antimicrobianas como etanol, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrógeno, ácido benzoico, isómeros D de aminoácidos, reuterina y bacteriocinas.

#### **2.4.2. Bacteriocinas.**

La aplicación en seguridad microbiológica alimentaria de péptidos antimicrobianos producidos por bacterias ha experimentado un extraordinario avance en los últimos años. Las bacteriocinas son péptidos de pequeño tamaño sintetizados ribosómicamente por bacterias, generalmente catiónicos y anfipáticos.

Las producidas por bacterias lácticas fueron inicialmente descritas por Rogers (1928) al observar la actividad antimicrobiana de *Lc. lactis* frente a *Lb. bulgaricus* debida a un compuesto proteico y termoestable. Posteriormente, Hirsch (1951) sugirió el empleo de cultivos iniciadores productores de nisina para prevenir la formación de gas por *Clostridium* en queso.

Las bacteriocinas de bacterias lácticas presentan un gran interés para la industria alimentaria. Su idoneidad viene determinada por su potencialidad para inhibir a microorganismos patógenos y alterantes de alimentos, capacitándolas para sobrevivir frente a sus competidores, por sus propiedades físico-químicas que les confieren resistencia a tratamientos térmicos, por su pequeño tamaño lo que hace que difundan con relativa facilidad en los alimentos, y su degradación por enzimas digestivas siendo inocuas para el hombre y la microbiota intestinal.

Son varios autores los que han comprobado su eficacia frente a patógenos transmitidos por los alimentos (Tabla 1) y las han catalogado como bioconservantes naturales (Cleveland y col., 2001; Gálvez y col., 2007). De hecho la nisina es la única bacteriocina que está autorizada para su uso como conservante de alimentos en varios países (Cleveland y col., 2001). En 1983, se añadió a la lista europea de aditivos alimentarios como el número E234.

Bacteriocina	Alimento	Agente patógeno (biocontrol)
Nisina	Queso Cheddar Queso Queso en lonchas	<i>L. monocytogenes</i> y <i>S. aureus</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>L. innocua</i> y <i>S. aureus</i>
Nisina	Carne de vacuno Carne de búfalo picada	<i>L. monocytogenes</i> <i>L. monocytogenes</i>
Nisina +CO2	Salmón ahumado	<i>L. monocytogenes</i>
Nisina + Lactoperoxidasa	Sardina	Microbiota de la sardina
Nisina + lactato de sodio	Repollo, brócoli y brotes de soja	<i>L. monocytogenes</i>
Nisina + canela	Zumo de manzana	<i>S. typhimurium</i> y <i>E. coli</i>
Lactinina 3147 en polvo	Yogurt natural. Queso cottage	<i>L. monocytogenes</i>
Pediocina PA-1/ACH	Queso y salsa de queso	<i>L. monocytogenes</i>
Pediocina 5	Leche	<i>L. monocytogenes</i>
Pediocinas	Carne cruda	<i>Listeria sp.</i>

Tabla 1.- Aplicaciones de las bacteriocinas en distintos alimentos. (Gálvez y col., 2008).

Un enfoque común ha sido la obtención de concentrados parcialmente purificados (por lo general en forma de un polvo liofilizado) después del crecimiento de la cepa productora de bacteriocinas. El mejor ejemplo es Nisaplina, que se obtiene después de la fermentación de sustratos a base de leche con una cepa *L. lactis* productora de nisina. Pediocina PA-1/AcH de *Pediococcus acidilactici* también se comercializa en forma de ALTA 2341 como un ingrediente alimentario (Rodríguez y col., 2002).

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 y col., 2010):

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

-Clase II: bacteriocinas no modificadas de pequeño tamaño y estables al calor. Este grupo es el más numeroso y comprende las bacteriocinas de tamaño inferior a 10 kDa, y sin aminoácidos modificados en su estructura. En general, son péptidos catiónicos cortos con altos puntos isoelectrónicos. Dentro de este grupo se encuentra la Pediocina PA-1, que se caracterizan por presentar una fuerte actividad antilisteria. Otros ejemplos son la Coagulina C23, las Sakacinas Ay P y Leucocina A.

-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 Enterolysina A.

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

El modo de acción de las bacteriocinas ha sido ampliamente estudiado, aunque los últimos descubrimientos se han llevado a cabo con la Nisina. Debido a su poder catiónico e hidrofóbico, la mayoría de estos pépticos forman poros en la membrana citoplasmática de las células sensibles. Este proceso induce la disipación de la fuerza protón-motriz (PMF). Ello promueve la salida rápida de metabolitos de pequeño

tamaño, como aminoácidos y nucleótidos, interrumpiendo los procesos de biosíntesis de la célula.

La Nisina y otros lantibióticos utilizan el precursor de lípidos II de la pared celular como una molécula de acoplamiento. De este modo, dos modos de acción, es decir, la inhibición de la biosíntesis de la pared celular y la formación de poros, se combinan dentro de una molécula para producir actividad antimicrobiana. Esta estrategia también es utilizada por otros lantibióticos y bacteriocinas que no forman poros tales como la Lcn972. Recientemente se ha demostrado que varias clases de bacteriocinas del tipo II utilizan un componente asociado a la membrana del sistema manosa-fosfotransferasa como receptor específico en las células diana (García y col., 2010).

### **2.4.3. Los bacteriófagos.**

#### **2.4.3.1. Características generales.**

Los bacteriófagos fueron descubiertos de forma independiente por los microbiólogos Frederick W. Twort (1915) y Félix d'Hérelle (1917), siendo la última clase principal de virus en ser descubierta. Éstos fueron los primeros en demostrar la existencia de virus específicos para las bacterias, por lo que d'Hérelle los denominó bacteriófagos (comedores de bacterias).

A partir de la década de 1930, virólogos pioneros como Salvador Luria, Max Delbrück y muchos otros, utilizaron los fagos como modelo para investigar muchos aspectos de la virología general como la estructura de los viriones, la morfogénesis, la genética y la replicación.

Hasta el momento, se han examinado al microscopio electrónico aproximadamente 5500 bacteriófagos, que según su morfología pertenecen a 14 familias ya clasificadas, y a 5 familias más que aún están pendientes de clasificación (Ackermann, 2009). Dicha clasificación se realiza no sólo en función de las características morfológicas, sino también según el tipo de ácido nucléico y la presencia o ausencia de una cubierta externa (Tabla 2). El 96% de los fagos descritos hasta el momento pertenecen al orden *Caudovirales*, que a su vez se divide en tres familias, en función de la complejidad y longitud de su cola: *Myoviridae* (cola larga, contráctil), *Siphoviridae* (cola larga, no contráctil) y *Podoviridae* (cola corta).

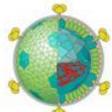
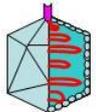
	CON ENVUELTA	SIN ENVUELTA
A D N	<p><b>ADN de doble cadena</b></p> <p><u>Circular</u></p>  <p><i>Plasmaviridae</i></p> <p><u>Lineal</u></p>  <p><i>Lipothixviridae</i></p> <p><u>Fuselloviridae</u></p>  <p><i>Fuselloviridae</i></p> <p><u>Guttaviridae</u></p>  <p><i>Guttaviridae</i></p>	<p><b>ADN de doble cadena</b></p> <p><u>Circular</u></p>  <p><i>Corticoviridae</i></p> <p><u>Lineal</u></p>  <p><i>Myoviridae</i></p>  <p><i>Siphoviridae</i></p>  <p><i>Podoviridae</i></p>  <p><i>Rudiviridae</i></p>  <p><i>Tectiviridae</i></p>
	<p><b>ARN de cadena doble: lineal</b></p>  <p><i>Cystoviridae</i></p>	<p><b>ADN monocatenario</b></p> <p><u>Circular</u></p>  <p><i>Microviridae</i></p> <p><u>Lineal</u></p>  <p><i>Inoviridae</i></p>
A R N		<p><b>ARN monocatenario: lineal</b></p>  <p><i>Leviviridae</i></p>

Tabla 2: Clasificación de los bacteriófagos según su morfología y ácido nucleico (Ackermann, 2009).

Los bacteriófagos más abundantes pertenecen a la familia *Siphoviridae* y están formados por una cápsida con forma icosaédrica, compuesta por proteínas, en la cual se encuentra el genoma, que es ADN lineal de doble cadena. Presentan una cola que está unida a la cápsida, a través del cuello, formada también por proteínas y que puede llevar fibras en las que se encuentran los receptores para el reconocimiento y unión a la bacteria.

Desde el punto de vista funcional, los fagos se clasifican en función de su ciclo de vida en líticos obligados (ciclo de vida lítico) y atemperados (ciclo de vida lisogénico). Durante el proceso de infección, el fago se adhiere y fija a la envuelta bacteriana, y a continuación inyecta su material genético. Tras esta etapa, el fago puede realizar un ciclo lisogénico, en el que integra su ADN en el material genético de la bacteria huésped, multiplicándose éste en los procesos de división de la célula, o puede realizar

un ciclo lítico en el que se forman nuevas partículas virales que son liberadas de la célula tras romper la pared celular. A partir de las células lisogénicas se puede inducir un ciclo lítico por liberación del profago (Figura 3).

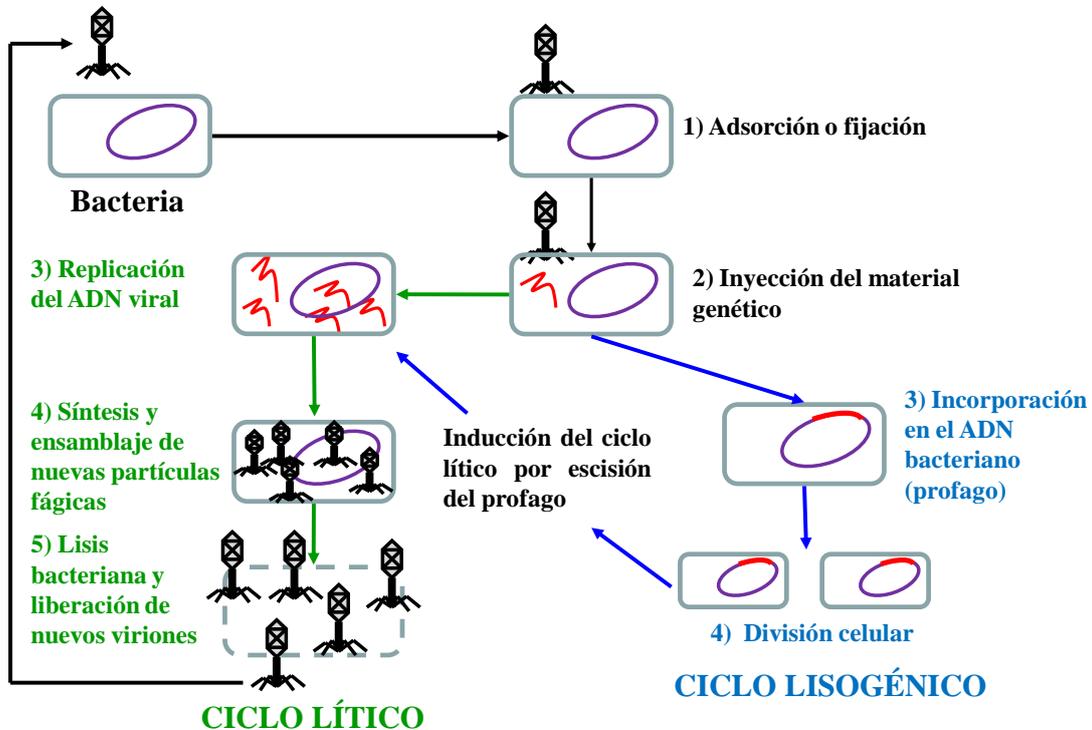


Figura 3. Representación esquemática de las diferentes etapas de los ciclos de vida de un bacteriófago (Gutiérrez, D. 2010).

#### 2.4.3.2. Aplicaciones de los bacteriófagos como antimicrobianos.

En la época pre-antibiótica, se prestó una notable atención al posible uso de los fagos como agentes terapéuticos frente a infecciones bacterianas, aunque la terapia fágica sólo llegó a ser usada de forma habitual en la Unión Soviética y Europa del Este (Sulakvelidze y col., 2005). En la actualidad se está retomando su estudio como alternativa a los antibióticos debido al aumento en los últimos años de cepas resistentes a los mismos (Matsuzaki y col., 2005), de hecho ya existen en el mercado algunos productos para el tratamiento tópico de infecciones como el PhageBioderm (Georgia).

Por otro lado, los bacteriófagos están siendo investigados por su potencial uso como agentes de control biológico natural para los problemas ambientales, en concreto para el tratamiento de aguas residuales y el tratamiento de fangos. Aunque son pocos los estudios que se han llevado a cabo hasta ahora, éstos han reportado resultados muy prometedores.

En la actualidad, debido a la demanda de productos poco procesados así como el consumo de alimentos listos para el consumo, se están investigando nuevos métodos de bioconservación entre los que se incluye la utilización de los fagos como agentes antimicrobianos (García y col., 2010).

A lo largo de la cadena alimentaria encontramos diversos estudios que demuestran el beneficio que implicaría el uso de los fagos para garantizar la seguridad alimentaria (Tabla 3).

Algunos de estos usos, son:

-Producción primaria: el uso de la terapia fágica contribuye a reducir bacterias no deseables en animales y plantas, lo que permite la eliminación de las mismas en la materia prima, que suele ser la mayor fuente de contaminación de los alimentos (Tabla 3).

-Industria alimentaria: la desinfección de superficies de trabajo y equipos, eliminando los biofilms, ya que son una de las principales causas de contaminación de los alimentos durante su elaboración.

-Producto final: los bioconservantes basados en fagos o en proteínas derivadas de ellos tiene como fin alargar la vida útil de los alimentos, evitando el crecimiento de bacterias patógenas y alterantes (Tabla 3).

-Control higiénico-sanitario: la detección y control de patógenos a lo largo del proceso de producción mediante fagos y proteínas derivadas de ellos con alta especificidad, permite aumentar la seguridad de los alimentos (Rees y Dodd, 2006).

-Tecnología de barreras: la combinación de distintos métodos de conservación de alimentos aumenta la eficacia de los mismos. Los fagos y sus proteínas pueden combinarse con otros métodos de conservación como las bacteriocinas (Martinez y col., 2008).

Bacteria patógena	Alimento (Biocontrol)	Animal (Terapia fágica)
<i>E. coli</i> O157:H7	Carne de ternera (1)	Ovejas (1) Ganado vacuno (1)
<i>Salmonella enteritidis</i>	Queso (1) Frutas (1) Carne de pollo (1) Salchichas (1)	Pollos (1)
<i>Salmonella typhimurium</i>	Carne de vacuno (1)	
<i>Campylobacter jejuni</i>	Carne de pollo (1) Carne de vacuno (1)	Pollos (1)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Frutas (1) Queso (1) Queso (2) Prod. cárnicos de pollo (3) Leche de soja (6)	
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Leche maternizada (1)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cuajada (1)	
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Plantas (5) Plantas (4)	

**Tabla 3. Aplicaciones de los bacteriófagos destinados a la mejora de la Seguridad Alimentaria (1) García y col, 2010. (2) Guenther y col., 2011. (3) Bigot y col., 2011. (4) Fujiwara y col., 2011. (5) Adriaenssens y col., 2012. (6) Hui Zhang y col., 2012**

El interés mostrado por la industria alimentaria para la aplicación de bacteriófagos se debe a que éstos presentan unas características muy adecuadas como son su alta especificidad, no interfiriendo en los cultivos iniciadores o “starters”, y su inocuidad para el hombre y el medio ambiente ya que no infectan a células eucariotas.

Sin embargo, han de tenerse en cuenta una serie de consideraciones antes de su uso en los alimentos, como son:

- Generación de resistencias: para evitar la aparición de bacterias resistentes a los fagos, se deben incluir mezclar de bacteriófagos de grupos diferentes, de este modo la probabilidad de mutaciones espontáneas que confieran resistencia a más de un bacteriófago será muy baja garantizando su efectividad.

- Dosis efectiva: Se requiere una concentración mínima de fagos para lisar de manera efectiva toda la población, ello implica determinar la relación óptima entre fagos y bacterias (multiplicidad de infección) que asegure una descontaminación eficaz.
- Virulencia: Los bacteriófagos pueden llevar factores de virulencia que afecten a la bacteria huésped, es por ello necesario la secuenciación del genoma fágico antes de su inclusión en un preparado comercial.

Señalar que la FDA (“Food and Drug Administration” USA) ya ha aprobado varios productos para eliminar *L. monocytogenes* en productos alimenticios. Así, Listex P100 (Mireos BV, Wageningen, Holanda) fue aprobado en el año 2006 para su uso en quesos y combina seis fagos, estando además reconocido como producto GRAS que permite su aplicación en todo tipo de alimentos. Un producto similar es ListShield™ (Intralix, Baltimore, USA).

## **2.5. Estudios de resistencia cruzada y sinergismo.**

El uso de bacteriocinas en alimentos presentan una serie de limitaciones debidas en parte a su reducido espectro de inhibición y a su falta de eficacia frente a bacterias Gram-negativas, así como al desarrollo de resistencia entre las bacterias diana lo que podría comprometer su uso para controlar patógenos transmitidos por alimentos.

Se han descrito variantes resistentes a nisina en muchos microorganismos incluyendo *L. monocytogenes* (Gravesen y col., 2002, Martínez y col., 2005), *L. innocua* (Maisnier-Patin y Richard, 1996), *C. botulinum* (Mazzotta y col., 1997), *Streptococcus thermophilus* (Garde y col., 2004), *S. aureus* (Peschel y col., 1999) y *Streptococcus bovis* (Mantovani y Russell, 2001).

Los mecanismos más comunes asociados con la aparición de variantes de *Listeria* resistentes a nisina y otros gram positivos son aquellos que impiden la formación de poros. La producción de exopolisacáridos, una pared celular más gruesa y modificaciones en su composición hacen que la pared sea más rígida (Peschel, 2002; Margolles, 2001).

Un problema adicional es si la resistencia a una clase de bacteriocina LAB puede resultar en una resistencia cruzada con otra clase de bacteriocina (Bouttefroy y Milliere,

2000). Sin embargo, la naturaleza química muy diversa de las bacteriocinas propone modos de acción diferentes, lo que conduce a pensar que una resistencia cruzada es más difícil de obtener. No obstante, se ha demostrado resistencia cruzada entre diferentes bacteriocinas dentro de la clase IIa (Vignolo y col., 2000) y, entre nisina y AMPs péptidos antimicrobianos sintéticos (Martinez y col., 2005).

También se ha constatado resistencia cruzada usando métodos combinados como nisina y otros antimicrobianos como son los bacteriófagos. En este caso el uso de nisina inducía cambios en la pared celular de *Staphylococcus aureus* creando cepas resistentes a la misma y a su vez también a los bacteriófagos utilizados. En contraste, las cepas resistentes al bacteriófago no necesariamente eran resistentes a la nisina (Martinez y col., 2008).

Por otro lado la aparición de resistencia a fagos es algo que también se ha constatado por varios autores (Bigot y col., 2011; Bigwood y col., 2007; Mizoguchi y col., 2003; Dinsmore y col., 1995) sin embargo, en este aspecto el uso de fagos tiene varios puntos favorables respecto al uso de antibióticos o bacteriocinas: por un lado se ha demostrado que los fagos coevolucionan con las bacterias huéspedes, de manera que la aparición de bacterias resistentes trae aparejada la aparición de nuevos fagos capaces de infectarlas (Montag col., 1987, Drexler y col., 1991), además, la proliferación de bacterias resistentes a un fago es mucho mayor cuando la infección se produce sobre un cultivo bacteriano puro que cuando se realiza sobre una mezcla de bacterias (algunas de las cuales no son sensibles al fago), pues su crecimiento se ve limitado por la competencia con las otras bacterias del entorno (Harcombe y Bull, 2005), y en el caso de bacterias Gram-negativas, donde el receptor se encuentra en la cápsula o es un antígeno de superficie, los mutantes resistentes carecen de cápsula o LPS y son, por lo tanto, menos virulentos.

Entre las soluciones planteadas para paliar las limitaciones del empleo de ambos antimicrobianos en alimentos se encuentra el uso de tratamientos combinados, conocido como tecnología de barreras (Leistner, 2000).

La aplicación adecuada de esta tecnología de barreras u obstáculos ha demostrado tener ventajas en la calidad y seguridad del alimento, así como económicas. El uso de distintos tratamientos inhibitorios con efecto sinérgico puede dar lugar a alimentos menos procesados pero más eficientemente conservados. En la práctica, es preferible el

uso de diferentes agentes antimicrobianos en pequeñas cantidades que usar uno sólo en mayor cantidad.

Son varios autores los que han informado sobre el efecto sinérgico observado cuando se usan bacteriocinas, fagos o ambos combinados.

La nisina actúa de forma sinérgica con diversos antimicrobianos incluyendo quelantes (Fang y Tsai, 2003), sustancias de bajo peso molecular de las plantas (Ettayebi y col., 2000), reuterina (Arqués y col., 2004) y proteínas tales como lisozima y lactoferrina (Branen y Davidson, 2004). La sakacina P también actuó sinérgicamente contra *E. coli* en peces cuando se emplea en combinación con el péptido antimicrobiano pleurocidin (Luders y col., 2003).

Así mismo, la combinación de nisina y bacteriófagos líticos también demostró ser eficaz para el control de *L. monocytogenes* en frutas recién cortadas (Leverentz y col., 2003). También se observó efecto sinérgico al combinar nisina y dos fagos líticos contra *S. aureus* en leche pasteurizada (Martínez y col., 2008).

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Cepas bacterianas, bacteriófagos y condiciones del cultivo.

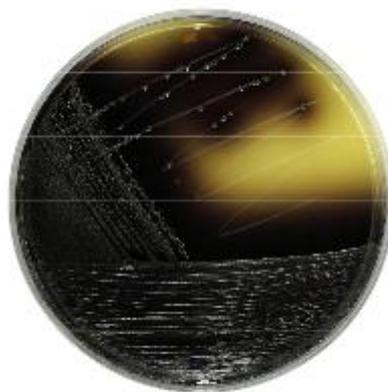
La cepa utilizada como huésped de los fagos fue *L. monocytogenes* 2000/47, aislada de un brote de listeriosis asociada a alimentos listos para consumo de origen cárnico en Nueva Zelanda (Sim y col., 2002). Esta cepa fue facilitada amablemente por el Doctor C. Billington (ESR, Christchurch, Nueva Zelanda). Otras cepas de *Listeria* utilizadas en el trabajo así como las cepas de las que se obtuvieron las bacteriocinas quedan especificadas en la Tabla 4:

<u>Cepa</u>	<u>Características</u>	<u>Origen</u>
<i>L. monocytogenes</i> 2000/47		ESR ,Nueva Zelanda
<i>L. monocytogenes</i> 1		Quesos asturianos (1)
<i>L. monocytogenes</i> 2		Quesos asturianos (1)
<i>L. monocytogenes</i> 3		Quesos asturianos (1)
<i>L. monocytogenes</i> 4	Resistente a pediocina PA1	Quesos asturianos (1)
<i>L. monocytogenes</i> 4R1	Resistente a nisina	IPLA (2)
<i>L. monocytogenes</i> 22		Quesos asturianos (1)
<i>L. monocytogenes</i> 37		Quesos asturianos (1)
<i>L. monocytogenes</i> 41		Quesos asturianos (1)
<i>L. monocytogenes</i> 41R3	Resistente a nisina	IPLA (2)
<i>L. monocytogenes</i> 412		Carne de cerdo (4)
<i>L. monocytogenes</i> 412N	Resistente a nisina	Dinamarca (4)
<i>L. monocytogenes</i> 412P	Resistente a pediocina PA1	Dinamarca (4)
<i>L. monocytogenes</i> 412NP	Resistente a nisina y PA1	Dinamarca (4)

<i>L. monocytogenes</i> 409		Dinamarca (3)
<i>L. monocytogenes</i> 409N	Resistente a nisina	Dinamarca (3)
<i>L. monocytogenes</i> 322		Carne de cerdo (4)
<i>L.monocytogenes</i> CECT4032		Reino Unido (8)
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> IPLA C23	Bacteriocina C23	IPLA (5)
<i>Lactococcus lactis</i> IPLA C270	Bacteriocina Ltc481	IPLA (5)
<i>Lactobacillus plantarum</i> LL441	Bacteriocina Plnc441	IPLA (7)

**Tabla 4: Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo. (1) Margolles y col., 1998. (2) Martínez y col., 2005. (3) Garvesen y col., 2001. (4) Garvesen y col., 2002. (5) Rilla Villar, 2003. (6) Martínez y col., 1995. (7) González y col., 1994. (8) Colección española de cultivos tipo.**

Todas las cepas de *Listeria* fueron inoculadas en medio líquido de triptona-soja (TSB) (Scharlau, Barcelona, España) para obtener cultivos puros que se mantuvieron a -80 °C en TSB+glicerol al 10%. Para recuperar estas cepas congeladas y garantizar que no hubiese ningún tipo de contaminación se sembraron por estrías en agar OXFORD (Scharlau) (Figura 4), selectivo para *Listeria sp.* Se incubaron a 32°C durante 48 horas y se conservaron en refrigeración entre 4°C y 8°C.



**Figura 4. Crecimiento de *L. monocytogenes* en medio Oxford (<http://www.cect.org/>).**

Para las obtención de bacteriocinas, las cepas de *Lactococcus* se cultivaron en medio M17 (agar y caldo) (Biokar, Bioser, Barcelona, España) 24 horas a 37°C y las cepas de *Lactobacillus* en medio MRS (agar y caldo) (Biokar) durante 48 horas a 32°C.

Los bacteriófagos utilizados fueron FWLLm1 y FWLLm3, cedidos por el Dr. Billington, los cuales infectan a *L. monocytogenes*. Se conservaron a -80°C, en SM-glicerol al 10% (v/v). La propagación de los bacteriófagos de *L. monocytogenes* se llevó a cabo en medio TSA semisólido (agar 0.7% p/v) y sólido (agar 2% p/v) dependiendo de su uso posterior. Los cultivos se incubaron a 32°C sin agitación. Además, los medios se suplementaron con MgSO<sub>4</sub> y Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (concentración final 10 mM).

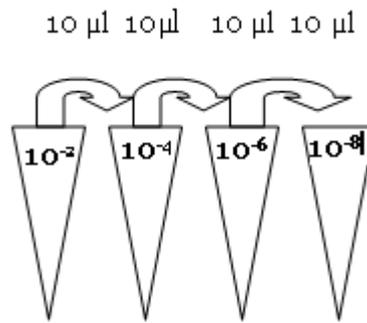
## **3.2. Bacteriófagos.**

### **3.2.1 Propagación de bacteriófagos.**

#### **3.2.1.1. Propagación en medio sólido y cálculo de título.**

La propagación se realizó en placas de medio sólido finas TSB al 2% a las que se añadió la suspensión fágica necesaria para obtener una lisis confluyente o semiconfluyente siguiendo el método de la doble capa. Éste consiste en inocular en 3 ml de medio semisólido TSB al 0,7% fundido y suplementado con Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y MgSO<sub>4</sub> (10 mM de concentración final), 200µl de cultivo de una noche de la bacteria hospedadora (*L. monocytogenes*) y 100µl de la suspensión fágica. Ésta mezcla se vierte sobre las placas finas de medio sólido. Se deja secar el agar y se incuba a 32°C una noche. Al día siguiente, sobre las placas se añaden 2 ml de SM (Tris HCl 20 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 100 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 10 mM, gelatina 0,1%, pH 7,5) y se dejan en agitación suave durante 2 horas. Se recoge el sobrenadante, se centrifuga a 16100 rpm durante 30 minutos, se pasa a través de un filtro de poro de 45µm y se titula.

Para calcular el título de una suspensión fágica se realizaron diluciones seriadas de la misma en tampón SM (Figura 5). A continuación se utilizaron 100 µl de cada una de ellas para sembrar placas mediante el método de doble capa. Las placas se incubaron a 32°C y al día siguiente se contaron las placas de lisis en la dilución más baja en la que aparecen aisladas, cuyo número oscilase ente 30 y 300.



**Figura 5. Método de dilución de una suspensión de fago. A la dilución -2 se añaden 10 µl del fago inicial y luego se añaden 10 µl de esta a la dilución -4 y así sucesivamente.**

El título de la suspensión inicial (UFP/ml) se calcula mediante la fórmula:

$$\text{UFP/ml} = N \times 1/C \times 1/V$$

Dónde N es el número de placas de lisis que aparecen aisladas, C es la dilución de fago que se usó y V es el volumen de la suspensión de fago que se añade en la placa.

### 3.2.1.2. Propagación en medio líquido y cálculo de la MOI óptima.

Para la propagación en medio líquido se partió de una suspensión fágica con una concentración de  $1.6 \times 10^9$  UFP/ml para el fago FWLLm1 y  $9 \times 10^7$  UFP/ml para el fago FWLLm3. El proceso de infección se realizó en volúmenes de 2 ml. Se inoculó el medio líquido con el cultivo de una noche al 1% y se incubó hasta una  $DO_{600}$  de 0,1. Se diluyó 1:10 para obtener un  $DO_{600}$  de 0,01. Se utilizaron ambas densidades por separado, se suplementó con  $Ca(NO_3)_2$  y  $MgSO_4$  y se infectó con 200 µl de cada fago por separado (Tabla 5). Estas concentraciones equivalen a una multiplicidad de infección (MOI) distintas, entendiendo por MOI al número de fagos (UFP/ml) dividido por el número de bacterias hospedadoras (UFC/ml).

<u>Control</u>	<u>C+F1</u>	<u>C+F3</u>	<u>C+F1</u>	<u>C+F3</u>
-2 ml cultivo (1)	-2 ml cultivo (1)	-2 ml cultivo (1)	-2 ml cultivo (2)	-2 ml cultivo (2)
-20µlCa(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>				
-20µl MgSO <sub>4</sub>				
	-200 µl F1	-200 µl F3	-200 µl F1	-200 µl F3

**Tabla 5. Propagación de los bacteriófagos en medio líquido a DO distintas. (1) DO<sub>600</sub> 0,1. (2) DO<sub>600</sub> 0,01**

Al cabo de 4 horas, los cultivos infectados se centrifugaron a 16.100 r.p.m. durante 5 min. Los sobrenadantes se filtraron y se titularon. Para ello se hicieron diluciones decimales seriadas. A cada microtubo se añadieron 200 µl de cada dilución de la suspensión fágica, 200 µl de la bacteria indicadora, 20 µl de CaCl<sub>2</sub> 1M y 20 µl MgSO<sub>4</sub>, incubando la mezcla 15 min a 32°C. Posteriormente, se añadió el contenido del microtubo a una placa de TSA, utilizando el método de la doble capa, y se incubó a 32°C durante 24 horas, tras las cuales se realizó el recuento de las placas de lisis.

### 3.2.2. Determinación de la MIC de los bacteriófagos.

Esta prueba se realizó con la finalidad de obtener la concentración mínima inhibitoria (MIC), que se define como la mínima concentración del compuesto antimicrobiano que se necesita para inhibir el crecimiento de un microorganismo después de 24 h de incubación (Madigan y col., 1998).

Para ello se inocularon 200 µl de un cultivo o/n de *L. monocytogenes* en 20 ml de TSB y se incubaron a 37°C hasta obtener una DO<sub>600</sub> de 0,1 ( $8.2 \times 10^8$  UFC/ml), que fue posteriormente hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.01 ( $8.2 \times 10^7$  UFC/ml).

En una placa microtiter se hicieron diluciones seriadas de los bacteriófagos FWLLm1 y FWLLm3 para obtener varias concentraciones. En el caso del fago FWLLm1, las concentraciones oscilaron entre  $4 \times 10^8$  UFP/ml (pocillo A1) hasta  $3,9 \times 10^5$  UFP/ml (pocillo A11), y para el fago FWLLm3 entre  $2,25 \times 10^7$  UFP/ml (pocillo C1) hasta  $2,2 \times 10^4$  UFP/ml (pocillo C11). Para ello se añadieron 50 µl de TSB a todos los pocillos, excepto en la primera columna. A ésta se añadieron 100 µl de fago, 50 µl mismote los cuales se pasaron al segundo pocillo, y así sucesivamente hasta obtener 10

diluciones. Como control negativo se utilizó TSB, y como control positivo solo la bacteria. A todos los pocillos, menos al control negativo, se adicionaron 150 µl de cultivo a DO<sub>600</sub> 0,01 y se incubó a 32°C, sin agitación, durante 24 horas (Figura 6).

La concentración de fago del último pocillo donde no hubo crecimiento se consideró la concentración mínima inhibitoria. Todos estos experimentos se realizaron por duplicado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100µl F1										-	+
B	100µl F1										-	+
C	100µl F3										-	+
D	100µl F3										-	+
E												
F												
G												
H												

Figura 6: Determinación de la MIC de los bacteriófagos en placa microtiter. (+) Control positivo. (-) Control negativo. □ Pocillos con bacteria indicadora

### 3.2.3.-Determinación del rango de huésped de los fagos.

Para hacer este ensayo se utilizó el protocolo denominado test del “spot” o “gota”. Se ensayaron como cultivos hospedadores 11 cepas de *Listeria* de la colección (Tabla 4), las cuales se enfrentaron con 5 µl de una suspensión fágica mediante el método de la doble capa. Este ensayo requiere cultivos o/n de las cepas en las que se quiere estudiar sensibilidad o resistencia al fago, y diluciones de las suspensiones de los fagos a estudiar.

A una placa de TSA se añadieron 200 µl del cultivo o/n de la cepa potencialmente indicadora resuspendidos en 3 ml de TSA semisólido (método de la doble capa), sobre el que se depositan gotas (5 µl) de la suspensión fágica. El césped de las cepas sensibles debería mostrar una zona de lisis en el lugar donde se depositaron las gotas.

Por otro lado, se mezclaron 200 µl del cultivo o/n de cada una de las cepas con 100 µl de diluciones seriadas en SM de las suspensiones fágicas, y la mezcla se añadió a 3 ml de TSA semisólido suplementado con 20 µl de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y 20 µl de MgSO<sub>4</sub>, y se

vertió sobre una placa de TSA. Tras la incubación a 32°C durante una noche, se realizó el recuento del número de UFP/ml, y se calculó la *eficiencia de plaqueo* (EOP) de los fagos frente a cada una de las cepas sensibles, *dividiendo el número de placas de lisis obtenidas sobre una determinada cepa entre el número de placas de lisis obtenido sobre la cepa de referencia, utilizada habitualmente para la propagación del fago.*

### 3.2.4 Identificación de cepas resistentes a los fagos.

Aquellas cepas que se sospechaba eran resistentes a los fagos se incubaron en 3 ml de medio TSB a 32°C durante 24 horas. De este cultivo se sembraron 200 µl en una placa de TSA mediante la técnica de la doble capa.. Se colocaron 5 µl de una suspensión de fago en el centro de la placa y se incubó a 32°C durante 24 horas observando la presencia o no de lisis.

## 3.3. Bacteriocinas.

### 3.3.1. Obtención de bacteriocinas.

Las bacteriocinas utilizadas en este trabajo fueron C23, plantaricina C (441), nisina y lacticina 481, producidas por las cepas indicadas en la Tabla 4. Además, se utilizó nisina purificada comercial (Applin and Barret. UK). Las cepas se conservaron a -80°C en medio líquido suplementado con 10% de glicerol.

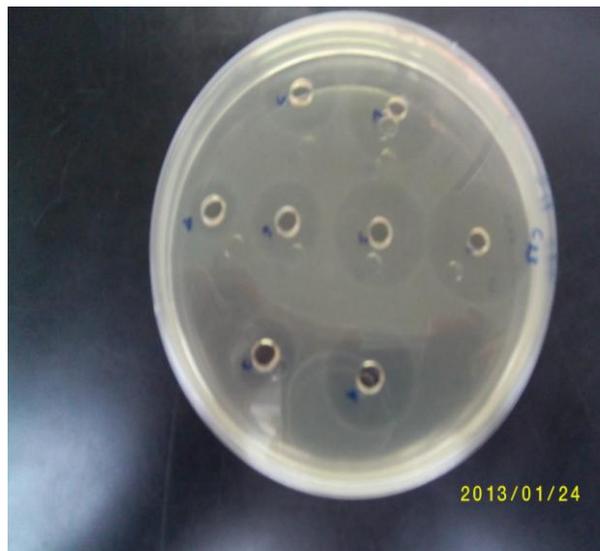
Las cepas bacteriocinogénicas se inocularon al 1% (v/v) en un matraz con 100 ml de medio M17 para *Lactococcus* M17 y MRS para *Lactobacillus*. Se incubaron a 32°C y 37°C, respectivamente, hasta fase exponencial, recogiendo el sobrenadante por centrifugación.

Para obtener cada una de las bacteriocinas se mezclaron 90 ml de sobrenadante con 10 ml de TCA al 100% (p/v) durante 1 hora a 4°C. Se descartó el sobrenadante una vez centrifugado (r.p.m, tiempo) y el precipitado se secó en un termobloque CH-100 (Biosan Laboratories, Inc., MI, USA) a 37°C. El precipitado fue disuelto en 5 ml de tampón fosfato sódico 50 mM pH 6.8.. Tras una segunda centrifugación, se descartó el precipitado, y el sobrenadante se ajustó el pH a 5.5-6.5 con NaOH. La suspensión se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa (VWR International, 0.45 µm de diámetro de poro) y se congeló a -20°C.

### 3.3.2. Cuantificación de la actividad de las bacteriocinas.

Para cada una de las bacteriocinas se cuantificó su actividad frente a *L. monocytogenes* 2000/47. La actividad inhibitoria se determinó de manera semicuantitativa por el método de la dilución crítica (Mayr-Harting y col., 1972). Se definió una **unidad arbitraria** (UA/ml) como el inverso de la dilución más alta que originaba un halo de inhibición perceptible.

Para ello, se utilizó un cultivo o/n de la cepa indicadora. Se hizo una dilución 1:10 y se añadieron 100  $\mu$ l del cultivo a 100 ml de medio TSA (1.2% agar) agitando sin formar burbujas. El contenido se repartió en 5 placas estériles. A continuación, con un sacabocados estéril se hicieron pocillos sobre el medio (Figura 7).



**Figura 7.** Halos de inhibición de las bacteriocinas sobre *L. monocytogenes* 2000/47.

Utilizando una placa microtiter, se hicieron diluciones seriadas de factor 2 en tampón NaPi 50 mM pH 6.8, conservado en refrigeración, en un volumen final de 50  $\mu$ l.

Una vez hechas las diluciones para cada bacteriocina, se añadieron 20  $\mu$ l de cada dilución a cada uno de los pocillos de la placa con la cepa indicadora. Las placas se incubaron a 32°C 24 horas. Se observaron halos de lisis en los casos en que *L. monocytogenes* 2000/47 era sensible a las bacteriocinas.

### 3.3.3. Determinación de la MIC de las bacteriocinas.

Esta prueba se realizó con la finalidad de obtener la concentración mínima inhibitoria (MIC), que se define como la mínima concentración del compuesto antimicrobiano que se necesita para inhibir el crecimiento de un microorganismo después de 24 h de incubación (Madigan y col., 1998).

Para ello, se inocularon 200 µl de un cultivo o/n de *L. monocytogenes* en 20 ml de TSB y se incubó a 37°C hasta obtener una DO<sub>600</sub> de 0,1 ( $8.2 \times 10^8$  UFC/ml), que se diluyó hasta 0,01 ( $8.2 \times 10^7$  UFC/ml).

En una placa microtiter se hicieron diluciones seriadas de orden 2 de las bacteriocinas para obtener las siguientes concentraciones: C<sub>23</sub> (3200 - 3,12 UA/ml), y nisina (800 - 0,78 UA/ml). Al primer pocillo se añadieron 100 µl de bacteriocina, y a los siguientes 50 µl de TSB, para llevar a cabo diluciones seriadas. Como control negativo se utilizó TSB, y como control positivo la bacteria indicadora. A todos los pocillos, menos al control negativo, se adicionaron 150 µl de cultivo (DO<sub>600</sub> 0,01) y se incubó a 32°C sin agitación durante 24 horas (Figura 8).

La concentración de bacteriocina del último pocillo donde no hubo crecimiento se consideró la concentración mínima inhibitoria. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100µl Bacteriocina										-	+
B											-	+
C											-	+
D											-	+
E											-	+
F											-	+
G											-	+
H											-	+

Figura 8. Determinación de la MIC de las bacteriocinas en placa microtiter. (+) Control positivo. (-) Control negativo. □ 150µl de la bacteria indicadora.

### 3.3.4. Identificación de cepas resistentes a bacteriocinas.

Aquellas cepas que podrían ser resistentes a las bacteriocinas se incubaron en 3 ml de medio TSB a 32°C durante 24 horas. De este cultivo se hizo una dilución 1:10 y se

añadieron 100 µl a 100 ml de medio TSA (1.2% agar). El contenido se repartió en placas estériles, en las que se practicaron pocillos con un sacabocados estéril. A cada pocillo se añadieron 20 µl de bacteriocina y se incubó a 32°C durante 24 horas, observando la presencia o no de halo de lisis.

### 3.4. Ensayos de sinergismo.

Estas pruebas se realizaron para estudiar el posible efecto sinérgico entre los fagos FWLLm1y FWLLm3 y las bacteriocinas que mostraron actividad sobre *L. monocytogenes* 200/47. Se hicieron tres tipos de experimentos con combinaciones de FWLLm1, FWLLm3, nisina y C23.

#### 3.4.1. FWLLm1 y FWLLm3.

Se prepararon 4 tubos denominados respectivamente Control, F1, F3 y F1+F3. Se partió de una suspensión fágica de  $1,6 \times 10^9$  UFP/ml para el Fago FWLLm1 y de  $9 \times 10^7$  UFP/ml para el Fago FWLLm3. Se inocularon 20 ml de medio TSB con 200 µl de un cultivo de una noche de *L. monocytogenes* y se incubaron en agitación a 37°C hasta obtener una  $DO_{600}$  de 0,1 ( $8,2 \times 10^8$  UFC/ml), haciendo posteriormente una dilución 1:10 para obtener una  $DO_{600}$  de 0,01 ( $8,2 \times 10^7$  UFC/ml).

A cada uno de los tubos se añadieron 2 ml de cultivo ( $DO_{600}$  0,01), 20 µl de  $Ca(NO_3)_2$  y 20 µl de  $MgSO_4$ . Además, al tubo F1 se añadieron 500µl de FWLLm1, al tubo F3 500 µl de FWLLm3 y al tubo F1+F3 500 µl de cada uno de ellos (Tabla 6).

<u>Control</u>	<u>C + F1</u>	<u>C + F3</u>	<u>C + F1+F3</u>
-2 ml cultivo	-2 ml cultivo	-2 ml cultivo	-2 ml cultivo
-20µl $Ca(NO_3)_2$	-20µl $Ca(NO_3)_2$	-20µl $Ca(NO_3)_2$	-20µl $Ca(NO_3)_2$
-20µl $MgSO_4$	-20µl $MgSO_4$	-20µl $MgSO_4$	-20µl $MgSO_4$
	-500 µl F1	-500 µl F3	-500 µl F1
			-500µl F3

Tabla 6: Inhibición de *L. monocytogenes* con fagos.

Todos los tubos se incubaron a 32°C, sin agitación, y se tomaron muestras cada 2 horas. En cada muestra se determinó el número de bacterias viables (UFC/ml) y el título fágico (UFP/ml). Para calcular el número de bacterias viables se hicieron diluciones seriadas de orden 2 (no se hicieron diluciones decimales??). De cada una de ellas se sembraron, mediante asa, 100 µl en placas de TSA y se incubaron a 32°C, 24 horas. Al día siguiente se contaron las colonias. Para determinar el título fágico, se hicieron diluciones seriadas de orden 2 y se sembraron mediante doble capa (200µl de un cultivo o/n de la cepa indicadora y 100 µl de cada dilución fágica). Las placas se incubaron a 32°C y al día siguiente se contaron las placas de lisis.

### 3.4.2. Nisina, FWLLm1 y FWLLm3.

Se prepararon 6 tubos denominados respectivamente Control, Nisina, F1, F3, Nisina+F1, Nisina+F3. A cada uno de ellos se añadieron 2 ml de cultivo de DO<sub>600</sub> 0,01 ( $8,2 \times 10^7$  UFCml), 20 µl de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 20 µl de MgSO<sub>4</sub>, 500 µl de Fago FWLLm1 y de Fago FWLLm3, y nisina en una concentración subinhibitoria (Tabla 7).

<u>Control</u>	<u>C + F1</u>	<u>C + F3</u>	<u>C+Nisina</u>	<u>C+F1+Nisina</u>	<u>C+F3+Nisina</u>
-2 ml cultivo	-2 ml cultivo	-2 ml cultivo	-2 ml cultivo	-2 ml cultivo	-2 ml cultivo
-20µl Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-20µlCa(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-20µlCa(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-20µlCa(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-20µl Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-20µlCa(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
-20µl MgSO <sub>4</sub>	-20µl MgSO <sub>4</sub>	-20µl MgSO <sub>4</sub>	-20µl MgSO <sub>4</sub>	-20µl MgSO <sub>4</sub>	-20µl MgSO <sub>4</sub>
	-500 µl F1	-500 µl F3	-4 µl nisina	-500 µl F1	-500 µl F3
				-4 µl nisina	-4 µl nisina

**Tabla 7: Inhibición de *L. monocytogenes* con fagos y nisina.**

Todos los tubos se incubaron a 32°C, sin agitación, y se tomaron muestras cada 2 horas. En cada muestra se determinó el número de bacterias viables (UFC/ml) y el título fágico (UFP/ml).

**3.4.3. Coagulina 23, FWLLm1 y FWLLm3.**

Se prepararon 9 tubos denominados respectivamente Control, C<sub>23a</sub>, C<sub>23b</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>3</sub>, C<sub>23a</sub>+F<sub>1</sub>, C<sub>23b</sub>+F<sub>1</sub>, C<sub>23a</sub>+F<sub>3</sub>, C<sub>23b</sub>+F<sub>3</sub>. En este caso se partió de una suspensión fágica de  $2 \times 10^9$  UFP/ml para el Fago FWLLm1 y de  $1,7 \times 10^9$  UFP/ml para el Fago FWLLm3. A cada uno de ellos se añadieron 2 ml de cultivo de DO<sub>600</sub> 0,01 ( $8,2 \times 10^7$  UFC/ml de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 20 µl de MgSO<sub>4</sub>, 400 µl de Fago FWLLm1 y 26 µl de Fago FWLLm3, distintos volúmenes de la bacteriocinas C<sub>23</sub>: 150 µl (C<sub>23a</sub>) y 300 µl (C<sub>23b</sub>) (Tabla 8).

Todos los tubos se incubaron a 32°C, sin agitación, y se tomaron muestras cada 2 horas. En cada muestra se determinó el número de bacterias viables (UFC/ml) y el título fágico (UFP/ml).

<u>Control</u>	<u>Control+F<sub>1</sub></u>	<u>Control+F<sub>3</sub></u>	<u>Control+C<sub>23a</sub></u>	<u>Control+C<sub>23b</sub></u>
-2 ml cultivo	-2 ml cultivo	-2 ml cultivo	-2 ml cultivo	-2 ml cultivo
-20µl Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-20µlCa(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>			
-20µl MgSO <sub>4</sub>	-20µl MgSO <sub>4</sub>	-20µl MgSO <sub>4</sub>	-20µl MgSO <sub>4</sub>	-20µl MgSO <sub>4</sub>
	-400 µl F <sub>1</sub>	-26 µl F <sub>3</sub>	-150µl C <sub>23</sub>	-300µl C <sub>23</sub>

<u>C+F<sub>1</sub>+C<sub>23a</sub></u>	<u>C+F<sub>1</sub>+C<sub>23b</sub></u>	<u>C+F<sub>3</sub>+C<sub>23a</sub></u>	<u>C+F<sub>3</sub>+C<sub>23b</sub></u>
-2 ml cultivo	-2 ml cultivo	-2 ml cultivo	-2 ml cultivo
-20µl Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>			
-20µl MgSO <sub>4</sub>	-20µl MgSO <sub>4</sub>	-20µl MgSO <sub>4</sub>	-20µl MgSO <sub>4</sub>
-400 µl F <sub>1</sub>	-400 µl F <sub>1</sub>	-26 µl F <sub>3</sub>	-26 µl F <sub>3</sub>
-150 µl C <sub>23</sub>	-300 µl C <sub>23</sub>	-150 µl C <sub>23</sub>	-300 µl C <sub>23</sub>

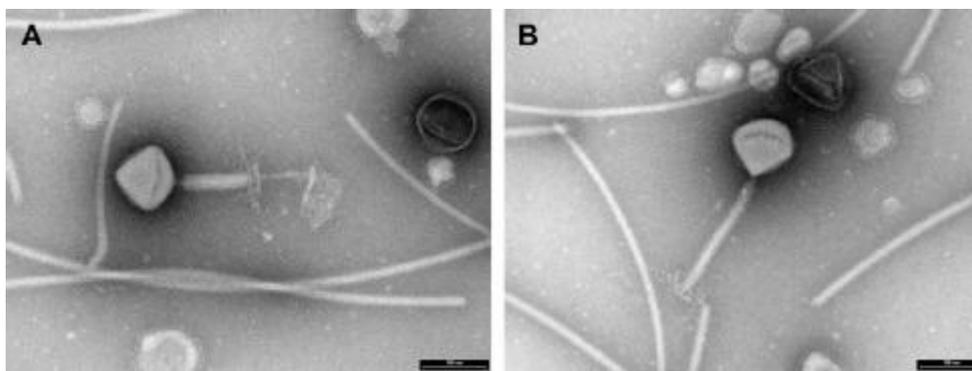
**Tabla 8. Inhibición de *L. monocytogenes* con Fagos y C<sub>23</sub>.**

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Obtención de los bacteriófagos FWLLm1 y FWLLM3, y cálculo de la MOI óptima para su propagación.

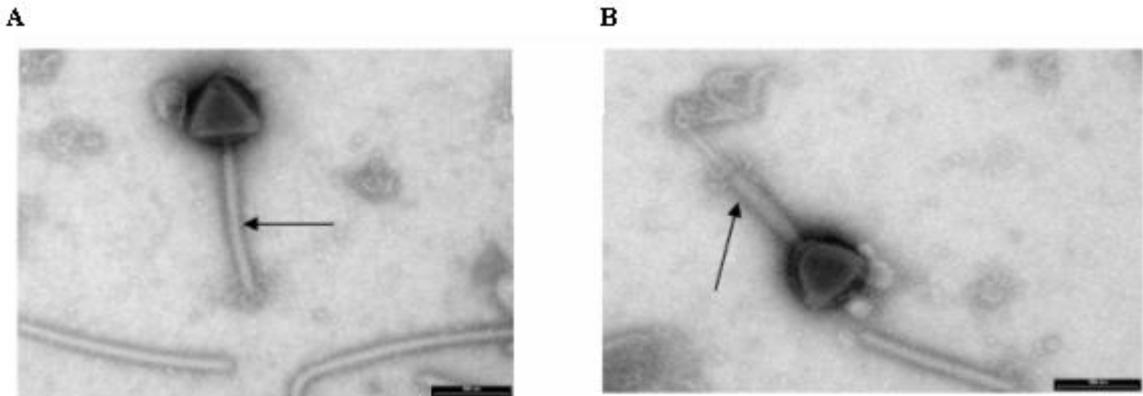
En un trabajo previo se había determinado que el bacteriófago FWLLm1 pertenece a la familia *Myoviridae*, tiene cabeza icosaédrica, con un diámetro medio de 88 nm y una cola contráctil de 206 nm de largo (Figura 9). Este fago da lugar a placas de lisis muy pequeñas (0,5 mm) y claras, y es capaz de infectar a varias cepas de *L. monocytogenes* incluyendo la cepa 2000/47. Además, infecta cepas individuales de *L. ivanovii* y *L. welshimeri*, pero no de *L. innocua* y *L. grayi*. El fago se mantiene viable después de 30 días en refrigeración a 4°C, aunque el título se reduce de  $10^7$  UFP/ml a  $10^4$  UFP/ml (Bigot y col., 2011). Todas estas características nos indican que puede ser adecuado para la eliminación de la bacteria patógena *L. monocytogenes*. En cuanto al fago FWLLm3, no disponemos de datos previos referentes a su morfología ni a su capacidad de infección.



**Figura 9.1.** Imágenes de microscopio electrónico del FWLLm1. (A) Fago con la cola contraída. (B) Fago con la cola sin contraer (Bigot y col., 2011).

En cuanto al fago FWLLm3 también pertenece a la familia *Myoviridae*, tiene cabeza icosaédrica con diámetro medio 108 nm y una cola contráctil de 209 nm de largo (Figura 9). Este fago también da lugar a placas de lisis pequeñas y claras y es capaz de infectar a varias cepas de *L. monocytogenes* incluyendo la cepa 2000/47. Además, infecta cepas individuales de *L. innocua* y *L. welshimeri*, pero no de *L. ivanovii* y *L.*

*grayi*. El fago se mantiene viable después de 30 días en refrigeración a 4°C manteniendo su concentración inicial (Lee, W.J., 2008). Todo ello indica al igual que el FWLLm1 que puede ser adecuado para la eliminación de la bacteria patógena *Listeria monocytogenes*.



**Figura 9.2. Imágenes de microscopio electrónico del FWLLm3. (A) Fago con la cola contraída. (B) Fago con la cola sin contraer (Lee, W.J., 2008).**

Para realizar los ensayos propuestos en este trabajo es imprescindible la obtención de suspensiones concentradas de ambos bacteriófagos. Para ello, fue necesario optimizar la propagación de cada uno de ellos en medio sólido y en medio líquido. Inicialmente, se propagaron en medio sólido, y tras varias rondas, se obtuvieron suspensiones con una concentración de  $1,6 \times 10^9$  UFP/ml para el fago FWLLm1, y de  $9 \times 10^7$  UFP/ml para el fago FWLLM3. Estos experimentos se llevaron a cabo utilizando como huésped la cepa *L. monocytogenes* 2000/47.

También se optimizó la propagación de estos fagos en medio líquido, para lo que fue necesario calcular la MOI óptima para cada uno de ellos. Los resultados expuestos en la Tabla 9 muestran los valores de los títulos de fago obtenidos bajo diferentes condiciones de propagación. Definiremos como MOI óptima aquella que permite obtener un mayor incremento en el título de fago tras la propagación. Así, para el fago FWLLm1 la densidad óptima ( $DO_{600}$ ) para la infección del cultivo es 0,1 y la MOI óptima 0,4. Para el fago FWLLm3, la densidad óptima de cultivo es 0,01 y la MOI óptima 0,2. En ambos casos, el crecimiento de bacterias que no han sido infectadas en la primera ronda de infección proporciona células sensibles suficientes para las siguientes rondas de propagación.

Observamos que en el caso del fago FWLLm1, el uso de una MOI alta (4) dio lugar a una suspensión fágica con título bajo tras la propagación, probablemente debido a un reducido número de ciclos de infección (Tabla 9).

De la misma manera, cuando el fago FWLLm3 se propagó con una MOI de 0,02, se obtuvo una suspensión de fago prácticamente igual a la inicial, posiblemente debido a que la tasa de crecimiento de la bacteria es superior a la tasa de lisis de la misma provocada por la propagación del bacteriófago.

	FWLLm1			FWLLm3		
	Título inicial	Título final	MOI	Título inicial	Título final	MOI
<b>DO<sub>600</sub> 0,1</b>	$1,6 \times 10^9$	$1,6 \times 10^{10}$	0,4	$9 \times 10^7$	$5,3 \times 10^7$	0,02
<b>DO<sub>600</sub> 0,01</b>	$1,6 \times 10^9$	$1,6 \times 10^7$	4	$9 \times 10^7$	$7 \times 10^8$	0,2

Tabla 9. Resultados de la propagación de los bacteriófagos en medio líquido y MOI.

#### 4.2. Rango de huésped de los bacteriófagos FWLLm1 y FWLLm3.

Cada uno de los fagos ensayados pueden tener distinta capacidad infectiva sobre las cepas de *L. monocytogenes*. Esta capacidad de infección es lo que se denomina rango de huésped. Además, es interesante saber sobre qué cepa se multiplican los fagos con mayor eficiencia; la *eficiencia de plaqueo* (EOP) se define como la relación que existe entre el número de placas de lisis que se detectan sobre la cepa que se quiere estudiar y el número de placas de lisis sobre la cepa de referencia. En este contexto, se realizó inicialmente el estudio del rango de huésped, que permite conocer qué cepas son sensibles al fago, y la EOP. Ambos parámetros fueron determinados para los bacteriófagos FWLLm1 y FWLLm3 frente a la colección de cepas de *L. monocytogenes* mostrada en la Tabla 4. Estas cepas se seleccionaron en función de su origen. Así, las cepas *L. monocytogenes* 1, 2, 3, 4, 22, 37, y 41 habían sido aisladas como contaminantes de quesos artesanales asturianos (Margolles y col., 1998). Las cepas *L. monocytogenes* 4R1 y 41R3 son variantes resistentes a la nisina, obtenidas

respectivamente a partir de la cepa *L. monocytogenes* 4 y 41 (Martínez y col., 2005a). El resto de cepas de *L. monocytogenes* y sus variantes resistentes fueron proporcionadas por la Dra. A. Gravesen (Universidad de Veterinaria y Agricultura, Dinamarca).

Los resultados que se obtuvieron por el método de sensibilidad por gota se muestran en la Tabla 10.

<b>Cepa</b>	<b>Origen</b>	<b>FWLLm1</b>	<b>FWLLm3</b>
<i>L. monocytogenes</i> 2000/47	Nueva Zelanda	S	S
<i>L. monocytogenes</i> 1	Quesos asturianos (1)	S	S
<i>L. monocytogenes</i> 2	Quesos asturianos (1)	S	S
<i>L. monocytogenes</i> 3	Quesos asturianos (1)	S	R
<i>L. monocytogenes</i> 4	Quesos asturianos (1)	S	R
<i>L. monocytogenes</i> 4R1	IPLA (2)	S	R
<i>L. monocytogenes</i> 22	Quesos asturianos (1)	S	R
<i>L. monocytogenes</i> 37	Quesos asturianos (1)	S	R
<i>L. monocytogenes</i> 41	Quesos asturianos (1)	S	S
<i>L. monocytogenes</i> 41R3	IPLA (2)	S	S
<i>L. monocytogenes</i> 412	Carne de cerdo (4)	S	S
<i>L. monocytogenes</i> 412N	Dinamarca(4)	S	S
<i>L. monocytogenes</i> 412P	Dinamarca (4)	S	S
<i>L. monocytogenes</i> 412NP	Dinamarca (4)	S	S
<i>L. monocytogenes</i> 409	Dinamarca (3)	S	S
<i>L. monocytogenes</i> 409N	Dinamarca (3)	S	S
<i>L. monocytogenes</i> 322	Carne de cerdo (4)	R	R

<i>L.monocytogenes</i> CECT4032	Reino Unido (5)	S	R
---------------------------------	-----------------	---	---

**Tabla 10: Sensibilidad/ resistencia de las cepas bacterianas a los fagos mediante el protocolo del “spot”. (R) cepas resistentes. (S) cepas sensibles. (1) Margolles y col., 1998. (2) Martínez y col., 2005. (3) Garvesen y col., 2001. (4) Garvesen y col., 2002. (5) Colección Española de Cultivos Tipo.**

De los resultados obtenidos se deduce que todas las cepas objeto de estudio fueron sensibles al fago FWLLm1 por el método del “spot”, salvo *L. monocytogenes* 322 (Figura 10). Sin embargo, el fago FWLLm3 fue menos efectividad dado que 7 cepas no mostraron sensibilidad: *L. monocytogenes* 3, 4, 4R1, 22, 32, 322, y CECT4032. Cabe señalar, por lo tanto, que el fago FWLLm1 puede ser eficaz para la eliminación de cepas de *Listeria* aisladas en quesos asturianos, dado que todas ellas son sensibles a este fago. Por otro lado, el fago FWLLm3 mostró eficacia para la eliminación de las cepas de *L. monocytogenes* 1, 2, 41, aisladas de quesos asturianos, y de la variante resistente a nisina de la cepa 41.

El hecho de que la variante resistente a nisina de *L. monocytogenes* 41 sea sensible a ambos fagos, hace pensar que el uso combinado de nisina y bacteriófagos puede ser un método de elección para su eliminación, ya que las posibles bacterias resistentes que se forman por acción de la nisina, podrían ser eliminadas por la acción del fago.

Respecto a la cepa *L. monocytogenes* 4 y su variante resistente a nisina (4R1), fueron sensibles al fago FWLLm1, lo que indica que el uso del fago eliminaría la contaminación por *Listeria*, incluso aquellas variantes resistentes desarrolladas en presencia de bacteriocina. Por el contrario, el fago FWLLm3 no presentó actividad frente la cepa silvestre ni frente a su variante resistente a nisina.



**Figura 10: Sensibilidad de las cepas *Lm* 412P y *Lm* 409 frente a los fagos FWLLm1 y FWLLm3.**

Una vez estudiada la sensibilidad de las cepas a ambos fagos, se realizó un estudio de la eficiencia de plaqueo en aquellas cepas que eran sensibles a los mismos (Tabla 11 y Tabla 12). Además, se incluyeron cepas que poseen variantes resistentes a bacteriocinas, dado que se ha descrito previamente que las cepas resistentes a bacteriocinas muestran EOP reducidas (Martínez y col., 2008; O'Driscoll y col., 2006). La baja sensibilidad de estas cepas a fagos parece ser debida a una adsorción reducida de los mismos, por las modificaciones que se producen en la superficie de las células debido a la exposición a la nisina.

<u>Cepa</u>	<u>Características</u>	<u>Gota</u>	<u>Título(UPF/ml)</u>	<u>EOP<sub>1</sub></u>	<u>EOP<sub>2</sub></u>
<i>L.monocytogenes</i> 2000/47	Cepa de referencia para propagar los fagos FWLLm1 y FWLLm3	2+	$2,9 \times 10^9$		
<i>L.monocytogenes</i> 412	Silvestre	2+	$6,3 \times 10^8$	<1	
<i>L.monocytogenes</i> 412P	Resistente a pediocina	2+	$3,9 \times 10^8$	<1	<1
<i>L.monocytogenes</i> 412N	Resistente a nisina	2+	$1,2 \times 10^{10}$	>1	>1
<i>L.monocytogenes</i> 412NP	Resistente a nisina y pediocina	3+	$8 \times 10^9$	>1	>1

<i>L.monocytogenes</i> 4	Silvestre. Resistente a pediocina PA1	1+	0		
<i>L.monocytogenes</i> 4R <sub>1</sub>	Resistente a nisina	1+	0		
<i>L.monocytogenes</i> 409	Silvestre	2+	$3,9 \times 10^8$	<1	
<i>L.monocytogenes</i> 409N	Resistente a nisina	2+	$1,6 \times 10^9$	<1	<1
<i>L.monocytogenes</i> 41	Silvestre	2+	0		
<i>L.monocytogenes</i> 41R <sub>3</sub>	Resistente a nisina	1+	0		

**Tabla 11: Sensibilidad de las cepas al fago FWLLm1. EOP<sub>1</sub> respecto a *L. m* 2000/47. EOP<sub>2</sub> respecto a la cepa silvestre. (3+) halo muy marcado. (2+) halo marcado. (1+) halo poco marcado.**

Durante el ensayo se observó que el fago FWLLm1 producía un halo de lisis sobre algunas cepas tras la adición de una suspensión concentrada (gota), y sin embargo, no daba lugar a la formación de placas lisis aisladas. Este resultado se observó en las cepas *L. monocytogenes* 4, 4R<sub>1</sub>, *L. monocytogenes* 41 y 41R<sub>3</sub>, y, podría ser debido a la denominada “lisis desde afuera” que realizan algunos fagos (Moka y Molineaux, 2005). En este caso, al inicio del ciclo de infección se produce la adsorción del fago a la bacteria y la degradación local de la pared celular con el fin de introducir el material genético en el citoplasma celular. Cuando una bacteria es infectada por gran cantidad de fagos al mismo tiempo, se producen múltiples poros en la pared de la misma, provocando la debilidad del peptidoglicano, que finalmente, es desestabilizado por la presión osmótica que se ejerce desde el exterior celular.

De los datos obtenidos podemos deducir que sólo las cepas *L. monocytogenes* 2000/47, 412 y sus variantes, y *L. monocytogenes* 409 y su variante resultaron ser claramente sensibles al fago FWLLm1. En relación a la EOP, todas las variantes resistentes, excepto dos, fueron menos sensibles al fago (EOP<1) que la cepa silvestre. Esto puede ser debido a la presencia de mecanismos de resistencia (Bull y col., 2002, Martínez y col., 2008) o bien a la falta de receptores específicos en la superficie celular (Peral y col., 2008).

Sólo dos de las cuatro cepas resistentes de *L. monocytogenes* 412, en concreto *L. monocytogenes* 412N y 412NP, presentaron una mayor sensibilidad al fago (EOP>1).

<u>Cepa</u>	<u>Características</u>	<u>Gota</u>	<u>Título(UFP/ml)</u>	<u>EOP<sub>1</sub></u>	<u>EOP<sub>2</sub></u>
<i>L.monocytogenes</i> 2000/47	Cepa de referencia para propagar los fagos FWLLm1 y FWLLm3	2+	$2,2 \times 10^7$		
<i>L. monocytogenes</i> 412	Silvestre	2+	$3,5 \times 10^7$	1	
<i>L. monocytogenes</i> 412P	Resistente a pediocina	2+	$3,2 \times 10^6$	<1	<1
<i>L. monocytogenes</i> 412N	Resistente a nisina	1+	$4 \times 10^5$	<1	<1
<i>L.monocytogenes</i> 412NP	Resistente a nisina y pediocina	2+	$2,7 \times 10^7$	1	<1
<i>L.monocytogenes</i> 4	Silvestre. Resistente a pediocina PA1	0	0		
<i>L.monocytogenes</i> 4R <sub>1</sub>	Resistente a nisina	0	0		
<i>L.monocytogenes</i> 409	Silvestre	1+	$2,2 \times 10^6$	<1	
<i>L.monocytogenes</i> 409N	Resistente a nisina	1+	$3,2 \times 10^6$	<1	1
<i>L.monocytogenes</i> 41	Silvestre	1+	$1,6 \times 10^5$	<1	
<i>L.monocytogenes</i> 41R <sub>3</sub>	Resistente a nisina	1+	$7,8 \times 10^4$	<1	<1

**Tabla 12: Sensibilidad de las cepas al fago FWLLm3. EOP<sub>1</sub> respecto a L.m 2000/47. EOP<sub>2</sub> respecto a la cepa silvestre. (3+) halo muy marcado. (2+) halo marcado. (1+) halo poco marcado.**

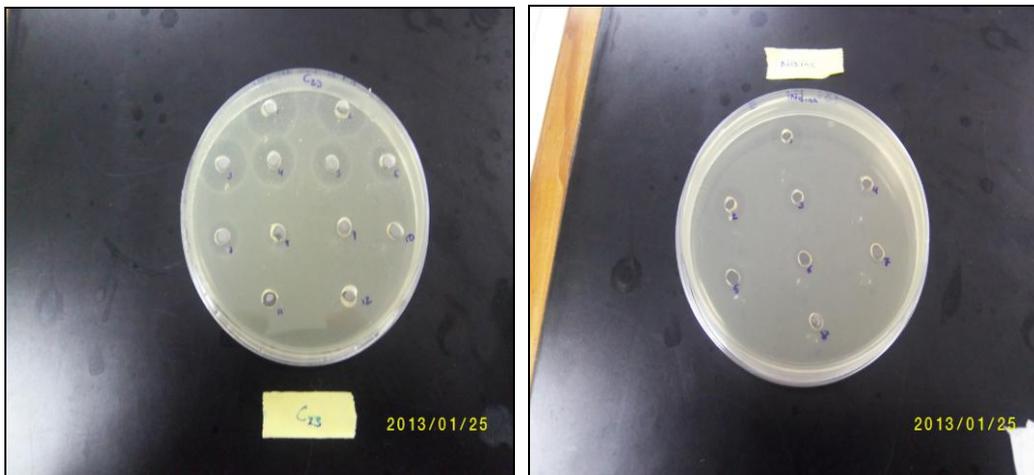
Los datos obtenidos indican que todas las cepas objeto de estudio fueron sensibles al fago FWLLm3, excepto las cepas *L. monocytogenes* 4 y 4R<sub>1</sub> que fueron resistentes. En éstas no se observaron ni halo de lisis en la prueba de la gota, ni placas de fagos aisladas cuando se enfrentó la cepa al bacteriófago.

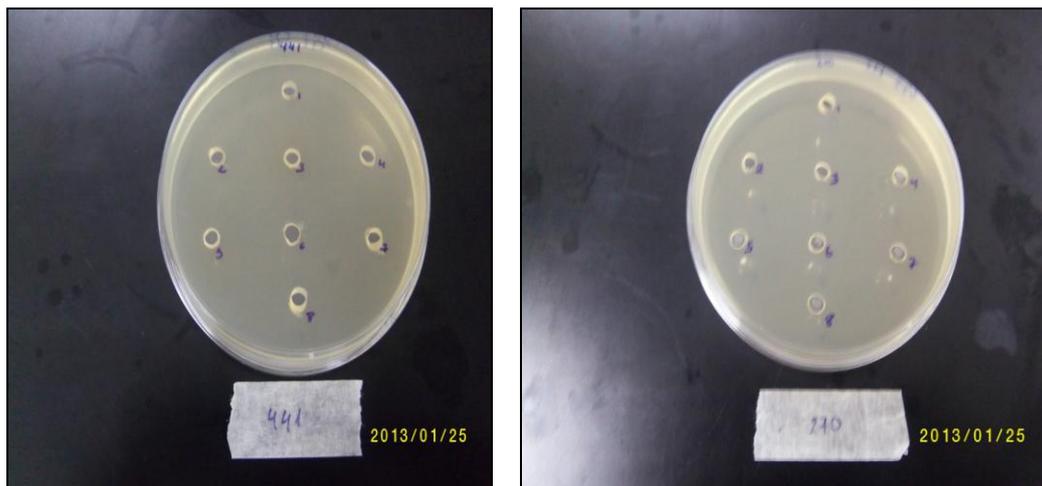
Las variantes de las cepas estudiadas fueron menos sensibles que la cepa silvestre respectiva de referencia (EOP<1), excepto la cepa *L. monocytogenes* 409N que mostró tener la misma sensibilidad que la cepa de referencia *L. monocytogenes* 409. De la misma manera que lo expuesto con el FWLLm1, esta menor sensibilidad de las variantes resistentes puede ser debida a la presencia de mecanismos de resistencia (Bull y col., 2002, Martínez y col., 2008) o bien a la falta de receptores específicos en la superficie celular (Peral y col., 2008).

Todas las cepas fueron menos sensibles al FWLLm3 que la cepa de referencia *L. monocytogenes* 2000/47, excepto las cepas 412 y 412 NP, que mostraron la misma sensibilidad.

### **4.3. Selección de bacteriocinas efectivas frente a *L. monocytogenes*.**

Se estudió el efecto de las bacteriocinas C23, Plantaricina C, Nisina y Lacticina 481 frente a *L. monocytogenes* 2000/47. Se consideraron activas frente a la cepa bacteriana aquéllas que producían halos lisis. Durante este ensayo se observó que sólo C23 y nisina tenían actividad frente a *Listeria* ya que sólo éstas causaron halos de lisis (Figura 11).





**Figura 11. Actividad de las bacteriocinas frente a *L. monocytogenes* 2000/47.**

La actividad inhibitoria de las bacteriocinas C23 y nisina fue calculada y expresada en unidades arbitrarias (UA/ml), y definida como el inverso de la dilución más alta que originaba un halo de inhibición perceptible. Para la nisina, el último halo donde se observó lisis fue el número 6 que correspondía a una dilución 1:64, lo que indica una actividad inhibitoria de 3200UA/ml. Para C23, el último halo donde se observó lisis fue el número 8 correspondiendo a una dilución 1:256, lo que indica 12.800 UA/ml de actividad inhibitoria.

#### **4.4. Cálculo de la MIC de los antimicrobianos frente a *L. monocytogenes* 2000/47.**

##### **4.4.1. MIC de los bacteriófagos.**

El objetivo de este ensayo fue determinar la concentración mínima inhibitoria de los fagos FWLLm1 y FWLMm3 para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* 2000/47 después de 24 horas de incubación. Los resultados obtenidos se reflejan en la Figura 12. Dado que se observó crecimiento bacteriano en todos los pocillos, fue imposible determinar la MIC para ambos fagos. No obstante, se puede decir que para una concentración de cultivo de  $6,15 \times 10^7$  UFP/ml ninguna de las concentraciones utilizadas de fagos consiguieron inhibir el crecimiento de la bacteria.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<b>F1</b>										-	+
B	<b>F1</b>										-	+
C	<b>F3</b>										-	+
D	<b>F3</b>										-	+
E												
F												
G												
H												

Figura 12. Inhibición de *L. monocytogenes* con distintas concentraciones de fagos en placa microtiter. (+) Control positivo. (-) Control negativo  Crecimiento bacteriano.  
 Ausencia de crecimiento bacteriano.

Dicho experimento se repitió incubando la placa en las mismas condiciones durante 11 horas y siguiendo la evolución de la  $DO_{600}$ . El resultado expuesto en las Figura 13 y 14 muestra que en el pocillo control hubo crecimiento de *Listeria*, mientras que en presencia de distintas concentraciones de fago se produjo la inhibición del crecimiento de *Listeria* durante las primeras 11 horas. Sin embargo, cuando se incubó durante 24 horas, se observó crecimiento, el cual puede ser atribuido a bacterias no infectadas, a lisógenos que se hubiesen generado o a bacterias resistentes al fago (Bigot y col., 2011).

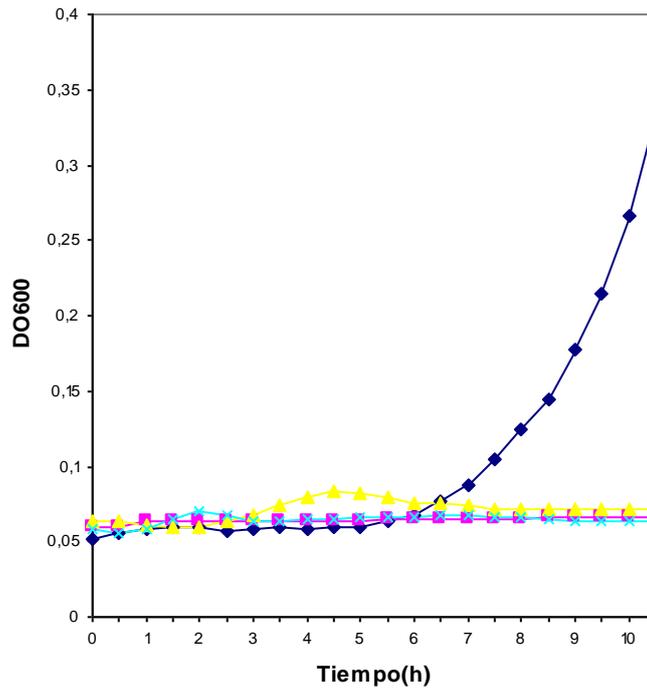


Figura 13. Inhibición de *L. monocytogenes* por la acción del fago FWLLm1 a 32°C a distintas

concentracion  
es.

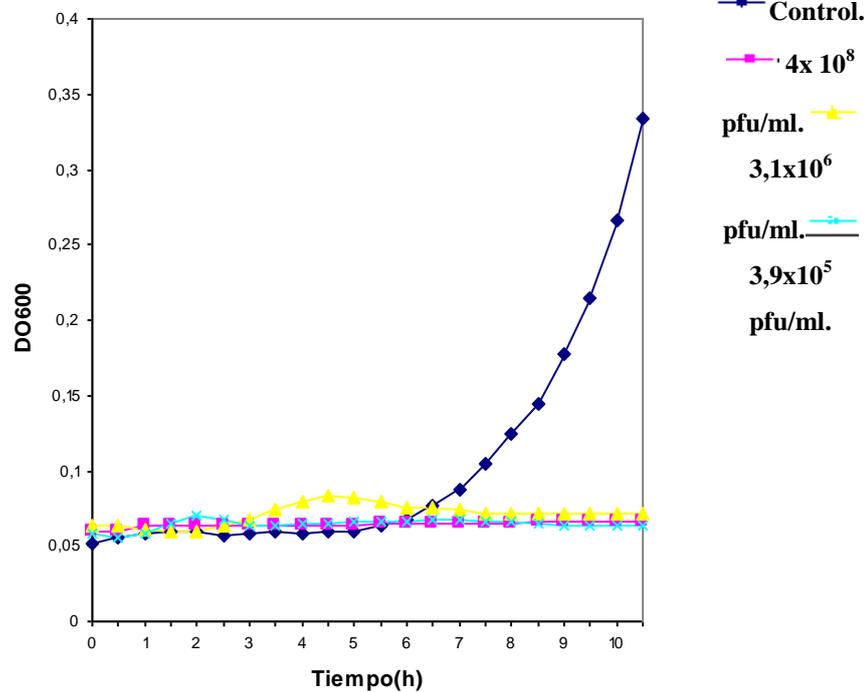


Figura 14. Inhibición de *L. monocytogenes* por la acción del FWLLm3 a 32°C a distintas  
concentraciones. —◆— Control. —■— 2,2x 10<sup>7</sup> pfu/ml. —▲— 1,7x10<sup>5</sup> pfu/ml. —★— 4,4x10<sup>4</sup> pfu/ml.

**4.4.2. MIC de las bacteriocinas C23 y nisina.**

De la misma manera que con los bacteriófagos, la finalidad de este ensayo fue determinar la concentración mínima de las bacteriocinas C<sub>23</sub> y nisina necesaria para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* 2000/47 después de 24 horas de incubación. Los resultados que se obtuvieron quedan reflejados en la Figura 15.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C <sub>23</sub>										-	+
B	C <sub>23</sub>										-	+
C	Nis										-	+
D	Nis										-	+
E												
F												
G												
H												

**Figura 15. Inhibición de *L. monocytogenes* con distintas concentraciones de bacteriocinas en placa microtiter. (+) Control positivo. (-) Control negativo.  Crecimiento bacteriano.  Ausencia de crecimiento bacteriano.**

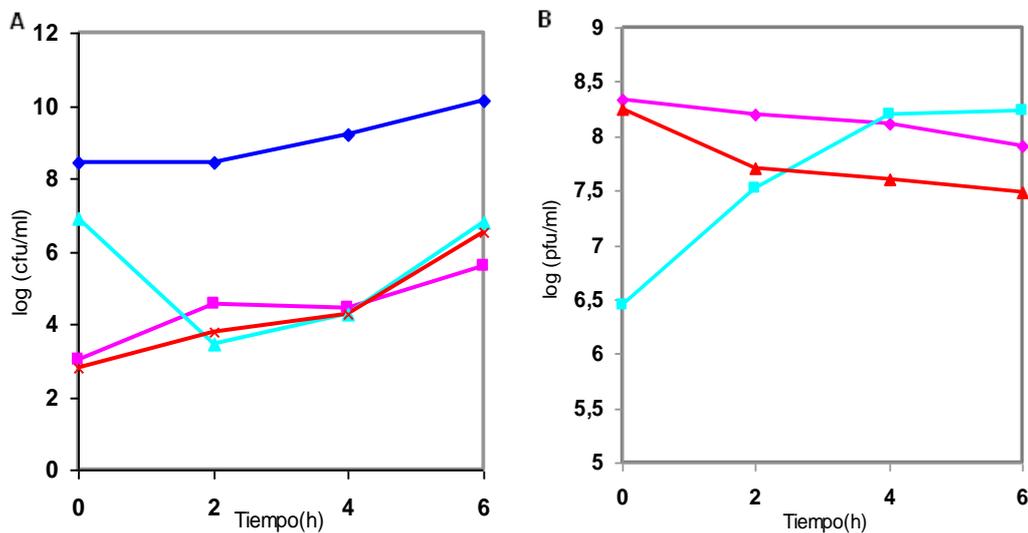
La MIC calculada para la nisina, capaz de inhibir un cultivo de  $6,15 \times 10^7$  UFC/ml de *L. monocytogenes* 2000/47, ha sido 12.5 UA/ml, dado que el último pocillo donde no hubo crecimiento fue el 7.

Respecto a C<sub>23</sub>, se observó crecimiento en todos los pocillos, lo que hizo imposible determinar en esas condiciones la concentración mínima inhibitoria. Por lo tanto, es necesaria una actividad inhibitoria superior a 3.200 UA/ml para inhibir una concentración de cultivo de  $6,15 \times 10^7$  UFC/ml.

**4.5. Eficacia de fagos y bacteriocinas para inhibir *L. monocytogenes* 2000/47.**

Para comprobar la capacidad de los fagos FWLLm1 y FWLLm3 como agentes antimicrobianos, se realizó un ensayo en el que se enfrentaron a la cepa de *L. monocytogenes* 2000/47, comparando la capacidad antimicrobiana de cada fago por separado y de la mezcla. Así, se comprobó que tanto el fago FWLLm1 como el fago FWLLm3 inhibían el crecimiento de *L. monocytogenes* 2000/47 (Figura 16).

En el caso del fago FWLLm1 se añadió al cultivo bacteriano ( $2,6 \times 10^8$  UFC/ml) una concentración de  $3,1 \times 10^8$  UFP/ml, lo que supone una MOI de 4,7. dando lugar a una rápida inhibición de la bacteria, de modo que incluso a tiempo 0 la diferencia respecto al cultivo control fue de 5,4 unidades logarítmicas (Figura 16A). El ligero crecimiento posterior de las células supervivientes que se observa a lo largo del tiempo de incubación puede ser debido a que dichas células sean lisógenos para este fago, o simplemente sean mutantes resistentes,, los cuales serían insensibles a la infección (Bigot y col., 2011). En cuanto al título, se observa cómo la concentración del fago va disminuyendo, seguramente debido a que las bacterias presentes no son sensibles y el fago no puede seguir propagándose, pero sí se adsorbe a su superficie, lo que conlleva la disminución del título en el sobrenadante (Figura 16B).



**16. Capacidad antimicrobiana de los fagos frente a *L. monocytogenes* 2000/47.**

**A. Concentración bacteriana (UFC/ml). B. Título de fagos (UFP/ml)**

—♦— Cultivo control. —■— C+F1 —▲— C+ F3 —\*— C+F1+F3

Con respecto al fago FWLLm3, se añadieron  $1,7 \times 10^7$  UFP/ml a una concentración bacteriana de  $2,6 \times 10^8$  UFC/ml, lo implica una MOI de 0,26. Este fago tarda más tiempo que FWLLm1 en lisar las bacterias, posiblemente debido a que la concentración utilizada fue 18,23 veces menor, lo que quizás ha contribuido a que no se haya establecido la interacción bacteria-fago óptima que da lugar a un proceso de infección eficaz (Payne y Jansen, 2000).

En presencia del fago FWLLm3, a las 2 horas de incubación se alcanza la máxima disminución en el número de bacterias del cultivo (3,7 unidades logarítmicas de

diferencia con respecto al control). Esta disminución coincide con un aumento del número de fagos (Figura 16B). A partir de las 4 horas se observa un aumento del número de viables, que serían posibles lisógenos o mutantes resistentes a la infección, a la vez que se observa que el número de fagos no aumenta más, ya que no podrían propagarse sobre las bacterias insensibles a la infección.

Por otro lado, la mezcla de los dos fagos no resultó ser más efectiva en la eliminación del patógeno que los fagos individuales, siendo la diferencia entre el cultivo infectado y el control de 5,6 unidades logarítmicas a tiempo 0. Estudios previos indican que la mezcla de dos o más bacteriófagos de familias diferentes disminuyen la probabilidad de generar resistentes, ya que aunque la bacteria generara resistencia a uno de los fagos, seguiría siendo sensible a los otros, y así se garantizaría la efectividad de la mezcla. En nuestro caso, al usar la mezcla de ambos fagos se observó que había igualmente un aumento del número de viables, lo que podría explicarse, bien porque ambos fagos pertenecen a la misma familia, o bien a la diferencia de las MOIs utilizada para ambos fagos. Por otro lado, observamos cómo el número de fagos totales disminuyó (Figura 16B), posiblemente debido a ese aumento de bacterias resistentes que adsorben fago en su superficie.

A pesar de que estos resultados confirman que el uso por separado o combinado de estos dos fagos eliminan gran parte de la población de bacterias, en las condiciones fijadas en el experimento, los fagos FWLLm1 y FWLLm3 no han resultado ser totalmente eficaces como agentes de biocontrol de *L. monocytogenes* 2000/47. El crecimiento posterior de variantes resistentes debe evitarse o reducirse mediante el uso combinado con otros sistemas de control de la bacteria.

#### **4.6. Sinergismo entre nisina, FWLLm1 y FWLLm3.**

Dado que los resultados de la combinación del fago FWLLm1 y el fago FWLLm3 no mostraron una inhibición total del patógeno, se realizó un ensayo de sinergismo, basándose en el conocimiento previo del sinergismo existente entre nisina y fago en bacterias tales como *S. aureus* (Martínez y col., 2008) o *L. monocytogenes* (Leverentz y col., 2003).

La finalidad de este ensayo era comprobar si el uso combinado producía un efecto de sinergismo entre los fagos y la nisina, provocando una mayor inhibición del

crecimiento bacteriano. Así, se comparó el uso de cada uno de los antimicrobianos por separado y en combinación. Sabemos que para inhibir un cultivo de  $6,15 \times 10^7$  UFC/ml la concentración mínima necesaria de nisina es de 12,5 UA/ml, por lo que se partió de una concentración subinhibitoria, (6,25 UA/ml), ya que si se utilizaba la MIC no se podría llegar a determinar si la inhibición era producida por la nisina o por la acción combinada con los fagos.

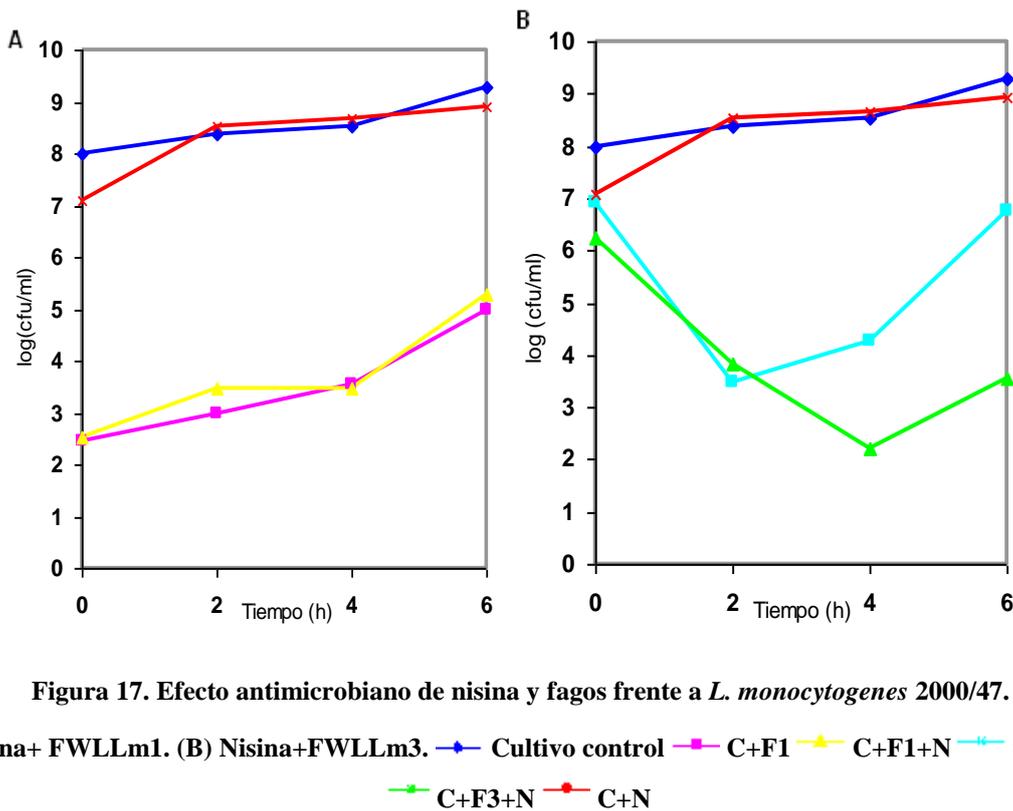


Figura 17. Efecto antimicrobiano de nisina y fagos frente a *L. monocytogenes* 2000/47. (A) Nisina+ FWLLm1. (B) Nisina+FWLLm3. —◆— Cultivo control —■— C+F1 —▲— C+F1+N —□— C+F3. —▲— C+F3+N —■— C+N

Cuando el cultivo era infectado con el fago FWLLm1 y además se le añadía nisina (Figura 17A), se observaba una rápida disminución del número de bacterias viables con respecto al cultivo control (5,5 unidades logarítmicas a tiempo 0). El resultado es semejante al que se observa cuando solo se añade el fago (5,6 unidades logarítmicas a tiempo 0), de lo que se deduce que no hay efecto sinérgico en estas condiciones. De hecho, el crecimiento bacteriano que tiene lugar durante el período de incubación en presencia de fago no es inhibido cuando está presente también la bacteriocina.

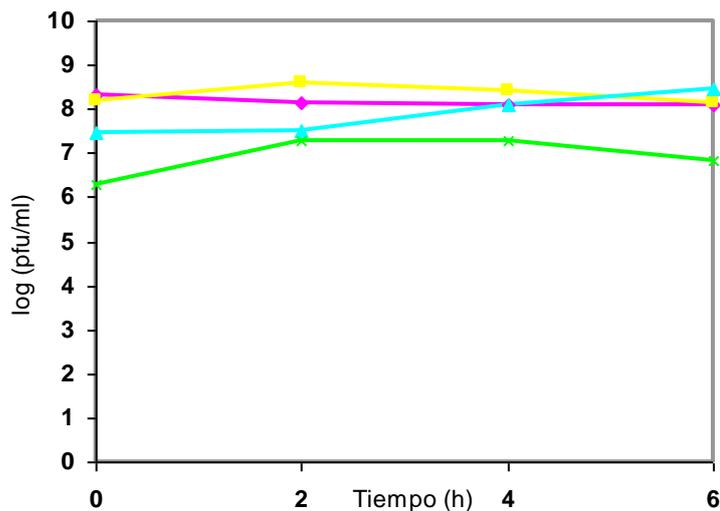


Figura 18. Evolución del título de de fagos en cultivos infectados en presencia de nisina.

—■— C+F1 —▲— C+F1+N —◆— C+F3. —×— C+F3+N

A la vez, se observa cómo el título del fago se mantiene más o menos constante a lo largo de la infección (Figura 18), con un ligero descenso cuando aumentan las variantes resistentes debido a la incapacidad del fago FWLLm1 para seguir propagándose.

Aunque en determinados casos una reducción del número de bacterias puede ser suficiente para garantizar la seguridad alimentaria y a la vez no comprometer las propiedades organolépticas de los alimentos, en el caso de *L. monocytogenes*, eso no es posible. El riesgo que conlleva el consumo de un alimento que no va a sufrir un tratamiento posterior y que esté contaminado con esta bacteria ha hecho que se imponga legalmente un límite máximo de tolerancia.

Tanto el uso de bacteriófagos como de bacteriocinas presentan una serie de limitaciones, en particular, el desarrollo de resistencia entre las bacterias diana, lo que podrían comprometer su uso para controlar patógenos transmitidos por los alimentos. Se han descrito variantes resistentes a nisina en muchos microorganismos, incluyendo *L. monocytogenes* (Gravesen y col., 2002, Martínez y col., 2005). Por otro lado, la aparición de resistencia a fagos es algo que también ha sido constatada por varios autores (Bigot y col., 2011; Bigwood y col., 2007). Entre las soluciones planteadas para paliar esta limitación está el empleo conjunto de ambos antimicrobianos en alimentos, es decir, el uso de tratamientos combinados, conocido como tecnología de barreras (Leistner, 2000), con la finalidad de que las variantes resistentes a uno de ellos sean inhibidas por el otro antimicrobiano. En nuestro caso, no se observó tal inhibición en

esas circunstancias. Para confirmar que el crecimiento de bacterias se producía a partir de variantes resistentes al fago, se aislaron colonias a partir del cultivo infectado tras 6 horas de incubación. Por medio del test del “spot” o “gota” se enfrentaron 5 µl del fago FWLLm1 sobre un césped de dichas colonias. El resultado no mostró un halo de lisis, ratificando el hecho de que eran variantes resistentes.

Cuando el cultivo de *L. monocytogenes* 2000/47 se enfrentó al fago FWLLm3 y a nisina, se observó que se tardó más tiempo en reducir el número de viables que tras la infección solo con el fago FWLLm1, posiblemente porque se partió de una concentración más baja del fago (Figura 17B). Al mismo tiempo, se observó cómo el fago FWLLm3 tarda 2 h en alcanzar su título más alto (Figura 18), manteniéndose hasta las 4 h, sufriendo después un descenso por no haber la suficiente cantidad de células para propagarse.

La máxima disminución conseguida al combinar el fago FWLLm3 y la nisina fue de 6,3 unidades logarítmicas frente a las 4,9 unidades cuando se usa solo el fago. Por otro lado, se observa que cuando se usa la combinación de ambos agentes antimicrobianos, la reducción máxima microbiana tarda más tiempo en producirse (4 h) que en presencia solo del fago (2 h), pero es más acusada (Figura 17B). Esto implica que sí existe sinergismo cuando se utiliza el FWLLm3 y nisina en las condiciones ensayadas en el experimento.

A pesar del sinergismo observado, al igual que ocurría con la combinación de FWLLm1 y nisina, también se produce un aumento del número de bacterias al final del período de incubación. Se comprobó si estas bacterias eran resistentes o no a la acción del fago: La ausencia de halo de lisis confirmó que se trataban de variantes resistentes al fago (Bigot y col., 2011; Bigwood y col., 2007; Mizoguchi y col., 2003) o a la nisina, pues estas últimas pueden comprometer la acción del fago (Martinez y col., 2008).

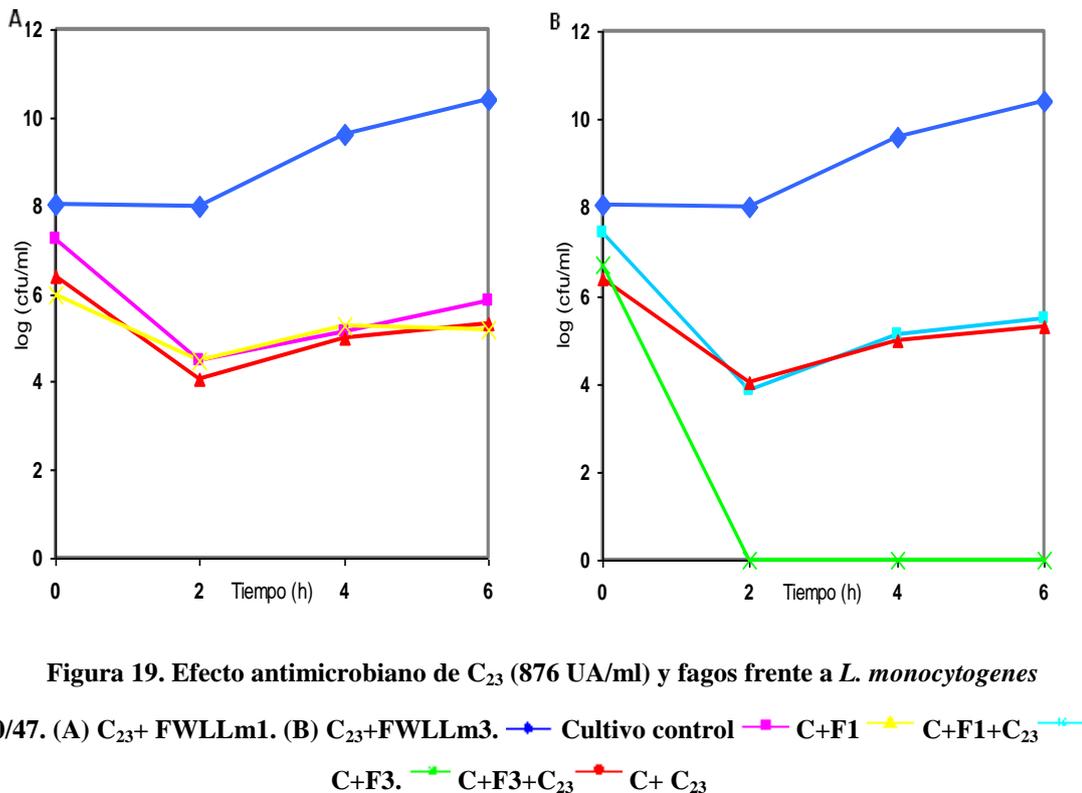
En ambos casos, en las condiciones en las que se realizó este experimento, el uso combinado de cada uno de los fagos citados anteriormente con la nisina no resultó ser un método muy eficaz para el control de este patógeno. La posibilidad de que se desarrollen variantes resistentes que no puedan ser inhibidas no garantiza la seguridad de dichos productos de cara al consumidor.

4.7. Sinergismo entre C23, FWLLm1 y FWLLm3.

La otra bacteriocina estudiada fue la coagulina 23. Estudios previos demostraron su actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* (Rilla Villar, 2003).

Como se indicó previamente, se precisa una concentración superior a 3,200 UA/ml para inhibir  $6,15 \times 10^7$  UFC/ml de *L. monocytogenes* 2000/47. Por ello, se estudió el posible sinergismo de C23 con ambos fagos, los cuales se combinaron con 876 UA/ml y 1.641 UA/ml de C23.

Cuando el cultivo era infectado con el fago FWLLm1 y además se le añadían 876 UA/ml de C23 (Figura 19A) se observaba, tras 2 h, una disminución de 3,3 unidades logarítmicas del número de bacterias viables con respecto al cultivo control. La misma reducción del número de bacterias se observó también cuando solo se añadía el fago. Por lo tanto, en esas condiciones de ensayo no hubo efecto sinérgico entre la bacteriocina y el fago.



Una vez que se produce la máxima reducción, en ambos casos hay un incremento posterior del número de bacterias coincidiendo, a su vez, con una disminución de la

concentración de fago (Figura 20). Estas bacterias eran resistentes a ambos antimicrobianos pues ni los fagos ni la bacteriocina provocaron halos de inhibición sobre céspedes de las mismas. .

Además se observó que la concentración del fago FWLLm1 se redujo a lo largo del período de incubación en presencia de C23, mientras mostró un incremento continuado durante 4 h en ausencia de la bacteriocina. Esto puede ser debido a que las bacterias resistentes a la coagulina lo sean también al fago, lo que hace que el éste no se pueda propagar y baje su concentración. En este caso hablaríamos de resistencia cruzada, donde el uso de C23 podría inducir cambios en la pared celular de *L. monocytogenes* 2000/47, creando cepas resistentes a la misma y, a su vez, también a los bacteriófagos utilizados, algo constatado por otros autores (Martínez y col., 2008),

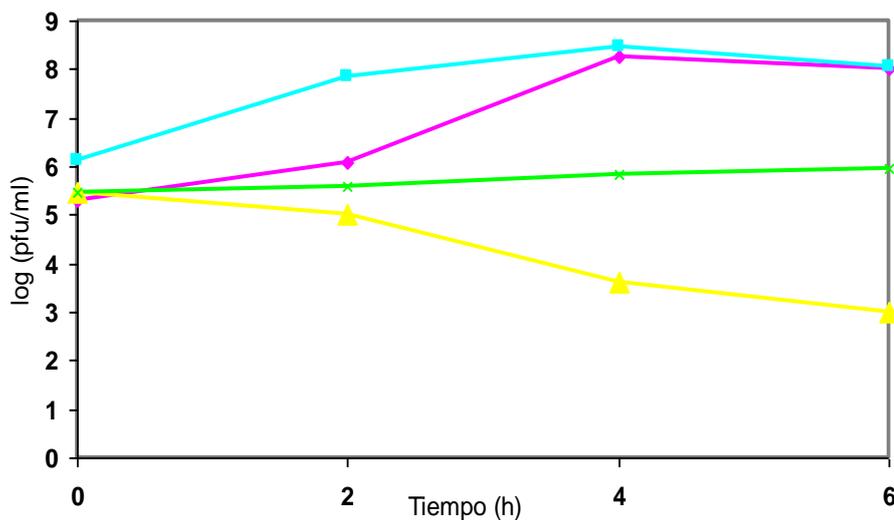


Figura 20. Evolución del título de fagos en cultivos infectados en presencia de 876 UA/ml C<sub>23</sub>.

—■— C+F1 —▲— C+F1+C<sub>23</sub> —■— C+F3. —×— C+F3+C<sub>23</sub>

Cuando el cultivo fue infectado con el fago FWLLm3 y además se le añadieron 876 UA/ml de C23 (Figura 19B) se observó una disminución total de número de bacterias viables tras 2 h, y no se produjo ningún crecimiento posterior durante el resto del período de incubación (6 horas). Sin embargo, el fago y la bacteriocina utilizados individualmente provocaron una disminución de 4,2 y 4 unidades logarítmicas,

respectivamente, en las 2 primeras horas de incubación, observándose después crecimiento bacteriano hasta el final de la incubación.

.Por otro lado, la concentración del FWLLm3 a lo largo de la incubación permanece constante en presencia de la bacteriocina debido a la rápida disminución de la población bacteriana, que impide nuevas de rondas de propagación (Figura 20).

Cuando se utilizan 1.641 UA/ml (300 $\mu$ l) de C<sub>23</sub> y se combina con el fago FWLLm1 se observa una disminución de la población bacteriana de 4,5 unidades logarítmicas frente a las 3,5 detectadas cuando se enfrenta exclusivamente al fago FWLLm1 (Figura 21A). En este caso se produce un efecto sinérgico al utilizar los dos antimicrobianos.

La evolución del título del bacteriófago FWLLm1 fue similar al observado en presencia de 876 UA/ml de bacteriocina C23 (Figura 22).

La combinación de fago y bacteriocina tuvo mayor efecto inhibitorio sobre la población de *L. monocytogenes* 2000/47 que el uso individual de ambos antimicrobianos (Figura 21A).

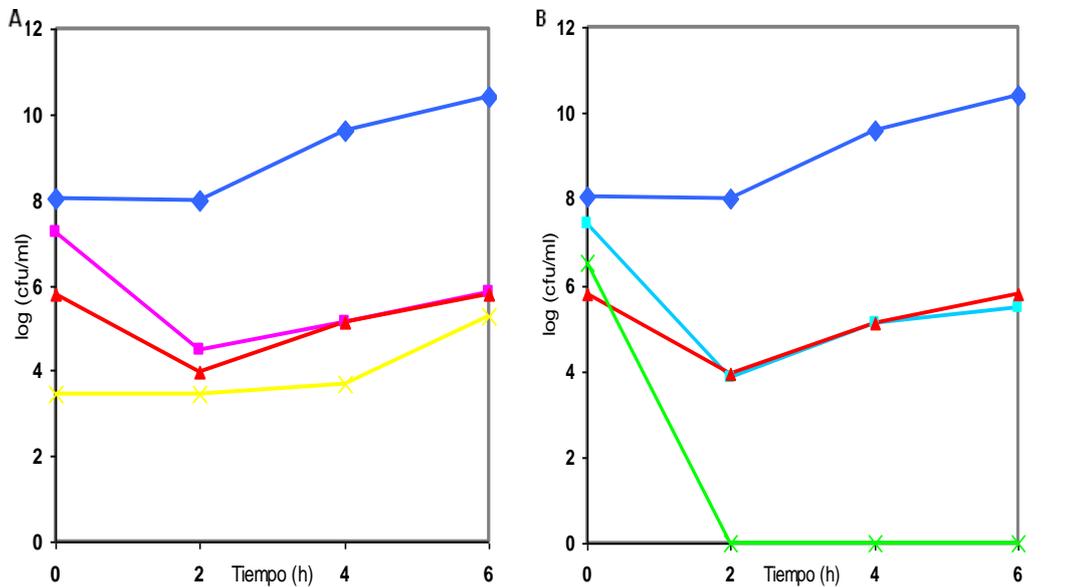


Figura 21. Efecto antimicrobiano de C23 (1641 UA/ml) y fagos frente a *L. monocytogenes* 2000/47. (A) C<sub>23</sub>+ FWLLm1. (B) C<sub>23</sub>+FWLLm3. —●— Cultivo control —■— C+F1 —▲— C+F1+C<sub>23</sub> —◆— C+F3. —×— C+F3+C<sub>23</sub> —□— C+ C<sub>23</sub>

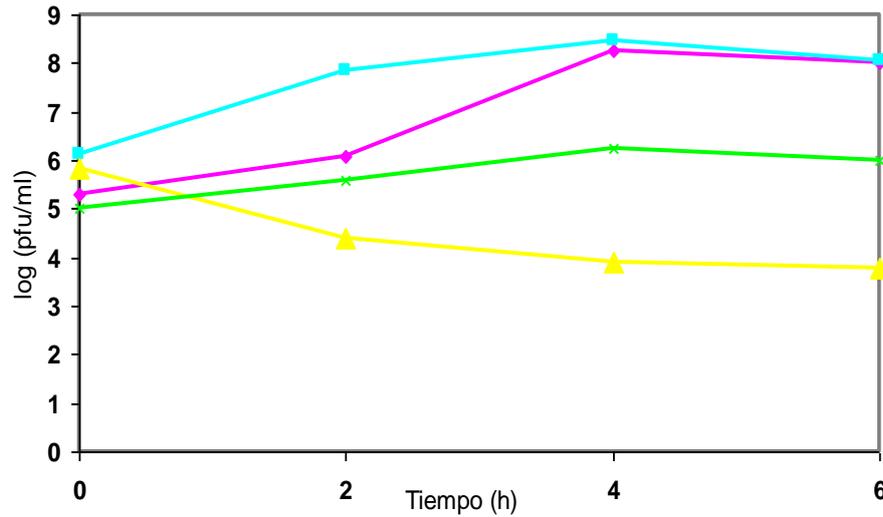


Figura 22. Evolución del título de fagos en cultivos infectados en presencia de 1641 UA/ml C<sub>23</sub>.

—■— C+F1 —▲— C+F1+C<sub>23</sub> —□— C+F3. —×— C+F3+C<sub>23</sub>

Por último, la combinación del FWLLm3 con 1.641 UA/ml de bacteriocina (Figura 21B) provocó la total inhibición de la población bacteriana en 2 h de incubación, claramente más efectiva que el fago utilizado individualmente, el cual dio lugar a una reducción de 4,1 unidades logarítmicas., corroborando el efecto sinérgico ya observado con concentración inferiores de bacteriocina.

# CONCLUSIONES

---

## 5. CONCLUSIONES

1. Se han determinado las condiciones más adecuadas para la propagación en medio líquido de los bacteriófagos FWLLm1 y FWLLm3 que infectan *L. monocytogenes*, siendo la multiplicidad de infección óptima de 0,4 y 0,2, respectivamente.
2. El fago FWLLm1 presenta un rango de huésped más amplio que el FWLLm3, infectando cepas de diferentes orígenes, entre las que se encuentran cepas aisladas de productos lácteos.
3. Los estudios de resistencia cruzada entre fagos y bacteriocinas mostraron resultados variables. Así, ciertas variantes resistentes a bacteriocinas resultaron ser menos sensibles al fago FWLLm1, mientras que fueron igual de sensibles al fago FWLLm3.
4. Ambos fagos, FWLLm1 y FWLLm3, inhiben el crecimiento de *L. monocytogenes* 2000/47. Sin embargo, no se observa sinergismo entre ellos, ni son capaces de inhibir el crecimiento de variantes resistentes.
5. El uso combinado de la bacteriocina nisina con los fagos FWLLm1 y FWLLm3 reduce el crecimiento de *L. monocytogenes* 2000/47, si bien solo manifiesta un claro efecto sinérgico cuando se combina con el fago FWLLm3. No obstante, la combinación de fago y bacteriocina no impide el desarrollo de variantes resistentes.
6. El uso combinado de la bacteriocina coagulina C23 y el fago FWLLm3 inhibe totalmente el crecimiento de *L. monocytogenes* 2000/47, por lo que se propone el uso combinado de estos dos antimicrobianos como método eficaz de control de *L. monocytogenes* 2000/47 en alimentos.

# **ABREVIATURAS**

## **6. ABREVIATURAS**

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**C23:** coagulina 23

**CECT:** Colección Española de Cultivos Tipo

**DO600:** densidad óptica a 600 nanómetros

**EOP:** eficiencia de plaqueo

**I+D:** investigación y desarrollo

**Ltc 481:** lacticina 481

**log:** logaritmo en base 10

**M17:** caldo de peptona de caseína y de peptona de soja

**MIC:** concentración mínima inhibitoria

**MOI:** multiplicidad de infección

**MRS:** caldo de peptona y glucosa

**PFM:** fuerza protón-motriz

**Plnc C:** plantaricina C

**RTE:** alimentos listos para el consumo

**SNC:** sistema nervioso central

**TSB:** caldo de triptona y soja (“Tryptone and soy broth”)

**UE:** Unión Europea

**UFC:** unidades formadoras de colonia

**UFP:** unidades formadoras de placas

# **BIBLIOGRAFÍA**

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann, H.W.** (2009). Phage classification and characterization. *Methods Molecular Biology*. 501:127-40.
- Adriaenssens EM, Van Vaerenbergh J, Vandenneuvel D, Dunon V, Ceysens P-J, et al.** (2012) T4-Related Bacteriophage LIMEstone Isolates for the Control of Soft Rot on Potato Caused by 'Dickeya solani'. *PLoS ONE* 7(3): e33227. doi:10.1371/journal.pone.0033227.
- Arqués, J.L., Fernández, J., Gaya, P., Nuñez, M., Rodríguez, E., Medina, M.,** (2004). Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 95, 225–229.
- Boletín Epidemiológico Semanal vol.20, nº8,** (2012). CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGÍA. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Economía y Competitividad Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.
- Bigot, B., Lee, WJ., McIntyre, L., Wilson, T., Hudson, JA., Billington, C., Heinemann JA.** (2011). Control of *Listeria monocytogenes* growth in a ready to eat poultry product using a bacteriophage. *Food Microbiology* 28:1448-1452.
- Bigwood, T., Hudson, JA., Billington, C., Carey-Smith C.V., Heinemann, JA.** (2007). Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiology* 25: 400-406.
- Boerlin, P., Rocourt, J., Grimont, F., Grimont, P. A. D., Jacquet, C. y Piffaretti, J. C.** (1992). *Listeria ivanovii subsp. londoniensis subsp. nov.* *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 69-73.
- Bouttefroy, A., Millière, J.B.** (2000). Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. *International Journal of Food Microbiology*. 62: 65-75.
- Branen, J.K., Davidson, P.M.,** (2004). Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology* 90, 63–74.

- Bull, J.J., Levin, B.R., DeRouin, T., Walter, N., and Bloch, C.** (2002). Dynamics of success and failure in phage and antibiotic therapy in experimental infections. *BCM Microbiology* 26:2-35. Review.
- Cairos, B.J., Timms,, A.R., Cansen, V.A., Connerton, I.F. and Payne, R.J.** (2009). Quantitative models of in vitro bacteriophage-hosts dynamics and their application to phage therapy. *PLoS Pathog.*5(1):e1000253.
- Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes, and M. L. Chikindas.** (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology.* 71:1–20.
- Codex Alimentarius:** <http://www.codexalimentarius.org>.
- Daly, C., Davis, R.** (1998). The biotechnology of lactic acid bacteria with emphasis on applications in food safety and human health. *Agricultural and. Food Science. of Finland* 7: 251-265.
- d’Herelle, F. C. R.** (1917) Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Academy Science Ser* 165: 3.
- Drexler, K., Dannull, J., Hindennach, I., Mutschler, B., Henning, U.** (1991). Single mutations in a gene for a tail fiber component of an *Escherichia coli* phage can cause an extension from a protein to a carbohydrate as a receptor. *Journal of Molecular Biology* 219:655-663.
- Dinsmore, P.K., Klaenhammer, T.R.,** (1995). Bacteriophage resistance in *Lactococcus*. *Molecular Biotechnology* 4, 297–314.
- EFSA Journal** “The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011” 2013;11(4):312
- Ettayebi, K., El Yamani, J., Rossi-Hassani, B.,** (2000). Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters* 183, 191–195.
- Fang, T.J., Tsai, H.,** (2003). Growth patterns of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef treated with nisin, chelators, organic acids and their combinations immobilized in calcium alginate gels. *Food Microbiology* 20, 243–253.

- Fujisawa, M., Hamasaki, R. Kawasaki, T., Fujie M., and Yamada. Y.** (2011). Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by Treatment with Lytic Bacteriophages Applied and Environmental Microbiology. June 2011 vol. 77 no. 12 4155-4162.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Lucas L´opez, R., and Ben Omar, N.** (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. International Journal of Food Microbiology 120, 51–70.
- Galvéz, A., Lucas, R., Hikmate, A., Valdivia, E., Ben N.**(2008). Application of bacteriocins in the control of fooborne pathogenic and spoilage bacteria. Critical Reviews in Biotechnology 28, 125-152.
- García P., Rodríguez, L., Rodríguez, A. and Martínez B.** (2010). Food biopreservation: Promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. Trends in Food Science and Technology. DOI:10.1016.
- Garde, S., M. Avila, M. Medina, and M. Nunez.** (2004). Fast induction of nisin resistance in *Streptococcus thermophilus* INIA 463 during growth in milk. International Journal of Food Microbiology 96,165–172.
- González, B., Arca, P., Mayo, B. y Suárez, J.E.** (1994). “Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin”. Applied and Environmental Microbiology, 60, 2158-2163.
- Gravesen, A., K. Sørensen, F. M. Aarestrup, and S. Knøchel.** (2001). Spontaneous nisin-resistant *Listeria monocytogenes* mutants with increased expression of a putative penicillin-binding protein and their sensitivity to various antibiotics. Microbial Drug Resistance 7:127–135.
- Gravesen, A., A. M. Jydegaard Axelsen, J. Mendes Da Silva, T. B. Hansen, and S. Knøchel.** (2002). Frequency of bacteriocin resistance development anassociated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology 68, 756–764.
- Guenther, S. and Loessner, J.** (2011). Bacteriophage biocontrol of *Listeria monocytogenes* on soft ripened white mold and red-smear cheeses. Bacteriophage 1:2, 94-100; Landes Bioscience.

- Gutiérrez Fernández, D. (2010).** Evaluación de la técnica RAPD-PCR para el estudio de la diversidad genética de bacteriófagos. Proyecto Fin de Master de Biotecnología Alimentaria.
- Harcombe, W.R, Bull J.J. (2005)** Impact of phages on two-species bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:5254-5259.
- Hui Zhang, Hongduo, B.,** Billington, C., Hudson, JA., Wang, R. (2012). Isolation and lytic activity of the *Listeria* bacteriophage endolysin Lysz5 against *Listeria monocytogenes* in soya milk. *Food Microbiology* 31: 133-136.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods)** (1998). Microorganismos de los alimentos 5. Características de los patógenos microbianos. En: Roberts T. A., Baird-Parker A. C. y Tompkin R. B. (eds.). Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Informe anual 2011.** CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGÍA. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Economía y Competitividad Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.
- Jones, D. (1990).** Foodborne illness - foodborne listeriosis. *The lancet* 336, 1171-1174.
- Lee, WJ. (2008).** Isolation y characterisation of phages infecting gram positive food bacteria. Master of science. University of Canterbury.
- Leistner, L. (2000).** Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55, 181–186.
- Leverentz, B., Conway, W.S., Camp, M.J., Janisiewicz, W.J., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R., and Sulakvelidze, A. (2003).** Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Applied Environmental Microbiology*. 69, 4519-4526.
- Luders, T., Birkemo, G. A., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., and Nes, I. F. (2003).** Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 69, 1797–1799.
- Madigan M., Martinko, J., Parker, J. (1998).** Microbiología de los microorganismos Brock 8º Edición. Pp. 405-408. Editorial Prentice Hall.

- Maisnier-Patin, S., Richard, J.,** (1996). Cell wall changes in nisin resistant variants of *Listeria innocua* grown in the presence of high nisin concentrations. *FEMS Microbiology Letters* 140, 29–35.
- Mantovani, H. C., and J. B. Russell.** (2001). Nisin resistance of *Streptococcus bovis*. *Applied Environmental Microbiology*. 67, 808–813.
- Margolles, A., B. Mayo, and C. G. de los Reyes-Gavilan.** (1998). Polymorphism of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains isolated from short-ripened cheeses. *Journal of Applied Microbiology* 84, 255–262.
- Margolles, A., Mayo, B. and de los Reyes-Gavilan, C.** (2001). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains isolated from short-ripened cheeses to some antibiotics and heavy metal salts. *Food Microbiology* 18, 67–73.
- Martínez, B., Obeso, J.M., Rodríguez, A. and García, P.** (2008). Nisin-bacteriophage crossresistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology* 122, 253-258.
- Martínez, B., Bravo, D., Rodríguez, A.** (2005). Consequences of the development of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* in fermented dairy products. *Journal of Food Protection* 68, 2383-2388.
- Martínez, B., Rodríguez, A.** (2005). Antimicrobial susceptibility of nisin resistant *Listeria monocytogenes* of dairy origin. *FEMS Microbiology Letters* 252:65-67.
- Martínez, B., Suárez, J.E. y Rodríguez, A.** (1995). “Antagonistic activities of wild lactococcal strains isolated from homemade cheeses”. *Journal of Food Protection* 58, 1118-1123.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A.J. y Berkeley, R.C.W.** (1972). “Methods for studying bacteriocins”. En *Methods in Microbiology*. Norris, J.R. y Ribbons, D.W. (eds.) 7A, 315-422. Academic Press Inc., New York.
- Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., Ikeuchi, M., Tani, T., Fujieda, M., Wakiguchi and H., Imai, S.** (2005) Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy* 11, 211–219.

- Mazzotta, A.S. and Montville, T.J.** (1997). Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10 degrees C and 30 degrees C. *Journal of Applied Microbiology* 82, 32–38.
- Mizoguchi, K., Morita, M., Fischer, C. R., Yoichi, M., Tanji, Y., and Unno, H.** (2003). Coevolution of bacteriophage PP01 and *Escherichia coli* O157:H7 in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology* 69,170-176.
- Moak, M., and Molineaux, I.J.** (2004). Peptidoglycan hydrolytic activities associated with bacteriophage virions. *Molecular Microbiology* 51, 1169-1183.
- Montag, D., Degen, M and U Henning.** (1987). Nucleotide sequence of gene t (lysis gene) of the *E. coli* phage T4. *Nucleic Acids Research* 15, 6736.
- O'Driscoll, J., Heiter, D., Wilson, G., Fitzgerald, G., Roberts, R., van Sinderen, D.,** (2006). A genetic dissection of the LlaJI restriction cassette reveals insights on a novel bacteriophage resistance system. *BMC Microbiology* 6, 40.
- Payne, R.J.H., Jansen V.A.A.** (2000). Phage therapy: the peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 68, 225-230.
- Pearl, S., Gabay, C., Kishony, R., Oppenheim, A and Balaban, N.Q.** (2008). Nongenetic individuality in the host-phage interaction. *PLoS Biology* 6, 120.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G. and Gotz, F.** (1999) Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *Journal of Biology and Chemistry* 274, 8405–8410.
- Raso J, Barbosa-Cánovas GV** (2003). Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.43, 265-285.
- Rilla Villar, N.** (2003). Aplicación de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas en bioconservación. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.
- Rees, E.D. and Dodd, C.E.R.** (2006). Phage for rapid detection and control of bacterial pathogens in food. *Advances in Applied Microbiology* 59, 159-186.

- Rodriguez, J. M., M. I. Martínez, and J. Kok.** (2002). Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42, 91–121.
- Sahl, H.-G.** (1985). Influence of the staphylococcin-like peptide Pep5 on membrane potential of bacterial cells and cytoplasmic membrane vesicles. *Journal of Bacteriology* 162, 833-836.
- Sim, J., Hood, D., Finne, L., Wilson, M., Graham, C., Hudson, J.A.** (2002). A series of incidents of *Listeria monocytogenes* non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats. *Letters in Applied Microbiology* 35, 409-413.
- Stiles, M.E.** (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70, 331–345.
- Somolinos, M.; García, D.; Pagán, R.; Mackey, B.** (2008). Relationship between sublethal Injury and Microbial Inactivation by the Combination of High Hydrostatic Pressure and Citral or tert Butyl Hydroquinone. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 7570-7577.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., and Morris, J. G. J.** (2005) Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 45, 649-659.
- Vignolo, G., Palacios, J., Farias, M. E., Sesma, F., Schillinger, U.,Holzapfel,W., and Oliver, G.** (2000). Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria species* in broth and meat system. *Current Microbiology* 41, 410–416.