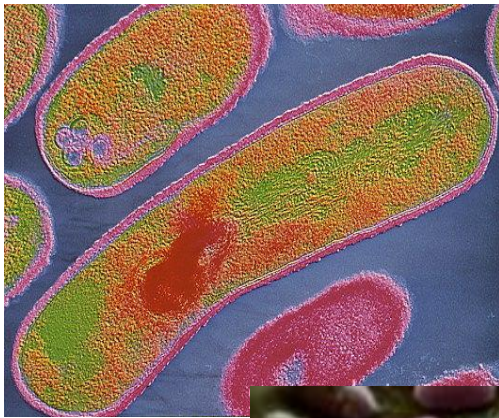


Universidad Nacional de Río Cuarto

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Microbiología e Inmunología
Cátedra Bacteriología



“Actividad antilisteria de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de muestras clínicas”



María Virginia Jaureguiberry.

Dirección: Dra. Liliana Pascual.

Co-dirección: Dra. Lucila Barberis.



Quiero dedicar este trabajo a las personas que más me han llenado hasta la fecha. Pero no solo este trabajo, sino todos mis años de estudio que, en gran parte, han sido posibles gracias a ellos, que han logrado que este mundo sea mucho mejor.

En primer lugar, quiero nombrar a Dios, que me ha hecho posible llegar a éste punto de mi vida, gracias DIOS!!!!

A mis padres, quienes dan su vida entera para que sea quien soy y como soy, a cambio de nada.

A mis hermanos por haber confiado siempre en mi y por su paciencia con mi mal humor en momentos de nervios.

A Lucila y Liliana por darme un espacio en su laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Francisco. Gracias por tu dedicación, por el tiempo y el respaldo que me has dado; por tu guía durante mis primeros pasos en el laboratorio y por tus sugerencias para poder terminar este trabajo. Y gracias Pauli A. por todos los favores!!

A Lu y Ye, que como ya dije en una oportunidad le pusieron “ritmo”, risas, chistes y millones de momentos alegres a aquellas interminables horas de estudio. Por esos momentos inolvidables, por ser mis amigas...

A Sole, Fer, Juampa y Ana Luz que fueron, durante todos estos años, mi cable a tierra. Gracias amigos por levantarme en los momentos difíciles y por compartir mis alegrías.

No puedo olvidar a mis amigas de Mackenna con las cuales he compartido varias facetas de mi vida, y que de alguna u otra forma estuvieron conmigo en estos años universitarios; gracias por lo buenos y malos momentos.

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el cariño y apoyo incondicional de las personas nombradas. Los quiero!!!

Este trabajo final fue realizado en la cátedra Bacteriología, en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Seminarista

María Virginia Jaureguiberry

Directora

Dra. Liliana Pascual

Co- Directora

Dra. Lucila Barberis

Jurado evaluador

Dra. Liliana Pascual

Dra. Susana Bettera

Dra. Carina Magnoli

ÍNDICE

1 RESUMEN	1
------------------------	---

2 INTRODUCCION

2.1 Bacterias ácido lácticas.....	2
2.2 Características generales del género <i>Lactobacillus</i>	3
2.3 Microbiota vaginal y acción bioprotectora de especies de <i>Lactobacillus</i>	6
2.4 Probióticos.....	9
2.5 Bacteriocinas.....	10
2.5.1 Generalidades de las bacteriocinas	10
2.5.2 Clasificación de las bacteriocinas	12
2.5.2.1 Bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas	13
2.5.3 Modo de acción de las bacteriocinas	14
2.6 Género <i>Listeria</i>	16
2.6.1 Características de género <i>Listeria</i> . Distribución ecológica	16
2.6.2 Ciclo de multiplicación de <i>Listeria monocytogenes</i> . Factores de virulencia intervinientes.....	18
2.6.3 Algunos aspectos epidemiológicos de la listeriosis.....	21
2.6.4 Espectro clínico de la listeriosis	23
2.6.5 Susceptibilidad antibiótica de <i>Listeria monocytogenes</i>	25

3 HIPÓTESIS DE TRABAJO	28
-------------------------------------	----

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general	28
4.2 Objetivos específicos	28

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas utilizadas	29
5.1.1 <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60	29
5.1.2 Identificación y caracterización de <i>Listeria monocytogenes</i>	32
5.2 Obtención de sobrenadante libre de células (SLC) de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60	36
5.3 Actividad inhibitoria de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas sintetizadas por lactobacilos sobre las cepas de <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	37
5.4 Ensayos de interacción de las bacteriocinas de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	39

5.5 Determinación de la concentración inhibitoria mínima de las bacteriocinas de <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	41
5.6 Estudio de la sensibilidad a antibióticos de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	41
5.7 Análisis estadístico	42

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Características culturales de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60	43
6.2 Cultivo e identificación de <i>Listeria monocytogenes</i>	44
6.3 Detección de la actividad antimicrobiana de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	47
6.4 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de las bacteriocinas de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	58
6.5 Interacciones de las bacteriocinas B60 y B23 sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	61
6.6 Perfil de susceptibilidad antibiótica de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> aisladas	66

7 CONCLUSIONES	69
----------------------	----

8 ANEXO: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

8.1 Análisis de varianza: L23 vs L60	71
8.2 Análisis de varianza: L23 vs B23	72
8.3 Análisis de varianza: L60 vs N60 vs B60	73
8.4 Análisis de varianza: B23 vs B60	74
8.5 Análisis de varianza: B23 vs B60 vs MB	75

9 BIBLIOGRAFÍA	80
----------------------	----

1 RESUMEN

La listeriosis es una enfermedad infecciosa bacteriana grave causada por *Listeria monocytogenes*, siendo el consumo de alimentos contaminados su origen fundamental. A pesar de la ubicuidad del microorganismo, la tasa real de la enfermedad es bastante baja y se asocia casi siempre a condiciones predisponentes. Actualmente, diferentes grupos de investigación estudian estrategias alternativas al uso de antibióticos para tratar este cuadro infeccioso. Las bacterias ácido lácticas pertenecientes al género *Lactobacillus* pueden estar asociadas al hombre y a los animales como grandes defensores de las mucosas, encontrándose asociados al tracto gastrointestinal y vaginal. Los lactobacilos protegen la vagina de las mujeres saludables de la invasión de patógenos a través de dos mecanismos, la adherencia específica al epitelio vaginal y la producción de metabolitos activos, incluyendo ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y bacteriocinas. El principal objetivo de este trabajo fue evaluar y cuantificar la actividad inhibitoria determinada por la producción de ácidos, H_2O_2 y bacteriocinas de las cepas de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 aisladas del tracto genital femenino sobre diferentes cepas de *Listeria monocytogenes*. Para este estudio se utilizó la técnica de difusión de pozos en el agar. La concentración inhibitoria mínima (CIM) de cada una de las cepas de lactobacilos productoras de bacteriocinas, se realizó con el sobrenadante libre de células y diluciones seriadas del mismo. Los resultados obtenidos mostraron que el 100% de las cepas de *L. monocytogenes* fueron inhibidas por ambas bacteriocinas. La CIM de la bacteriocina de *L. fermentum* fue de 80 UA/ml para el 60% de las cepas, 40 UA/ml para el 20% de las cepas y de 20 UA/ml para el 20% de las cepas. La CIM de la bacteriocina de *L. rhamnosus* fue de 40 UA/ml para el 40% de las cepas y 160 UA/ml para el 60% de las cepas. Al realizar los ensayos de interacción se observó sinergismo en la acción de ambas bacteriocinas sobre el 100% de las cepas. Los resultados hallados en este trabajo con las bacteriocinas de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* sobre *L. monocytogenes*, permitirían a futuro su aplicación como microorganismos bioterapéuticos con un alto potencial probiótico.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BALs) son un grupo amplio y heterogéneo de bacterias con diferentes características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. La descripción general de estos microorganismos incluye a bacterias Gram-positivas, no esporuladas, cocos o bacilos con un metabolismo fermentativo, cuyo producto final predominante es ácido láctico. Obtienen energía mediante la fosforilación a nivel de sustrato, durante la oxidación de carbohidratos. Poseen actividad proteolítica, lo que les permite la obtención de aminoácidos a partir de proteínas; aunque ésta capacidad es reconocidamente inferior a otros grupos microbianos (*Bacillus* spp, *Proteus* spp, *Pseudomona* spp) (Waldir y col, 2007; Martin y col, 2008b).

Las BALs son microorganismos estrechamente vinculados al ser humano y a los animales. Naturalmente están asociados a superficies de mucosas, particularmente al tracto gastrointestinal y vaginal. Además, son habitantes frecuentes de una gran variedad de nichos caracterizados por la presencia de carbohidratos solubles, productos de la degradación de proteínas y vitaminas, y en ambientes con bajas tensiones de oxígeno. Algunos ejemplos de productos o hábitat donde habitualmente se encuentran las BALs pueden ser leche y sus derivados, productos cárnicos, pescado y derivados de la pesca, frutas y hortalizas frescas, ensilados y otros vegetales; demostrando una ductibilidad clave y útil para la producción de alimentos y bebidas fermentadas (Makarova y Koonin, 2007; Monroy Dosta y col, 2009).

Históricamente los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* son las principales BALs. La descripción de nuevos géneros sugiere, además, a los siguientes miembros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* como parte de las BALs. El género *Bifidobacterium*, frecuentemente está considerado en el mismo contexto que las bacterias ácido lácticas ya que posee algunas características comunes. (Collado Amores, 2004; Monroy Dosta y col, 2009).

La clasificación de las BALs en diferentes géneros está basada en la morfología, modo de fermentar la glucosa, el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la habilidad para crecer a elevadas concentraciones de sales y la tolerancia ácido-base. Desde punto de vista taxonómico, las BALs no constituyen un grupo monofilético (no tienen un ancestro común) (Collado Amores, 2004; Makarova y Koonin, 2007).

Las BALs consideradas por la Administración general de Alimentos y Drogas (FDA) como bacterias GRAS (Generally Recognized As Safe- Reconocido como Seguro para la salud), han sido utilizadas en la industria alimentaria, puesto que proporciona sabor y textura, incrementan el valor nutricional de los mismos, y desde hace décadas son usados como bioconservantes, debido a la producción de bacteriocinas y otras sustancias que ejercen acción antibacteriana contribuyendo a prevenir la descomposición de los alimentos. Las bacteriocinas de las BALs limitan el crecimiento de bacterias descomponedoras y patógenas de los alimentos, con la ventaja frente a los conservantes químicos, de ser sustancias de naturaleza proteica que, al biodegradarse, no forman compuestos secundarios (Botina y col, 2008; Dolz, 2008). A nivel mundial las BALs y las bacteriocinas purificadas con marca registrada son comercializados por empresas productoras ubicadas en países industrializados como Dinamarca, Italia, Estados Unidos y algunos países latinoamericanos como Argentina, los cuales utilizan la bioconservación como un mecanismo de control de bacterias en la elaboración de sus productos (Botina y col, 2008).

2.2 Características generales del género *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* (lactis-leche; bacillus-pequeños bacilos) se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-bacilos tipo coryneformes. Estos bacilos se presentan comúnmente formando cadenas y, en general, son inmóviles, pero cuando tienen movilidad es por la presencia de flagelos peritricos. Son Gram positivos y sólo las células muertas pueden dar resultados variables a la tinción de Gram. Además, no

esporulan y algunas cepas presentan cuerpos bipolares que probablemente contengan polifosfato. Metabólicamente pueden ser homofermentadores o heterofermentadores (Samaniego Fernández y Sosa del Castillo, 2000; Martin y col, 2008b).

Los lactobacilos se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales, carnes y pescados. Forman parte de la flora normal de la boca, tracto intestinal y aparato reproductor femenino humano y de muchos animales. Son utilizados en procesos industriales de fermentación láctica tales como yogur, quesos, en productos derivados de los vegetales, pepinillos y aceitunas, etc. También pueden encontrarse en fertilizantes de origen orgánico. Algunas especies individuales se han adaptado a determinados nichos ecológicos, que son hoy sus hábitats naturales, siendo muy difícil encontrarlos fuera de éstos (Collado Amores, 2004; Martin y col, 2008b).

Las colonias de *Lactobacillus* en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Generalmente no presentan actividad proteolítica ni lipolítica. No licúan la gelatina ni digieren la caseína. Normalmente no reducen los nitratos. Tampoco producen indol ni sulfídrico (SH₂). Son catalasa negativos. En medio líquido su crecimiento se presenta dando un sedimento suave y homogéneo, sin formación de películas. Los lactobacilos no desarrollan olores típicos al crecer en medios comunes, pero contribuyen a modificar las características organolépticas de alimentos fermentados, produciendo compuestos volátiles como diacetilo y sus derivados. Algunas especies son beneficiosas para la salud humana y animal al ser considerados como probióticos. La actividad antimicrobiana de estos microorganismos se basa en la producción de ácidos orgánicos, compuestos aromáticos (diacetilo y acetaldehído), otros metabolitos con capacidad inhibitoria tales como peróxido de hidrógeno (H₂O₂), bacteriocinas y sustancias surfactantes (Collado Amores, 2004; Martin y col, 2008b).

En términos generales, las especies del género *Lactobacillus* son exigentes nutricionalmente, no solo requieren carbohidratos como fuente de carbono y energía, sino también de aminoácidos, vitaminas y nucleótidos. El medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) empleado para el cultivo de lactobacilos y otras BALs brinda estos requerimientos nutricionales especiales mediante el aporte de carbohidratos fermentables, peptona, extracto de carne y de levadura. Algunas especies necesitan una

suplementación con jugo de tomate, manganeso, acetato y especialmente Tween 80 para su estimulación y proliferación *in vitro*, especialmente para *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermentum*, ambas especies son consideradas fastidiosas nutricionalmente (Collado Amores, 2004; Martin y col, 2008b).

Los lactobacilos crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 4,5-6,4 y con uno óptimo de desarrollo entre 5,5 y 6,2. Son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo del valor 4,0 mediante la formación de ácido láctico. De esta forma evitan, o al menos, disminuyen considerablemente el crecimiento de casi todos los otros microorganismos competidores, exceptuando el de otras bacterias lácticas y el de las levaduras. En general, son bacterias anaerobias aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerófilas o anaeróbicas y se conoce que un incremento de la concentración de CO₂ (de aproximadamente 5% o hasta el 10%) puede estimular el crecimiento. La mayor parte de los lactobacilos son mesófilos (temperatura óptima: 30 - 40°C), con un límite superior de 40°C (Collado Amores, 2004; Martin y col, 2008b).

Carecen de sistemas de citocromos para ejecutar la fosforilación oxidativa y no poseen enzimas superóxido dismutasas ni catalasas. Transforman la glucosa y las hexosas aldehídicas similares, y los alcoholes polihidroxílicos en ácido láctico por vía homofermentativa, o bien, en ácido láctico y otros productos finales como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico utilizando una vía heterofermentativa. Finalmente el ácido láctico constituye más del 50% de los productos finales del metabolismo de estos microorganismos (Samaniego Fernández y Sosa del Castillo, 2000). En la tabla 1 se clasifican los grupos de fermentación de los lactobacilos en función del tipo de sustrato utilizado, la presencia de enzimas catalizadoras y se ejemplifican algunas especies para cada vía catabólica.

Tabla 1: Características fisiológicas del género *Lactobacillus*.

CARACTERÍSTICA	GRUPO I Homofermentadores obligados	GRUPO II Heterofermentadores Facultativos	GRUPO III Heterofermentadores obligados
Fermentación de pentosas	-	+	+
CO ₂ a partir de la glucosa	-	-	+
CO ₂ a partir del gluconato	-	+	+
Presencia de aldosa	+	+	-
Presencia fosfocetolasa	-	+	+
Representantes	<i>L. acidophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. jensenii</i> <i>L. salivarius</i>	<i>L. casei</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. brevis</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. reuteri</i>

(Collado Amores, 2004).

2.3 Microbiota vaginal y acción bioprotectora de especies de *Lactobacillus*

El ecosistema vaginal es un ambiente complejo en el cual habitan más de 50 especies de microorganismos. Sin embargo, desde el primer estudio microbiológico de vagina humana realizado por Döderlein en 1892 y hasta el momento, los lactobacilos han sido descritos como los microbios dominantes en dicho hábitat, particularmente en la mujer sana. Se encuentran en una concentración de 10^7 a 10^8 UFC/g de fluido vaginal y ayudan a mantener dicho ecosistema saludable. Aún así, la microbiota vaginal cambia constantemente, solo el 22% de las mujeres tienen una microbiota normal en la que predominan lactobacilos desde la pubertad hasta la menopausia. Las especies más comunes de *Lactobacillus* presentes en la vagina de mujeres premenopausicas saludables son las siguientes: *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. acidophilus*,

L. fermentum, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. vaginalis*, *L. delbrueckii*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* y *L. iners* (Gardiner y col, 2001; Ocaña y Elena Nader-Macías, 2004; Cribby y col, 2008; Gillor y col, 2008a; Martin y col, 2008a; Pascual y col, 2008b).

Los cambios hormonales junto al pH vaginal y el contenido de glucógeno pueden afectar la capacidad de los lactobacilos para adherirse a las células epiteliales y colonizar la vagina. Durante el ciclo menstrual altas concentraciones de estrógeno incrementan la adherencia de los lactobacilos a las células del epitelio vaginal. En cambio, con la disminución de los niveles de estrógeno asociados con la menopausia, ocurre un decrecimiento en el número de los lactobacilos presentes (Gardiner y col, 2001; Cribby y col, 2008).

Los lactobacilos juegan un rol importante en el mantenimiento del ecosistema vaginal normal mediante los siguientes mecanismos: (a) la adherencia específica a las células epiteliales (b) la producción de compuestos antimicrobianos como ácidos orgánicos (principalmente ácido láctico), bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y de compuestos tensioactivos (como la surlactina) (Amant y col, 2002; Ocaña y Nader-Macías, 2004; Reid y Hammond, 2005).

(a) Adherencia al epitelio vaginal: la protección de la mucosa vaginal depende del reconocimiento específico entre las estructuras superficiales de los lactobacilos (adhesinas) y del epitelio (receptores). El resultado de la asociación entre los lactobacilos y el epitelio vaginal es la formación de una biopelícula que lo protege frente a la colonización por microorganismos indeseados (Martin y col, 2008b).

La autoagregación de los lactobacilos con características probióticas es necesaria para la adherencia a células del epitelio vaginal. Por otro lado, la capacidad de algunos lactobacilos de coagregar con cepas patógenas también es una propiedad deseada, para impedir el desplazamiento de la biota lactobacilar previniendo la colonización de microorganismos patógenos (Pascual y col, 2008b).

(b) Producción de compuestos antimicrobianos: el origen de la acidez vaginal es el ácido láctico que se genera como producto final del metabolismo fermentativo

de los glúcidos obtenidos desde las células epiteliales donde se acumula glucógeno y éste es convertido a glucosa. Este último es aprovechado por los lactobacilos residentes, y así, se mantiene un pH fisiológico entre 4- 4,5. Esta condición ácida mantenida por la población de lactobacilos impide la colonización de microorganismos indeseados y contribuye con el equilibrio de la microbiota en la vagina sana de mujeres en edad reproductiva (Martin y col, 2008b).

Ciertas especies de lactobacilos como por ejemplo *L. crispatus*, *L. rhamnosus* y *L. jensenii* producen H_2O_2 , mientras que en otras como *L. fermentum* esta producción es excepcional. El exceso de este metabolito puede inhibir o eliminar a otros microorganismos, principalmente a los grupos que carecen o producen peroxidasas en concentraciones bajas. El efecto bactericida del H_2O_2 viene determinado por su capacidad oxidante y por la generación, a partir de ella, de especies reactivas del oxígeno, aniones superóxidos y radicales hidroxilos en el fluido vaginal, que dañan la integridad del ADN celular del microorganismo patógeno (Aroucheva y col, 2001; Tomas y col, 2004).

Algunas especies de lactobacilos producen bacteriocinas efectivas contra patógenos vaginales como *Enterococcus spp.*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, micoplasmas urogenitales, etc. Las bacteriocinas son polipéptidos que exhiben actividad antimicrobiana y se sintetizan en los ribosomas. Ciertas bacterias lácticas producen una variedad de bacteriocinas, aunque la más reconocida es la nisina que se emplea industrialmente como conservante alimenticio. En términos generales estas sustancias son anfipáticas y originan la apertura de poros en las membranas e incluso la lisis celular (Pascual 2004; Li y col, 2005; Martinez y col, 2008; Martin y col, 2008b; Daniele, 2009).

La producción de biosurfactantes como agentes tensioactivos por algunas cepas de lactobacilos originan una disminución de la tensión superficial que podría reducir la capacidad de adherencia de ciertos patógenos (Criby y col, 2008).

Un desplazamiento de los lactobacilos vaginales puede tener serias consecuencias en la salud del huésped, incrementando el riesgo de adquirir infecciones urogenitales y de parto prematuro en las mujeres gestantes (Gardiner y col, 2001; Cribby y col, 2008).

2.4 Probióticos

Probiótico es un término de origen griego que significa "a favor de la vida". De acuerdo a la definición adoptada por Las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO), los probióticos son "microorganismos vivos los cuales, al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren efectos benéficos en la salud del huésped". Son considerados reguladores biológicos. Durante los últimos 20 años, el uso de probióticos en diferentes campos productivos y de investigación se ha generalizado, esto es debido al efecto que han demostrado tener en la prevención de enfermedades, tanto en el ser humano como en muchas especies de animales. Se utilizan en la conservación de alimentos, siendo una alternativa para contrarrestar el uso indiscriminado de químicos y antibióticos (González Martínez y col, 2003; Barboza-Corona y col, 2004; Reid y Hammond, 2005; Mennickent y Green, 2009).

Generalmente, los microorganismos utilizados como probióticos son bacterias comensales, entre ellas se encuentran especies de *Lactobacillus*, ciertos cocos Gram positivos, bifidobacterias y algunas levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces boulardii*. Los más utilizados pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Los probióticos pueden incorporarse a un amplio abanico de productos, tanto en alimentos como en medicamentos y suplementos dietéticos. (Collado Amores, 2004; Martin y col, 2008b; Mennickent y Green, 2009).

Los efectos benéficos de los probióticos en la salud humana y en la nutrición están siendo cada vez más reconocidos. Diferentes grupos de trabajo, que estudian las propiedades y la funcionalidad de los microorganismos vivos en la dieta, sugieren que los

probióticos desempeñan un papel importante en las funciones digestivas, inmunitarias y respiratorias (Dolz, 2008).

El uso terapéutico de los probióticos es amplio dentro de las enfermedades gastrointestinales, metabólicas, alergias, afecciones de la piel, artritis reumatoidea y cirrosis hepática. Aún así, poco se ha indagado su potencial uso como probiótico para la prevención y/o tratamiento de infecciones urogenitales (Guías prácticas de la Organización mundial de Gastroenterología, 2008; Mennickent y Green, 2009).

2.5 Bacteriocinas

2.5.1 Generalidades de las bacteriocinas

A través de la evolución, los microorganismos han desarrollado distintas estrategias para competir por nutrientes en su medio ambiente. Por ejemplo, algunos han mejorado sus sistemas de quimiotaxis y otros han elaborado compuestos antimicrobianos para inhibir a otros miembros del ambiente. Diversas son las sustancias antagónicas que los microorganismos producen para dominar en su hábitat, como los antibióticos de amplio espectro, productos del metabolismo como ácidos orgánicos, moléculas quelantes de hierro (sideróforos) y bacteriocinas (Dolz, 2008).

La prevención de enfermedades y la conservación de los alimentos han motivado que en el ámbito industrial y el científico se interesen por conocer con mayor detalle el modo de acción de los probióticos. Las bacterias empleadas en aplicaciones probióticas ayudan a mantener o restablecer la biota microbiana natural del huésped. La capacidad de las bacterias probióticas de excluir exitosamente a las especies no deseadas es a menudo debida, o favorecida, por la producción de sustancias antimicrobianas. Las más comúnmente encontradas son las bacteriocinas, que pueden ser potencialmente usadas para la prevención o tratamientos de infecciones bacterianas. Pueden complementar o, en ciertos casos, reemplazar a los antibióticos (Dolz, 2008; Gillor y col, 2008a; Ruiz y col, 2009).

Las bacteriocinas son polipéptidos heterogéneos con actividad antimicrobiana, que a diferencia de los antibióticos peptídicos, son producidos por síntesis ribosomal y son segregadas por un gran número de bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores. Estas sustancias actúan frente a bacterias estrechamente relacionadas y también sobre otras especies bacterianas heterólogas, hongos y algunos parásitos (González Martínez y col, 2003; Barboza-Corona y col, 2004; Li y col, 2005; Gillor y col, 2008a; Martin y col, 2008b; Rojas y Vargas, 2008; Pascual y col, 2008a; Monroy Dosta y col, 2009; Ruiz y col, 2009).

En la naturaleza existe una enorme diversidad de este tipo de sustancias. Las bacteriocinas han sido encontradas en casi todas las especies bacterianas examinadas. Dentro de una especie podrían ser producidas diferentes tipos de bacteriocinas. Se hipotetiza que el 99% de las bacterias pueden producir, al menos, una bacteriocina. (Dolz, 2008; Gillor y col, 2008a; Monroy Dosta y col, 2009).

La biosíntesis de bacteriocinas ocurre en la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma y, en la mayoría de los casos, guarda relación con la biomasa producida. Las variaciones de las condiciones de cultivo, como por ejemplo, temperatura, pH y tiempo, ejercen un profundo efecto en la producción de bacteriocinas activas. En general, se producen más bacteriocinas cuando la cepa productora se cultiva a su temperatura y pH óptimo de crecimiento. Los medios complejos que contienen una fuente rica en nitrógeno son óptimos para el aumento de su producción (Moreira Dos Santos, 1993; Gillor y col, 2008a; Rojas y Vargas, 2008).

En algunas bacterias, principalmente en las Gram positivas, su producción está regulada por el mecanismo de *“quorum sensing”* o autoinducción, que parece jugar un rol importante en el monitoreo de la densidad celular de la población bacteriana en un ambiente dado; la autoinducción se produce cuando en el medio se acumula una cierta concentración de una molécula señal (feromona). Esta molécula es secretada por la mayoría de las células bacterianas a una concentración baja, pero constante. Por lo tanto, la concentración de feromona es directamente proporcional a la densidad celular (Dridier y col, 2006; Hammami y col., 2007).

El espectro antimicrobiano de las bacteriocinas parece estar asociado a la presencia de receptores apropiados en los microorganismos sensibles. Sin embargo, la

mayoría de las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram-negativas actúan fundamentalmente sobre especies microbianas relacionadas taxonómicamente con ellas, mientras que las bacteriocinas de las Gram-positivas, son antagonistas de una mayor diversidad de especies Gram-positivas (Moreira Dos Santos, 1993).

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimenticia, ya que se pueden utilizar como conservantes biológicos puros que, en un momento dado, podrían reemplazar a los conservantes químicos ya que tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman compuestos secundarios. En la actualidad, las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son las que encierran un mayor interés, puesto que son consideradas microorganismos seguros para la salud. Además, dichos microorganismos y sus metabolitos han sido consumidos históricamente por generaciones, principalmente en aquellos países habituados a la inclusión de productos fermentados en sus dietas, sin encontrarse efectos adversos en la población. En 1928, la primer bacteriocina aislada de una bacteria ácido láctica, *Lactococcus lactis* subs. *lactis*, fue la nisina. En la actualidad, dicha bacteriocina es reconocida por la FDA y categorizada como producto GRAS, ya que es completamente caracterizada y utilizada industrialmente como conservante de alimentos; principalmente en los lácteos para prevenir el deterioro ocasionado por bacterias Gram positivas, especialmente de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria*. Las bacteriocinas producidas por ciertas especies del género *Lactobacillus* son hoy objeto de gran interés en el ámbito científico, no solo por las bacteriocinas que sintetizan, sino también respecto a los microorganismos que las producen, dado la diversidad de especies y hábitats en los que pueden encontrarse (González Martínez y col, 2003; Dolz, 2008; Pascual y col, 2008 a y b).

2.5.2 Clasificación de las bacteriocinas

La familia de las bacteriocinas incluye una diversidad de proteínas en término de tamaño, blanco y modo de acción, liberación y mecanismos de inmunidad. Pueden ser divididos en dos grupos principales: aquellas producidas por bacterias Gram negativas y

las producidas por bacterias Gram positivas (Dolz, 2008). En el presente trabajo solo trataremos sobre las bacteriocinas sintetizadas por bacterias Gram positivas, debido a que en la actualidad, las bacteriocinas producidas por las BALs son las que encierran un mayor interés puesto que son considerados como microorganismos seguros para la salud.

2.5.2.1 Bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas

Las bacteriocinas de las bacterias Gram positivas son más abundantes y diversas que aquellas producidas por Gram negativas. Difieren de estas últimas en dos aspectos fundamentales: el primero, que no son letales para las células productoras, esta diferencia crítica se debe a que poseen mecanismos de transportes para la liberación de la bacteriocina, y en segundo lugar, que las bacterias Gram positivas poseen sistemas de regulación más complejos en comparación con las Gram negativas (Gillor y col, 2008a).

Las bacteriocinas producidas por BALs son divididas en cinco clases, basadas en su estructura primaria, masa molecular, estabilidad al calor, y organización molecular. Esta clasificación fue propuesta por Kemperman y col (2003):

- **Clase I:** lantibióticos- Son péptidos pequeños, activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, b-metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. Poseen poca estabilidad al calor. A su vez, en función de su estructura y modo de acción, se subdividen en 3 grupos:
 - Clase I A: péptidos elongados y catiónicos que actúan a nivel de membrana. Ejemplo, la nisina.
 - Clase I B: péptidos globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores enzimáticos, como la mersacidina.
 - Clase I C: compuestos por 2 péptidos lantibióticos, que actúan sinérgicamente. Por ejemplo: la lacticina 3147.

- **Clase II:** péptidos no lantibióticos, lineales y no modificados postraduccionalmente. Gracias a su estructura pequeña son termoestables y actúan formando poros a nivel de la membrana plasmática. En este grupo se pueden identificar tres subclases:
Subclase IIa: constituyen el grupo más dominante de péptidos antimicrobianos producidos por las BALs. Son péptidos activos contra *Listeria* spp, y tienen una secuencia consenso en la región N-terminal. Ejemplo: pediocina PA-1 y sakacina P.
Subclase IIb: formados por la acción de dos péptidos diferentes que tienen acción complementaria. En este grupo se encuentra la lactococcina G.
Subclase IIc: péptidos pequeños, termoestables; secretados por un sistema sec-dependiente. Ejemplo: acidocina B.
- **Case III:** proteínas grandes, termolábiles. Ejemplo: helveticina J y lactacinas B.
- **Clase IV:** bacteriocinas complejas. Son péptidos con una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucídicas necesarias para su actividad biológica. Por lo tanto, esta clase incluye bacteriocinas que se consideran como glicoproteínas (lactocina S) o como lipoproteínas (mesenterocina 52).
- **Clase V:** bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente. A esta clase pertenecen la enterocina AS-48 y la gasicina A. (Gillor y col, 2008a; Pascual 2008a; Rojas y Vargas 2008; Monroy Dosta y col., 2009).

2.5.3 Modo de acción de las bacteriocinas

El modo de acción de las bacteriocinas es complejo y está determinado por la composición de la membrana citoplasmática, la estructura y la expresión de una proteína de autoinmunidad, como así también, de la composición química del medio ambiente. Por ejemplo, la presencia de iones Mg^{+2} y Ca^{+2} , neutralizan la carga negativa de los fosfolípidos; provocando una condensación fosfolipídica que incrementa la rigidez de la membrana citoplasmática, dificultando la acción antimicrobiana de la bacteriocina. En

algunos casos también se considera la existencia de las moléculas superficiales (receptores) en la membrana de la célula blanco, que permiten el acoplamiento con la bacteriocina de la bacteria productora (Drider y col, 2006; Gillor y col, 2008b; Rojas y Vargas 2008; Monroy Dosta y col, 2009).

La nisina, en la clase I y la pediocina, como representante de la clase II, son las más estudiadas en este aspecto y comparten algunas características en común. Por lo general, actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, provocando la salida de compuestos pequeños o alterando la fuerza motriz de protones (FMP) necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas y ácido nucleicos (González Martínez y col, 2003; Rojas y Vargas, 2008; Papagianni y Anastasiadou, 2009) (Figura 1).

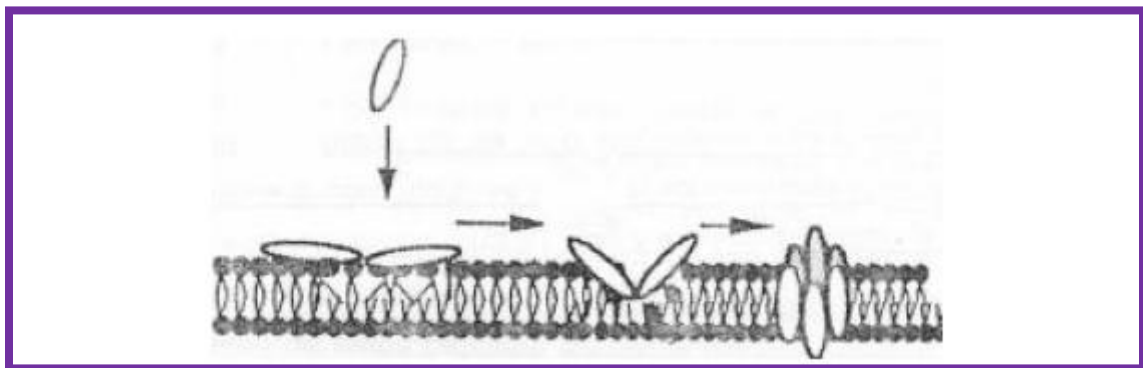


Figura 1: Esquema de la formación de poros en la membrana citoplasmática por las bacteriocinas (Nuñez y col, 2007).

Las bacterias Gram-positivas se caracterizan por poseer un alto contenido de lípidos aniónicos en su membrana celular, en este caso el modo de acción de las bacteriocinas es la unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga neta positiva localizada en uno de sus extremos. Luego se insertan a la membrana con una reorientación que depende del potencial de membrana, el cual está influenciado por el pH y la composición fosfolipídica. Los monómeros de bacteriocina forman agregados proteicos que resultan en la formación del poro con la consecuente salida de iones (principalmente potasio y magnesio), pérdida de la FMP, salida de ATP y aminoácidos.

La FMP juega un papel central en la síntesis de ATP, en el transporte activo y el movimiento bacteriano, por lo tanto, se inhibe la síntesis de macromoléculas y la producción de energía dando como resultado la muerte celular (González Martínez y col, 2003; Drider y col, 2006).

Aunque es común la formación de poros y la disipación de la FMP en el modo de acción de las bacteriocinas, existen algunas particularidades en cada clase. En la clase I, la nisina no requiere de un receptor unido a la membrana de la célula blanco ya que reconoce la composición fosfolipídica de la célula. En cambio, para la acción de la lactococina A se requiere de la unión a receptores de membranas. Para las bacteriocinas de la clase IIa se ha sugerido que la región consenso amino terminal tiene un papel importante en la capacidad de reconocimiento de la membrana de la célula blanco. Las de la clase IIb, dependen de la acción de dos péptidos a y b para la formación de poros y consecuente disipación del potencial de membrana. Las de la clase III son bacteriocinas de alto peso molecular y el mecanismo de acción aún se desconoce (González Martínez y col, 2003).

La actividad antimicrobiana que ejercen las bacteriocinas sobre otros microorganismos patógenos puede ser variable. Como ocurre con cualquier sustancia antimicrobiana, algunos microorganismos pueden ser sensibles, mientras que otros, son resistentes a la acción de estos compuestos. Inclusive una cepa de una especie bacteriana puede ser sensible, mientras otras cepas presentan resistencia a la acción de la bacteriocina. De igual modo sucede cuando un microorganismo es productor de más de una bacteriocina; las cepas susceptibles a una de ellas pueden resultar resistentes a una segunda bacteriocina. Por último, esporas de ciertos microorganismos que presentan resistencia a estas sustancias, pueden volverse sensibles después de la esporulación (Rojas y Vargas 2008; Monroy Dosta y col, 2009).

2.6 Género *Listeria*

2.6.1 Características de género *Listeria*. Distribución ecológica

Hasta el momento el género *Listeria* comprende seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi*. Estos microorganismos presentan una morfología bacilar corta, de extremos redondeados y frente a la coloración de Gram se observan Gram positivos. Estas especies pueden considerarse aerobias o anaerobias facultativas y sin requerimientos nutricionales para su desarrollo, por ello poseen una amplia distribución de nichos habitables. Las listerias han sido aisladas de diferentes sitios ambientales, como suelo, agua, variedad de alimentos, efluentes sanitarios, heces humanas y animales. Probablemente, el hábitat natural de estos microorganismos es la materia orgánica vegetal en descomposición. Por ejemplo, en el ambiente rural, los rumiantes domésticos contribuyen con el mantenimiento de especies de listerias, a través de un ciclo continuo de enriquecimiento oral-fecal (Michanie, 2004; Callejo y col, 2008a; Schöbitz y col, 2009; Oevermann y col, 2010).

Entre los miembros de este género, *L. monocytogenes* es la especie responsable de la mayor parte de las infecciones que afectan al hombre. Aunque en algunos casos menos frecuentes, las infecciones pueden ser causadas por *L. ivanovii* y *L. seeligeri* (Adzitey y Huda, 2010).

Este microorganismo es una bacteria muy ubicua en el medio ambiente capaz de sobrevivir bajo condiciones extremas de pH, salinidad y temperatura. Es considerada una bacteria psicrótrofa dada la capacidad de desarrollar a temperaturas de refrigeración. Puede crecer dentro de un amplio rango de pH (4 a 10) y en presencia de hasta un 10% de ClNa (Schöbitz y col, 2009; Gilmour y col, 2010). En los alimentos se encuentra en bajo número, motivo por el cual para su aislamiento son necesarios medios de enriquecimiento (Manual de la OIE sobre animales terrestres, 2004).

En el ser humano *L. monocytogenes* es un residente intestinal temporal, ya que entre el 5-10% de la población puede ser portadora de esta bacteria sin presentar signos de infección (Ramaswamy y col, 2007; Schöbitz y col, 2009). Aún así, es el agente patógeno causal de la listeriosis en el hombre. Este enteropatógeno oportunista ha

desarrollado estrategias para sobrevivir en el interior de las células fagocíticas de los huéspedes y escapar a la respuesta inmune, por ello se lo considera como un parásito intracelular facultativo (Ragon y col, 2008).

2.6.2 Ciclo de multiplicación de *Listeria monocytogenes*. Factores de virulencia intervinientes

Las bacterias ingeridas con el alimento son captados por los enterocitos o la células M próximas a las placas de Peyer en el intestino delgado, multiplicándose luego en las células fagocíticas. La infección producida por *L. monocytogenes* es favorecida por la expresión de una serie de factores de virulencia que facilitan el proceso de invasión (Cossart y Toledo-Arana, 2008; Freitag y col, 2009).

El ciclo de multiplicación comienza con la adhesión a la superficie de la célula eucariota. El proceso es mediado por la internalina A (InIA) y la internalina B (InIB). La primera interviene en la adhesión e invasión de células epiteliales polarizadas, como las intestinales, mientras que InIB lo hace en el caso de células epiteliales no polarizadas, como los hepatocitos. La entrada de *L. monocytogenes* dentro de la célula humana es mediada por la interacción de la proteína de superficie, la internalina, con su receptor E-caderina presente en las células eucariotas. Algunos trabajos, apoyan el rol de la internalina en la listeriosis humana, no solo para atravesar la barrera intestinal, sino también para cruzar la barrera hematoencefálica y la placentaria (López y col, 2006; Moroni y col, 2006; Le Monnier y col, 2007; Callejo y col, 2008a; Oevermann y col, 2010).

Una vez fagocitada, la bacteria es capaz de escapar del ambiente hostil del fagosoma gracias a la secreción de la listeriolisina O (LLO), una hemolisina activa a bajo pH. La LLO reconoce el colesterol de la membrana, forma los poros y favorece la lisis de la membrana del fagolisosoma, lo que provoca la emigración de *L. monocytogenes* al citosol de la célula hospedadora. Existe evidencia de que en ausencia de actividad de listeriolisina O, la bacteria disminuye notablemente su capacidad invasiva y no es capaz de reproducirse, al no poder escapar del fagosoma. Además de esta toxina, *L. monocytogenes* secreta al medio extracelular dos fosfolipasas C asociadas con la

virulencia. Una de ellas, la fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC o PlcA) que tiene un sustrato específico, el fosfatidilinositol (PI). La segunda enzima, una fosfatidilcolina fosfolipasa C (PC-PLC o PlcB), es una lecitinasa, con un rango más amplio de sustrato, como los fosfolípidos, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina. Estas últimas, también pueden contribuir a dañar las membranas y a la correspondiente citólisis (López y col, 2006; Le Monnier y col, 2007; Callejo y col, 2008a; Larraín y Carvajal, 2008; Oevermann y col, 2010).

Listeria monocytogenes una vez libre en el citoplasma, se replica rápidamente y utiliza el citoesqueleto de la célula hospedadora para desplazarse en su interior. Dicho movimiento intracelular tiene lugar por el ensamblaje direccional de monómeros de actina de la célula hospedadora en uno de los polos de la bacteria, fenómeno dirigido por la proteína de superficie Actina A (ActA). Finalmente, algunas bacterias alcanzan la periferia de la célula infectada, entran en contacto con la membrana celular y forman protuberancias hacia la célula vecina, en forma de evaginaciones citoplásmicas semejantes a pseudópodos, que contienen en su extremo una bacteria. Estas estructuras invasoras son fagocitadas y la bacteria queda encerrada en un fagosoma de doble membrana, en cuya rotura participan la lecitinasa y la LLO (López y col, 2006; Le Monnier y col, 2007; Callejo y col, 2008a; Oevermann y col, 2010) (Figura 2). De esta forma llega directamente a las células vecinas, donde reinicia el ciclo, diseminándose a través de los tejidos del huésped sin exponerse al ambiente extracelular y evadiendo la inmunidad humoral (Larraín y Carvajal, 2008; Freitag y col, 2009; Oevermann y col, 2010). *L. monocytogenes*, después de atravesar el epitelio intestinal viaja por sangre hasta el hígado (primer órgano blanco) y en ocasiones puede alcanzar el bazo. En el hígado, invade los hepatocitos y la infección es controlada por la respuesta inmune. Se cree que este mecanismo se repite con frecuencia dada la amplia distribución de *L. monocytogenes* en la naturaleza. En individuos normales, la exposición continua a antígenos listeriales, probablemente, determina el mantenimiento de linfocitos T de memoria anti-listeria. Sin embargo, si la respuesta inmune mediada por células T del huésped es inadecuada, las listerias logran multiplicar en los hepatocitos y en los macrófagos, y de esta manera, pueden ser vehiculizados vía sanguínea a diferentes órganos; especialmente invadiendo el cerebro y/o útero, donde atraviesan las barrera

hematoencefálica o la placenta en las mujeres embarazadas (Yildiz y col, 2007; Larraín y Carvajal, 2008; Oevermann y col, 2010) (Figura 3).

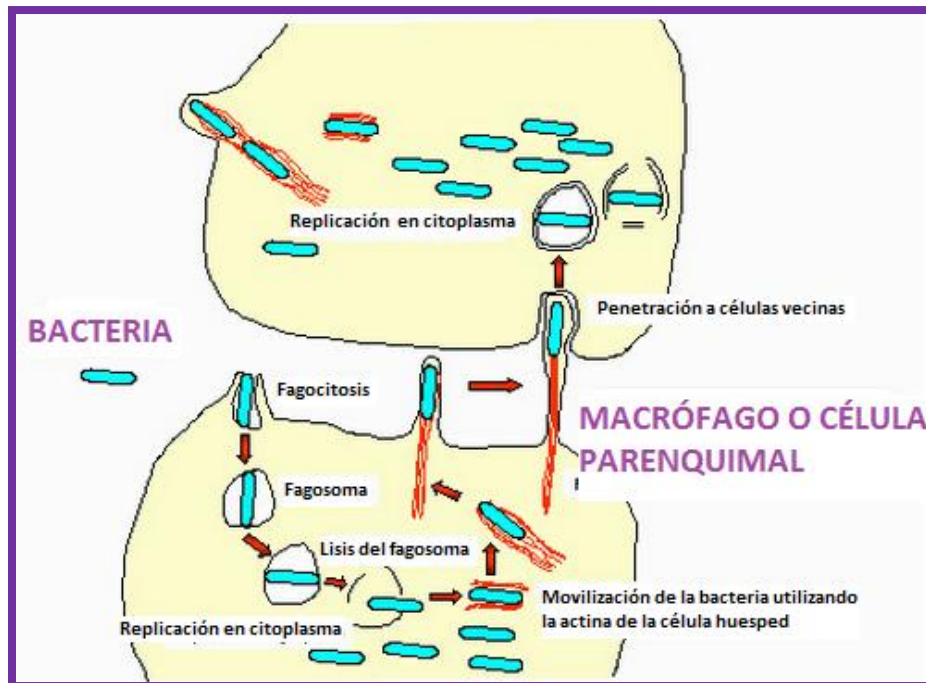


Figura 2: Pasos en la invasión de las células y la proliferación intracelular de *Listeria monocytogenes* (Kenneth Todar, 2008).

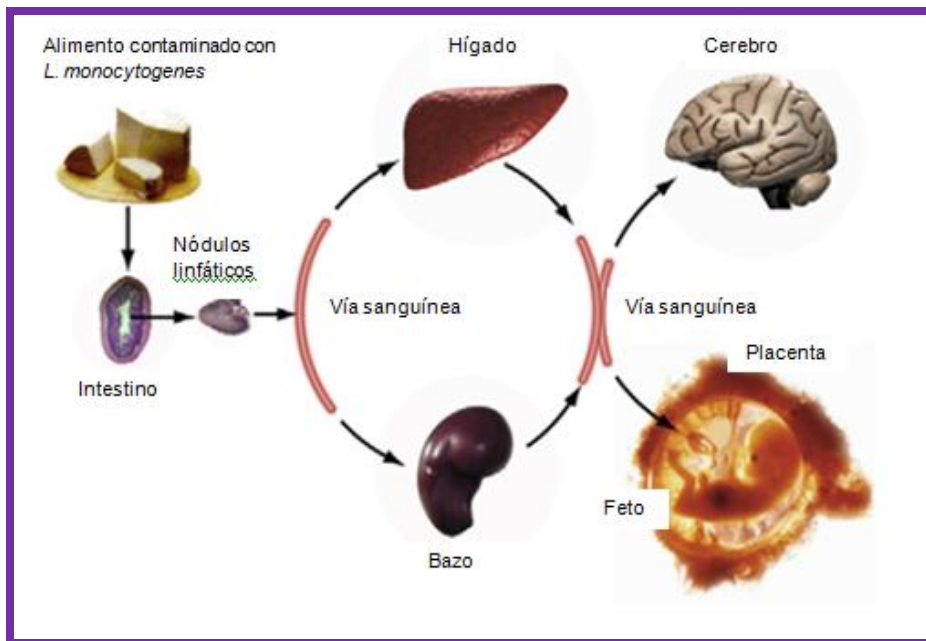


Figura 3: Pasos sucesivos en el desarrollo de listeriosis humana (Cossart y Toledo-Arana, 2008).

Los genes de virulencia de *L. monocytogenes* se organizan dentro de unidades genéticas conocidas como islas de patogenicidad (PAIs) (López y col, 2006; Callejo y col, 2008a). La expresión de los genes de virulencia es regulada por señales medioambientales para la transición entre los estadios de vida saprofítica y la invasión de la célula huésped. Un ejemplo es la temperatura corporal de los huéspedes mamíferos, que induce a la activación de los genes de virulencia (Cossart y Toledo-Arana, 2008; Sabet y col, 2008; Oevermann y col, 2010).

2.6.3 Algunos aspectos epidemiológicos de la listeriosis

La listeriosis es una enfermedad infecciosa bacteriana grave causada por *L. monocytogenes*, siendo su origen principal el consumo de alimentos contaminados, incluso aquellos que se conservan refrigerados por períodos prolongados. (Michanie, 2004; Manual de la OIE sobre animales terrestres, 2004; Bortolussi, 2008; Esteban y col, 2009; Schöbitz y col, 2009; Oevermann y col, 2010). *L. monocytogenes* no fue considerado un patógeno animal hasta fines de la década del 70. A comienzos de los años 80 la listeriosis fue reconocida como una enfermedad transmitida por los alimentos (ETA), como producto de varios brotes ocurridos en Estados Unidos y Europa, ya que mediante estudios epidemiológicos se demostró que la misma cepa de *L. monocytogenes* había sido aislada de los alimentos y de los pacientes infectados. Desde entonces, se intensificó la vigilancia y el control de este patógeno en la industria alimentaria (Callejo y col, 2008a).

En la actualidad, se estima que *L. monocytogenes* es la principal causa de muerte originada por bacterias de origen alimentario en Estados Unidos. En Europa, la epidemiología de la listeriosis ha cambiado desde 2001; la incidencia ha incrementado (2,1 casos por millón de personas durante 1990-2000 vs. 3,6 casos por millón de personas durante 2001-2009) (Rossi y col, 2008; Mook y col, 2011). En estudios realizados en Taiwan en el período 2006-2008, se notificó un aumento en el número de pacientes con listeriosis (Huang y col, 2010).

Por razones que se desconocen, en Argentina, la listeriosis es una enfermedad poco frecuente, especialmente la presentación materno-fetal. En un estudio realizado en

la provincia de San Luis, entre los años 1996 y 2006, solo se registraron 33 casos de meningitis neonatal por listeria. La listeriosis no es una enfermedad notificable a nivel nacional, pero los médicos siempre deberían considerar a *L. monocytogenes* como un posible agente etiológico de meningitis neonatal (Laciar y col, 2011).

A pesar de la ubicuidad del microorganismo, la prevalencia de la enfermedad es bastante baja. Se estima que entre un 5 y un 10% de la población es portadora fecal de *L. monocytogenes*, la incidencia de mujeres portadoras de este microorganismo en vagina es menor. En la población generalmente sana, este microorganismo patógeno oportunista produce infecciones con baja frecuencia. Los individuos susceptibles con alto riesgo de adquirir una infección por este agente tienen factores predisponentes como ocurre en mujeres embarazadas, recién nacidos, ancianos y adultos inmunodeprimidos (cáncer, trasplantes de órganos, SIDA, diabetes, terapias inmunosupresoras prolongadas, alcoholismo, administración de corticoides y en situaciones que cursan con sobrecarga de hierro). A pesar de su baja morbilidad, es la infección de origen alimentario con mayor tasa de mortalidad en humanos (20- 30 % o mayor) (Marzocca y col, 2004; López y col, 2006; Suárez y col, 2007; Yildiz y col, 2007; Janakiraman, 2008; Kenneth Todar, 2008; Mammina y col, 2009; Ramírez y col, 2009).

Una amplia variedad de especies animales puede infectarse por *L. monocytogenes*, entre las que se encuentran mamíferos, aves, peces y crustáceos, aunque la mayoría de casos de listeriosis clínica tienen lugar en rumiantes. Sin embargo, la transmisión zoonótica de la enfermedad al hombre no está clara y para la Salud Pública la contaminación a partir del ambiente en el que se procesan los alimentos es más relevante (Manual de la OIE sobre animales terrestres, 2004; Kenneth Todar, 2008; Adzitey y Huda, 2010). Antiguamente, los brotes se vinculaban con una gran variedad de alimentos, especialmente carnes procesadas (salchichas, paté y productos precocidos); en la actualidad, la mayoría se vinculan al consumo de leche cruda o quesos elaborados con leche sin pasteurizar (Rossi y col, 2008).

Se sabe que existen muchas cepas de *L. monocytogenes* y que difieren en su virulencia y potencial epidémico. La serotipificación constituye el primer método de subtipificación para la investigación epidemiológica de listeriosis, se basa en la detección de los diferentes antígenos somáticos (O) y flagelares (H) (Callejo y col, 2008b; Ragon y

col, 2008). Se han identificado 4 serogrupos por su antígeno somático (1/2, 3, 4 y 7), que combinados con antígenos flagelares conforman hasta el momento trece serotipos; no obstante, la mayoría de las cepas aisladas pertenecen a los serotipos 4b, 1/2a, y 1/2 b, siendo el serotipo 4b el responsable de los grandes brotes epidémicos informados en el mundo, así como del 90 al 95% de los casos esporádicos (Callejo y col 2008b; Gilmour y col, 2010). Evidencias experimentales sugieren que la cepa 4b puede tener incrementada su virulencia en ratón cuando fue comparada con otros serotipos (Ramaswamy y col, 2007).

6.6.4 Espectro clínico de la listeriosis

La listeriosis, a diferencia de otras infecciones transmitidas por alimentos, se caracteriza por presentar un largo período de incubación, lo cual dificulta la posibilidad de establecer la relación entre el caso clínico y el alimento consumido (Callejo y col, 2008b). Las manifestaciones clínicas de la listeriosis pueden ser variables según el estado inmune del paciente. Puede presentarse como un cuadro gastrointestinal leve y autolimitado en pacientes inmunocompetentes o que consumen antiácidos con frecuencia, caracterizado por fiebre, diarrea, cefalea y mialgias (cuadros leves similares a una gripe); o bien como un cuadro severo y de alta mortalidad, como meningitis, abscesos cerebrales y sepsis, en pacientes inmunocomprometidos (Janakiraman, 2008; Larraín y Carvajal, 2008; Gillespie y col, 2009; Mammìna y col, 2009; Schöbitz y col, 2009).

La infección más frecuente en el adulto es la invasión del sistema nervioso central (SNC) (55 al 70% de los casos). Se desarrolla generalmente como meningoencefalitis acompañada por cambios severos de la conciencia, desordenes del movimiento y en algunos casos parálisis de los nervios craneales. La mortalidad de la infección del SNC es del 20%, pero puede ser del 40 al 60% si está asociada a una enfermedad de base. En ciertos grupos de riesgo, como enfermos de cáncer, *L. monocytogenes* es la causa más frecuente de meningitis bacteriana (Manual de la OIE sobre animales terrestres, 2004; López y col, 2006; Callejo y col, 2008a).

Actualmente, existe evidencia de que la inmunidad contra *L. monocytogenes* es casi completamente dependiente de la actividad de los linfocitos T. El embarazo es un estado de tolerancia inmunológica que determina una supresión de la inmunidad celular evitando así una reacción cruzada contra el feto. Sin embargo, esta menor actividad inmunológica puede predisponer a la madre y al feto a infecciones por gérmenes intracelulares, como *L. monocytogenes*; el riesgo de infección es 20 veces mayor en las embarazadas que en la población general (Bakardjiev y col, 2006; Larraín y Carvajal, 2008; Tam y col, 2010).

La infección perinatal se produce por invasión del feto por vía placentaria y desarrollo de corioamnionitis, luego de una bacteriemia materna, o bien, en menor proporción, por diseminación ascendente a partir del tracto genital colonizado por *L. monocytogenes* (Laciar y col, 2000; Ramaswamy y col, 2007). Como consecuencia, puede ocurrir el aborto, en cualquier trimestre del embarazo pero es más frecuente durante el tercer trimestre; el parto prematuro o el nacimiento a término con infección generalizada del neonato, síndrome conocido como granulomatosis infantiséptica. Se caracteriza por la presencia de microabscesos piogranulomatosos diseminados en múltiples órganos (hígado, bazo, pulmones, riñones y encéfalo) y con alta mortalidad (cercana al 100%). Los recién nacidos pueden además, desarrollar neumonía, sepsis, y meningitis, síndromes similares a los asociados con las infecciones producidas por *Streptococcus* del grupo B. En la madre, la infección es generalmente asintomática y puede presentarse como un síndrome gripal leve con escalofríos, fatiga, fiebre, dolor de cabeza, muscular y articular alrededor de 2 a 14 días antes del aborto (Le Monnier y col, 2006, 2007; Larrain y col, 2008; Cheung y Sirkin, 2009; Kirkham y Berkowitz, 2010; Tam y col, 2010).

La listeriosis neonatal tardía se observa con menos frecuencia. Generalmente ocurre de 1 a 8 semanas posteriores al parto y se presenta con un síndrome febril acompañado por meningitis y en algunos casos gastroenteritis y neumonía. Generalmente, los niños nacen a término, sanos y las madres tienen embarazos sin complicaciones. La vía de contaminación del neonato es por aspiración de exudados maternos contaminados durante el parto; y no intrauterina. La mortalidad de la listeriosis neonatal tardía es más baja (10 al 20%), pero al igual que la listeriosis temprana, puede

dejar secuelas tales como hidrocefalia y retraso psicomotor (Laciar y col, 2000; Callejo y col, 2008a; Janakiraman, 2008).

Otra forma de listeriosis son las infecciones focales que se relacionan con ciertas actividades laborales. Por ejemplo en médicos veterinarios como resultado del contacto directo con animales infectados y en trabajadores de laboratorio por inoculación directa accidental pueden manifestarse lesiones cutáneas ulcerosas (Oevermann y col, 2010).

El diagnóstico de las infecciones por *Listeria* solamente se pueden hacer por cultivo del microorganismo a partir de sitios estériles del organismo tales como sangre, fluido amniótico, o líquido cefaloraquídeo (LCR). Los cultivos vaginales o de heces no son útiles para el diagnóstico ya que algunas mujeres son portadoras pero no presentan síntomas clínicos (Janakiraman, 2008).

2.6.5 Susceptibilidad antibiótica de *Listeria monocytogenes*

Hasta hace unos años, los aislamientos de *L. monocytogenes* y de otras *Listeria* spp., mostraban susceptibilidad a un amplio rango de antibióticos activos contra bacterias Gram positivas. Tales como penicilinas, tetraciclina, cloranfenicol, gentamicina, eritromicina, trimetroprima-sulfametoxazol, vancomicina, rifampicina y al ácido fusídico (Laciar y col, 2000; Vitas y col, 2007; Callejo y col, 2008a). Sin embargo, la incidencia de cepas resistentes a la ampicilina, estreptomina, eritromicina, vancomicina, cloranfenicol y tetraciclina, ha sido detectada en cepas procedentes de alimentos, infecciones clínicas o medio ambiente (Villalobos de Bastardo y Martínez Nazaret, 2006; Ruiz-Bolivar y col, 2008; Morvan y col, 2010). *L. monocytogenes* presenta resistencia natural a las cefalosporinas de tercera generación ya que no pueden unirse a la proteína de unión a la penicilina 3 (PBP3) de listeria y conducir a su muerte (Yildiz y col, 2007; Callejo y col, 2008a; Ruiz-Bolivar y col, 2008).

Aunque en las especies de *Listeria* la frecuencia de resistencia antimicrobiana es relativamente baja (1,27%), dado que la enfermedad es de baja prevalencia; en los últimos años, los cambios son uniformes en la susceptibilidad del género y representan un tema de importancia para ser estudiados. De hecho, la evolución acelerada de la resistencia antibiótica en *L. monocytogenes* puede atribuirse al uso indiscriminado de

antibióticos que suelen usarse en la producción animal y las terapias de humanos (Villalobos de Bastardo y Martínez Nazaret, 2006; Morvan y col, 2010). Al ser la listeriosis una enfermedad relativamente rara en humanos, no hay estudios prospectivos y controlados que establezcan el mejor tratamiento antibiótico. Aún así penicilina o ampicilina solas o asociadas con aminoglucósidos (gentamicina) siguen siendo recomendadas para el tratamiento de la listeriosis en humanos. Para pacientes alérgicos a la penicilina, pueden usarse eritromicina, vancomicina o TMS (Bortolussi, 2008; Callejo y col, 2008a; Grayo y col, 2008; Janakiraman, 2008; Cheung y Sirkin, 2009).

El monitoreo continuo de la diseminación y la adquisición de resistencia antibiótica de *L. monocytogenes* y otros miembros del género, es una exigencia para todas las cepas aisladas de ambientales, de infecciones clínicas y primordialmente los provenientes de alimentos; ya que constituyen los vehículos de transmisión primaria de la listeriosis. Como así también, la búsqueda de nuevas estrategias de control para impedir la colonización de *L. monocytogenes* tanto en los alimentos, como en los huéspedes mediante el empleo de microorganismos inocuos productores de sustancias antimicrobianas (Villalobos de Bastardo y Martínez Nazaret, 2006).

En el presente trabajo se utilizaron dos BALs del género *Lactobacillus* de origen humano que pertenecen al grupo de investigación de la orientación Bacteriología. Dichos microorganismos han sido identificados como *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60. Ambos lactobacilos son objeto de estudio, ya que reúnen una variedad de características probióticas deseadas para su uso potencial como agentes bioterapéuticos. Entre algunas de sus propiedades se pueden mencionar la producción de sustancias con actividad antimicrobiana, tales como: ácidos orgánicos, bacteriocinas y peróxido de hidrógeno. El grupo de investigación ha demostrado previamente que las dos bacteriocinas de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60, pertenecen a la clase II de bacteriocinas de bacterias Gram positivas. Ambas fueron correctamente caracterizadas ya que son estables en un rango de pH entre 4 y 7, y el potencial antimicrobiano de las mismas no es afectado por la presencia de enzimas

como catalasas, ni ureasas, pero sí lo es frente a tripsina, hecho que define la naturaleza proteica de ambas sustancias (Pascual y col, 2008a, b).

El conjunto de los metabolitos producidos por ambas especies de lactobacilos serán estudiados sobre distintas cepas de *Listeria monocytogenes* obtenidas de diferentes muestras clínicas humanas.

3 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las BALs presentan futuro potencial en la prevención y/o el tratamiento de los procesos infecciosos, producidos por *Listeria monocytogenes* y microorganismos asociados a infecciones del tracto genital.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estudiar la actividad de bacteriocinas producidas por las cepas *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 aisladas del tracto genital femenino, sobre diferentes cepas de *Listeria monocytogenes*.

4.2 Objetivos específicos

- Confirmar la identificación de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de muestras clínicas; y de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 aisladas del tracto genital de mujeres sanas en edad reproductiva.
- Estudiar la actividad inhibitoria del sobrenadante con bacteriocinas de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 sobre listerias.
- Estudiar la actividad inhibitoria del sobrenadante libre de células neutralizado y tratado con peroxidasa.
- Estudiar la CIM de cada una de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre diferentes cepas de *Listeria* spp.
- Estudiar las interacciones entre las bacteriocinas L23 y L60.
- Determinar la susceptibilidad antibiótica de las cepas de listeria.
- Analizar estadísticamente los resultados obtenidos.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas utilizadas

5.1.1 *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60

Se trabajó con cepas de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 que fueron aisladas de exudados vaginales de mujeres en edad reproductiva, no embarazadas, sin síntomas ni signos de enfermedad vulvovaginal que asistieron al Nuevo hospital de Río Cuarto “San Antonio de Padua” (Pascual, 2004; Pascual y col., 2008a,b).

Los lactobacilos se cultivaron en caldo Rogosa o MRS (Manosa, Rogosa, and Sharpe- Britania) durante 24 h a 37°C en microaerobiosis (5% de CO₂). Posteriormente se obtuvieron colonias aisladas en agar MRS incubando en idénticas condiciones y la pureza de las colonias aisladas se confirmó por tinción de Gram. Luego se identificaron con pruebas bioquímicas de género y especie sugeridas en el Manual Bergey de Bacteriología (1994) (Tabla 2) y mediante el sistema comercial de galerías de identificación de lectura automatizada, API 50 CH para su confirmación (Ruiz y col., 2009). Este último sistema permite el estudio de la fermentación de sustratos pertenecientes a los hidratos de carbono y sus derivados como heterósidos, polialcoholes y ácidos urónicos.

Tabla 2: Pruebas bioquímicas para la identificación del género *Lactobacillus*.

Pruebas bioquímicas
Catalasa
Reducción de nitrato
Producción de indol
Hidrólisis de la Gelatina
Producción de SH ₂
Movilidad

Bergey's manual of determinative bacteriology (1994)

- Prueba de la catalasa: la enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. En general,

los organismos que no poseen el sistema citocromo carecen también de la enzima catalasa y por lo tanto no pueden descomponer el peróxido de hidrógeno.

Esta prueba permite poner en evidencia la presencia de la dicha enzima la cual es capaz de desdoblar el H_2O_2 en O_2 y H_2O . El oxígeno formado se desprende en forma de burbujas, indicando una reacción positiva. Esta prueba se realizó colocando una colonia de la cepa a estudiar sobre un portaobjetos junto con una gota de agua oxigenada.

- Reducción de nitratos: permite evaluar la capacidad del microorganismo de reducir el nitrato a nitrito o a nitrógeno mediante la presencia de la enzima nitrato reductasa. Este proceso es típico del metabolismo anaeróbico, en el cual los microorganismos obtienen O_2 del nitrato, que funciona como un aceptor de electrones. Para esta prueba se inoculó un caldo nitrato con los microorganismos a ensayar, se incubó 24 h en estufa a $37^\circ C$ en microaerobiosis, y luego se reveló la prueba con el agregado de los reactivos α -naftilamina al 1%, ácido sulfanílico al 10% y ácido tartárico al 89%. Estos compuestos detectan la presencia de nitritos.

La interpretación se realiza por observación del cambio de color del tubo. Si aparece una coloración roja al cabo de 1 o 2 minutos de agregados los reactivos, es porque el microorganismo posee la enzima, y en el tubo hay acumulo de nitrito, por lo tanto la prueba es positiva. Si el tubo no presenta color rojo no hay nitritos en la suspensión y esto puede ser debido a que la reducción no ocurre (prueba negativa) o a que la reducción dio otro/s producto/s final/es (prueba positiva). Entonces, para confirmar la prueba, se agrega zinc en polvo, el cual reduce los nitratos a nitritos. Si ahora aparece color rojo, es porque el microorganismo no tiene la capacidad de reducir el nitrato ya que estaba intacto en la muestra y confirma una prueba negativa; si no aparece color rojo, es porque el nitrato fue reducido a un compuesto distinto a nitrito, como amoníaco, nitrógeno, óxido nítrico o nitroso y/o hidroxilamina, y es confirmatorio de una prueba positiva.

- Producción de indol: las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, piruvato y amoníaco. Para revelar la reacción, a una suspensión bacteriana desarrollada durante 24 h en agua peptonada se le agrega el reactivo de Kovacs (p-dimetilamino benzaldheído, alcohol isoamílico y ácido clorhídrico) el cual detecta la presencia de

indol. Si se desarrolla un halo color fucsia en la interfase entre el reactivo y el cultivo, es una prueba positiva. La ausencia de halo indica prueba negativa y ausencia de la enzima.

Para realizar la prueba bioquímica identificatoria de *Lactobacillus* spp. se realizó una modificación de la técnica ajustando el pH hasta 5.5 con HCl 1N.

- Hidrólisis de la gelatina: por medio de esta técnica se detecta la presencia de la enzima gelatinasa, la cual licúa la gelatina. Para ello se inocula un tubo con caldo y gelatina al 15%. Se incuba a 37°C. Al cabo de aproximadamente 24 h se refrigera el tubo durante 2 h. Si el medio se encuentra solidificado, entonces la gelatina no fue licuada, indicando ausencia de la enzima y prueba negativa. Una prueba positiva se observa como un medio no solidificado luego de la refrigeración. Para la identificación de lactobacilos se adaptó la técnica utilizando caldo MRS con gelatina al 15% y se ajustó el pH a 5.5.

- Producción de SH₂: evidencia la presencia de enzimas bacterianas que permiten la liberación de sulfuro a partir del tiosulfato de sodio. Para visualizar la reacción se utilizó hierro, el cual se acompleja con el sulfato dando un precipitado de color negro. Para esta prueba se sembró el medio comercial SIM (sulfato-indol-movilidad) modificando el pH a 5.5. Se interpreta como prueba positiva si aparece un precipitado negro, de lo contrario es negativa.

- Movilidad: se siembra por picadura en un medio de cultivo con 0,5- 1% de agar (semisólido) y se observa el crecimiento a partir de la línea de picadura. Las bacterias móviles desarrollan en todo el tubo, mientras que las inmóviles desarrollan solo en la picadura.

Además fueron purificadas las bacteriocinas de estos lactobacilos y estudiadas las propiedades benéficas por el grupo de investigadores del laboratorio de Bacteriología, del Departamento de Microbiología e Inmunología (Pascual, 2004; Pascual y col., 2008a,b).

Para la conservación de estas cepas, se sembraron en placas y en caldo MRS y se incubaron a 37°C 24 h en microaerobiosis. Las placas se almacenaron a 4°C

realizándose repiques cada 20 días aproximadamente y a los tubos con caldo se les agregó glicerol al 30% conservándose a -20°C durante tiempos prolongados. Para su utilización se tomó un inóculo de cada una de las cepas, se sembraron en caldo MRS, bajo las condiciones ya descriptas y se estriaron en agar MRS.

5.1.2 Identificación y caracterización de *Listeria monocytogenes*

Se trabajó con 26 cepas de *L. monocytogenes* obtenidas de diferentes muestras clínicas humanas, fueron aisladas en medio de agar sangre de carnero (ASC) al 5%, se incubaron durante 18- 24 h a 37°C , en microaerofilia (5% de CO_2). Posteriormente se realizó la coloración de Gram, con el objeto de observar su morfología y comportamiento tintorial, acorde a las características de *Listeria*.

La identificación de las cepas de *L. monocytogenes* se efectuó siguiendo los criterios propuestos en el Manual Bergey de Bacteriología (1994). Los aislados puros con morfología de bacilos Gram positivos cortos, regulares, no esporulados, ni ramificados fueron identificados mediante pruebas bioquímicas de género y especie (Tablas 3 y 4).

Tabla 3: Pruebas bioquímicas para la identificación del género *Listeria*.

Pruebas bioquímicas
Catalasa
Producción de ácido de la D-glucosa
Hidrólisis de la esculina
Voges-Proskauer
Rojo de metilo
Movilidad
Hidrólisis de la urea
Producción de SH_2
Sensibilidad a la gentamicina
Sensibilidad a la vancomicina

Tabla 4: Pruebas bioquímicas para la identificación de *Listeria monocytogenes*

Pruebas bioquímicas
β- hemólisis
Prueba de CAMP (con <i>Staphylococcus aureus</i>)
Hidrólisis del hipurato
Producción de ácido de la D-xilosa
Producción de ácido del manitol
Producción de ácido de α-metil-D-manósido
Producción de ácido de la ramnosa

- Utilización aeróbica de azúcares: este uso diferencial de los hidratos de carbono permite diferenciar metabólicamente a las especies en cuestión y resulta aquí conveniente para la identificación de *L. monocytogenes*. Se utiliza un medio base de fermentación con un indicador de pH, al que se le adicionan los hidratos de carbono en cuestión al 1%. Se siembran cada uno de los tubos a ensayar con una ansada de cultivo fresco. Se incuba durante 24 h a 37°C. Como resultado de la utilización del azúcar se producen ácidos los cuales modifican el pH dando viraje del indicador a amarillo (reacción positiva).

- Hidrólisis de la esculina: esta prueba se basa en la capacidad de ciertas bacterias de hidrolizar la esculina (glucósido) en presencia de bilis al 1-4%, liberando glucosa y esculetina; la esculetina reacciona con una sal de hierro para formar un compuesto de color marrón oscuro- negro, produciéndose de esta manera el ennegrecimiento difuso del medio que contiene citrato férrico como fuente de iones férricos (0,05%).

Se utiliza un agar esculina inclinado en presencia de bilis, el cual es inoculado e incubado a 37°C durante 24- 48 h. Un ennegrecimiento del medio se interpreta como una reacción positiva, mientras que los tubos que permanecen inalterados se consideran negativos.

- Voges- Proskauer: identifica la vía fermentativa butilenglicólica, en la cual los microorganismos que tienen el sistema enzimático necesario utilizan el ácido pirúvico con producción de acetilmetilcarbinol (acetoína) el cual es un producto neutro,

junto con una baja cantidad de ácidos mixtos. En presencia de O₂ atmosférico y KOH al 40% la acetoína pasa a diacetilo que se convierte en un compuesto de coloración roja por acción del reactivo α- naftol.

Para la realización de la técnica se inocula un tubo que contiene medio Clark y Lubs y se incuba durante 24 h en aerobiosis a 37°C. Pasado este tiempo se agregan 2 gotas de α- naftol y 2 gotas de KOH. Se incuba en estufa a 37°C durante 30 min antes de leer los resultados. Se considera positiva a la cepa que al cabo de este tiempo desarrolla coloración rosa en el tubo. Si no hay cambio de color, la cepa no posee esta vía metabólica.

- Rojo de metilo: la técnica permite identificar microorganismos que fermentan los azúcares mediante la vía metabólica ácida mixta en la cual a partir de ácido pirúvico se produce gran cantidad de ácidos como para mantener el pH del medio por debajo de 4,4. Este valor de pH es el límite ácido de viraje del indicador rojo de metilo, por lo tanto a estos valores de pH el indicador vira a rojo.

Para realizar esta prueba se debe sembrar la cepa a estudiar en medio Clark y Lubs e incubar durante 24 h a 37°C en aerofilia. Luego de este tiempo se agregó al medio unas gotas de rojo de metilo. Se considera positiva a la cepa si aparece en el medio una coloración roja. Si el medio continúa siendo amarillo, entonces la cepa no posee esta vía fermentativa.

- Hidrólisis de la urea: pone en evidencia la presencia de la enzima ureasa en la bacteria. Esta enzima es capaz de hidrolizar la urea; el carbonato formado en esta reacción produce un aumento del pH que hacer virar el indicador del medio de cultivo. Se utiliza un medio base al que se le adiciona urea y un indicador.

Se considera reacción positiva, un color rosa intenso (Urea de Christensen) o azul- azulverdoso (B.A.M.). Si en el medio no se observa cambio de color, se confirma la ausencia de ureasa.

- Prueba de sensibilidad a antibióticos: se inocula una colonia de *L. monocytogenes* en 1 ml de caldo tripticasa soya hasta lograr una turbidez igual a la del tubo N° 0,5 de la escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ ml). Con un hisopo embebido en esta suspensión sembrar una placa de agar Muller Hinton, realizando

estrías en diferentes direcciones hasta cubrir toda la placa, se deja secar unos minutos y luego se depositan los discos que contienen el antibiótico en cuestión (vancomicina o gentamicina); se llevan a incubación a 37°C de 18- 24 h y se efectúa la lectura de los halos de inhibición del crecimiento alrededor del disco.

- Beta-hemólisis: pone en evidencia la presencia de la listeriolisina β . Se utilizan placas de agar nutritivo (tripticosa soja, cerebro-corazón) al que se le adiciona sangre de carnero desfibrinada al 5%. Se siembra por agotamiento y se incuba a 37°C por 24 h. La hemólisis es en general débil y quizá no se observe al principio. En agar sangre humano, se observa una discreta zona de hemólisis removiendo las colonias.

- CAMP (Christie–Atkins–Munch–Peterson): la actividad hemolítica de la β - lisina de *Staphylococcus aureus* se ve intensificado por el llamado factor CAMP, que es una proteína extracelular, termoestable, producida por *L. monocytogenes*, por lo tanto cada vez que estas dos moléculas interactúan en una placa de agar sangre de carnero se obtiene una intensificación de la actividad hemolítica observándose un halo rectangular de hemólisis acentuada.

La técnica se realiza trazando una estría del microorganismo a identificar perpendicular a otra estría de una cepa de *S. aureus* productora de β lisina, ambas líneas no deben tocarse, Se incuba de 24 a 48 h a 37°C.

- Hidrólisis del hipurato: esta prueba permite diferenciar a los microorganismos que poseen la enzima hipuricasa que hidroliza el hipurato de sodio dando como resultado benzoato de sodio y glicina. Se utiliza un medio base al cual se le adiciona hipurato de sodio; se inocula el tubo y se cultiva 24 h a 37°C, luego se centrifuga a 2000 rpm 5 min, se toma 0,5 ml del sobrenadante (el resto deberá reincubarse durante 24 h) y se agrega 0,2 ml del reactivo (Cl_3Fe). Una reacción positiva, se observa por la formación de un precipitado que no se disuelve por agitación y permanece por 10 min. La ausencia de precipitado o si está pero se disuelve rápidamente se considera reacción negativa, y se repetirá el procedimiento con el caldo incubado por 48 h.

Para la conservación de las cepas de *L. monocytogenes* se hicieron crecer en caldo tripteína soya durante 24 h a 37°C en aerobiosis y se agregó glicerol al 30% para su almacenamiento a -20°C. Cada cepa se sembró en una placa de Petri conteniendo agar tripteína soya y se incubó en las condiciones anteriormente descritas.

5.2 Obtención de sobrenadante libre de células de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60

Se sembraron las cepas de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 en 2 ml de caldo MRS aproximadamente a una concentración de 10^8 UFC/ml, se incubó 18 h a 37°C en atmosfera húmeda y en microaerobiosis (5% CO₂).

Luego se colocó 0,5 ml del cultivo anterior en 9,5 ml de caldo MRS (5% v/v), y se incubó en las condiciones anteriormente descritas. Los sobrenadantes libres de células (SLCs) fueron obtenidos por centrifugación de los cultivos a 8.500 rpm por 20 min a 4°C. El SLC obtenido se fraccionó en tubos estériles, se expuso luego a vapores de cloroformo durante 20 min y se refrigeró a 4°C hasta el momento de su uso (Tahara y Kanatani, 1997; Pascual y col, 2008b) (Figura 4).

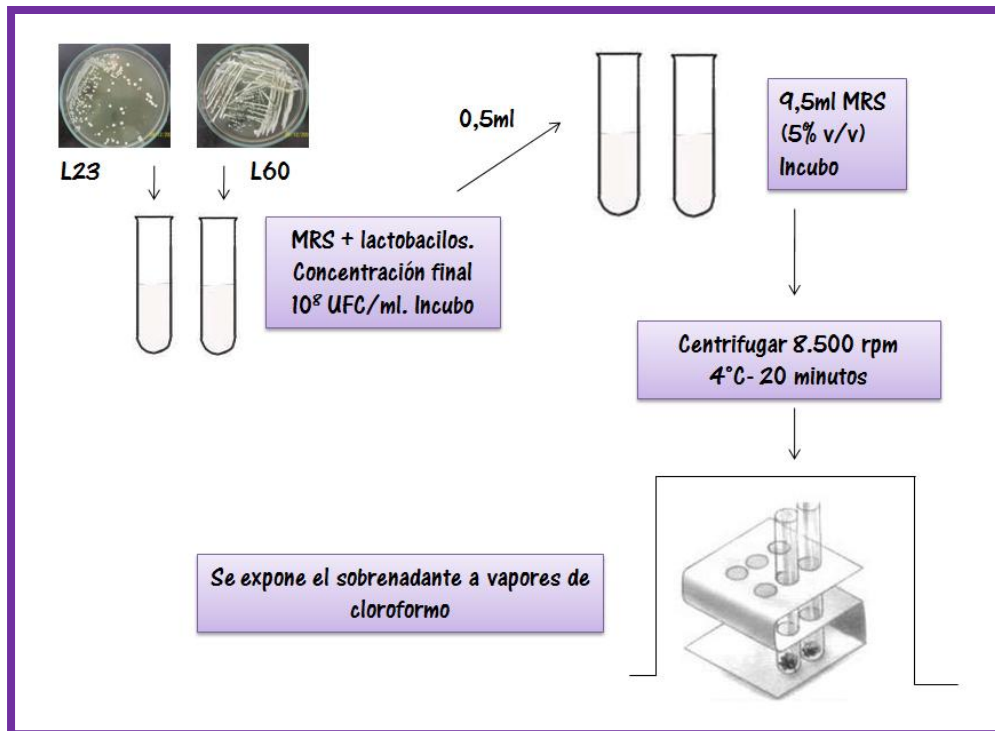


Figura 4: Obtención del sobrenadante libre de células de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60.

5.3 Actividad inhibitoria de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas sintetizadas por lactobacilos sobre las cepas de *Listeria monocytogenes*

En trabajos previos fue demostrado que *L. fermentum* L23 producía ácidos orgánicos y bacteriocinas al igual que *L. rhamnosus* L60, este último además produce H_2O_2 (Pascual y col., 2006). Por ello, para estudiar la actividad inhibitoria de cada sustancia y en especial la de bacteriocinas se siguió el ensayo de difusión en pozos en el agar (Tagg y Mc Given, 1971; Sgouras y col., 2004; Pascual y col., 2008b). Una parte de los SLCs de cada cepa de lactobacilo obtenidos en el punto anterior se neutralizaron con hidróxido de sodio 1N, hasta alcanzar un pH de 6-7, eliminando así el efecto inhibitorio de los ácidos producidos por los lactobacilos.

En el caso de *L. fermentum* con este único tratamiento se pudo ver la actividad bacteriocidal, pero para *L. rhamnosus* se eliminó además el peróxido de hidrógeno que contenía el sobrenadante L60, con el agregado de peroxidasa (0,1 mg/ml).

La técnica de difusión de pozos en el agar se ensayó utilizando placas conteniendo el medio Mueller Hinton (MH) y MRS, obteniéndose mejores resultados en agar MRS. Entonces, para evidenciar la actividad de estas sustancias, a partir de colonias aisladas de cada cepa de *L. monocytogenes* se realizaron subcultivos en caldo tripteína soya (CTS) y se ajustó a la turbidez del tubo 0,5 de la escala de Mc Farland, luego se hisopó en varias direcciones una placa de agar MRS con las suspensiones de listeria; se realizaron los pozos con un sacabocado y fueron inoculados con 100 µl de cada uno de los tratamientos de los sobrenadantes libres de células. Para *L. fermentum* un pozo correspondió al sobrenadante libre de células (actividad inhibitoria dada por ácidos y bacteriocinas- L23) y el segundo al sobrenadante libre de células neutralizado (actividad bacteriocidal- B23); en el caso de *L. rhamnosus* un pozo correspondió al sobrenadante libre de células (actividad inhibitoria dada por ácidos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas- L60), el segundo al sobrenadante libre de células neutralizado (actividad inhibitoria dada por peróxido de hidrógeno y bacteriocinas- N60) y tercer y último pozo correspondió al sobrenadante libre de células neutralizado y tratado con peroxidasa (actividad inhibitoria dada por bacteriocinas- B60) (Figura 5).

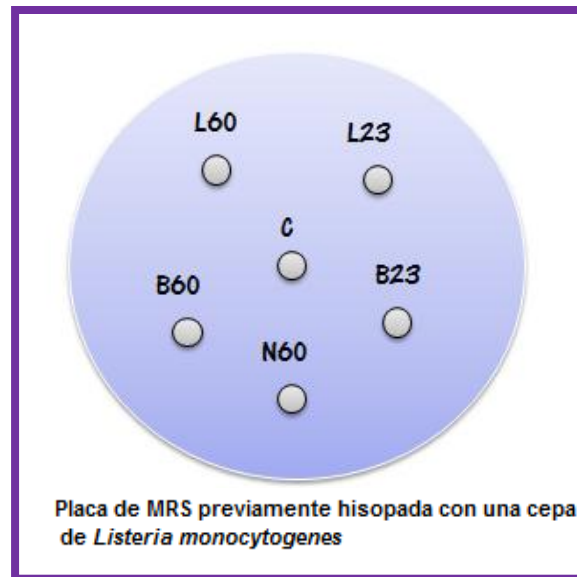


Figura 5: Esquema del ensayo de difusión en pozos en el agar.

Referencias: L60: sobrenadante libre de células de *Lactobacillus rhamnosus* L60. N60: sobrenadante libre de células de *Lactobacillus rhamnosus* L60 neutralizado. B60: sobrenadante libre de células de *Lactobacillus rhamnosus* L60 neutralizado y tratado con peroxidasa. L23: sobrenadante libre de células de *Lactobacillus fermentum* L23. B23: sobrenadante libre de células de *Lactobacillus fermentum* L23 neutralizado. C: control negativo.

Las placas se incubaron a 37°C por 18 a 24 h y se midieron en milímetros (mm) los halos de inhibición del crecimiento bacteriano (Charteris y col, 2001).

Como control negativo se inoculó un pozo con 100 µl de caldo MRS. Como control positivo, se utilizó una cepa de *Escherichia coli* sensible, realizando la misma técnica (técnica de difusión en pozos en el agar) (Ruiz y col., 2009). Cada ensayo se realizó por duplicado.

5.4 Ensayos de interacción de las bacteriocinas de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre cepas de *Listeria monocytogenes*

Para evaluar las interacciones entre las bacteriocinas de ambos lactobacilos se realizó la técnica de difusión en pozos en el agar. Se procedió a la extracción de los SLCs de los cultivos de ambos lactobacilos y los mismos se neutralizaron y trataron con peroxidasa como se describió anteriormente.

A partir de colonias aisladas de cada cepa de *L. monocytogenes* se realizaron subcultivos en CTS y se ajustó a la turbidez del tubo 0,5 de la escala de Mc Farland. Luego se sembraron con hisopo las suspensiones de listeria en placas con agar MRS y se realizaron 3 pozos con sacabocado sobre la superficie del agar. En cada pozo se colocaron respectivamente 100 µl de la bacteriocina B23 de *L. fermentum* (50 µl de B23 + 50 µl de MRS estéril), 100 µl de la bacteriocina B60 de *L. rhamnosus* (50 µl de B60 + 50 µl de MRS estéril) y 100 µl de una mezcla de ambas bacteriocinas B23:B60 (1:1 vol/vol) (MB). Las placas se incubaron a 37°C durante 18-24 h. Finalmente se midieron en milímetros (mm) las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano. Cada ensayo se realizó por duplicado.

En función a los tamaños de los halos se determinaron los tipos de interacciones entre las bacteriocinas, definiendo como:

- Sinergismo de potenciación: se produce cuando la zona de inhibición del crecimiento bacteriano observado en la mezcla bacteriocinogénica resulta superior a la suma de las zonas de inhibición individuales de las bacteriocinas B23 y B60. Se consideró como tal, una diferencia > 2 mm en el tamaño del halo de inhibición de la mezcla B23:B60 respecto a la suma de los halos de cada una de las bacteriocinas B23 y B60.
- Adición: se observa cuando el halo de inhibición producido por la mezcla de bacteriocinas es aproximado a la suma de los halos de inhibición de cada una de las bacteriocinas.
- Antagonismo: ocurre cuando la zona de inhibición en la mezcla B23:B60 es significativamente menor que la suma de los halos encontrados con las bacteriocinas en forma individual.
- Indiferencia: se da cuando el halo de inhibición en la mezcla de bacteriocinas no difiere del halo de inhibición observado con la bacteriocina más efectiva (Barcia Hernandez y Negro Alvarez, 2002; Garcia Rodriguez y col, 2001).

5.5 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las bacteriocinas de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre *Listeria monocytogenes*

Para realizar esta experiencia se trabajó con el SLC que contenía las bacteriocinas de cada una de las cepas de *Lactobacillus*. A estos sobrenadantes, se les cuantificó la actividad mediante una adaptación de la técnica de dilución crítica. Se realizaron diluciones seriadas al medio de la bacteriocina de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* por separados con caldo MRS y se sembraron 100 µl de cada dilución en pozos realizados en placas de medio MRS, previamente hisopadas con una suspensión de la cepa de listeria ajustada a una concentración igual a la turbidez del tubo 0,5 de la escala de Mc Farland. Se incubó a 37°C por 18 a 24 h y se midieron en milímetros los halos de inhibición de crecimiento de la cepa de *L. monocytogenes* (Ruiz y col., 2009).

Se definió como CIM a la inversa de la máxima dilución que mostró inhibición del crecimiento de la cepa sensible y fue expresado arbitrariamente en unidades de actividad inhibitoria por mililitro (UA/ml) (Martínez y De Martinis, 2005 a y b; Monroy Dosta y col., 2009).

5.6 Estudio de la sensibilidad a antibióticos de las cepas de *Listeria monocytogenes*

El patrón de sensibilidad de *L. monocytogenes* a los antibióticos se estudió siguiendo la técnica de Kirby- Bauer (Bauer y col, 1966). Esta técnica es la adoptada por la NCCLS (Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico) como el método de referencia para difusión en disco. Para ello se utilizaron placas de agar Mueller Hinton; el inóculo se preparó alcanzando una turbidez igual a la del tubo N° 0,5 de la escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) a partir de un cultivo overnight. Dicho inóculo se sembró con un hisopo de dacron estéril realizando estrías en diferentes direcciones hasta cubrir toda la placa; y luego se depositaron los discos impregnados con el antibiótico. Se estudiaron los siguientes antibióticos de uso clínico: norfloxacin (10µg), gentamicina (10µg), ampicilina sulbactama (10/10µg), trimetoprima sulfametoxazol (1.25/23.75µg), penicilina (10U), eritromicina (15µg) y

clindamicina (2µg) (Britania Argentina). Se incubó a 37°C de 18 a 24 h y se efectuó la lectura del diámetro de los halos de inhibición del crecimiento.

Los resultados de sensibilidad fueron interpretados de acuerdo a las tablas de la NCCLS. Se definen tres categorías: resistente, intermedio y sensible. El resultado sensible significa que hay una alta probabilidad de que el paciente responda al tratamiento con el antibiótico ensayado. El resultado resistente implica probabilidad elevada de falla terapéutica (Taroco y col, 2006).

5.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en el estudio se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) y posteriormente, cuando los datos se ajustaron a una distribución normal, se aplicó el Test LSD Fisher. El nivel de significancia con el que se trabajó fue de $p \leq 0,05$ y $p \leq 0,01$ según correspondió. Dichos análisis estadísticos se procesaron utilizando el software Sigma Stat 3.5 de Windows, versión 2006 de Systat Software, Inc, Point Richmond, CA, USA y el software Info Stat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Características culturales de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60.

Las colonias de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 aisladas en agar MRS presentaron la morfología característica del género: colonias lisas, opacas, de bordes netos y sin pigmentos. Las colonias de *L. fermentum* L23 fueron de consistencia cremosa; mientras que las de *L. rhamnosus* L60 fueron más cremosas y brillantes (Figura 6 y 7).

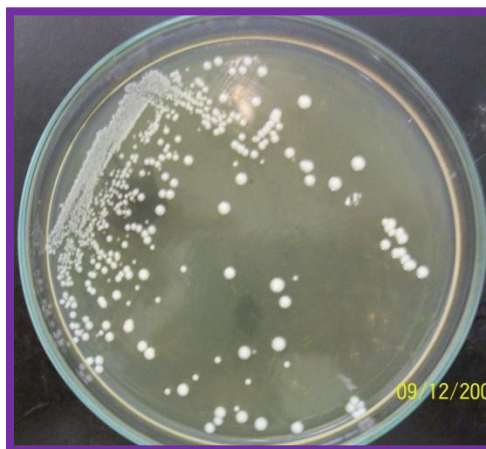


Figura 6: Morfología de colonias de la cepa *Lactobacillus fermentum* L23.



Figura 7: Morfología de colonias de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* L60.

Frente a la tinción de Gram, se observaron bacilos Gram positivos grandes no esporulados, ubicados individualmente o en cadenas cortas.

Acorde a las pruebas bioquímicas propuestas por el manual Bergey, enumeradas en la tabla 5, las dos cepas fueron ubicadas en el género *Lactobacillus* y con el sistema comercial API 50 CH se corroboró que la cepa L23 perteneció a la especie *L. fermentum* y la cepa L60 a la especie *L. rhamnosus*.

Tabla 5: Pruebas metabólicas para la identificación del género *Lactobacillus*.

Pruebas bioquímicas	Resultados
Catalasa	(-)
Reducción de nitrato	(-)
Producción de indol	(-)
Hidrólisis de la gelatina	(-)
Producción de SH ₂	(-)
Movilidad	(-)

6.2 Cultivo e identificación de *Listeria monocytogenes*

Se aislaron muestras obtenidas de diferentes materiales, en placas de agar sangre de carnero al 5%. Luego del período de incubación, se observaron colonias pequeñas, grisáceas con hemólisis beta débil. Se realizó la coloración de Gram y se determinó la presencia de bacilos Gram positivos cortos, regulares, no esporulados, ni ramificados dispuestos en forma individual o en cadenas cortas, semejantes a especies de *Listeria* (Figura 8).

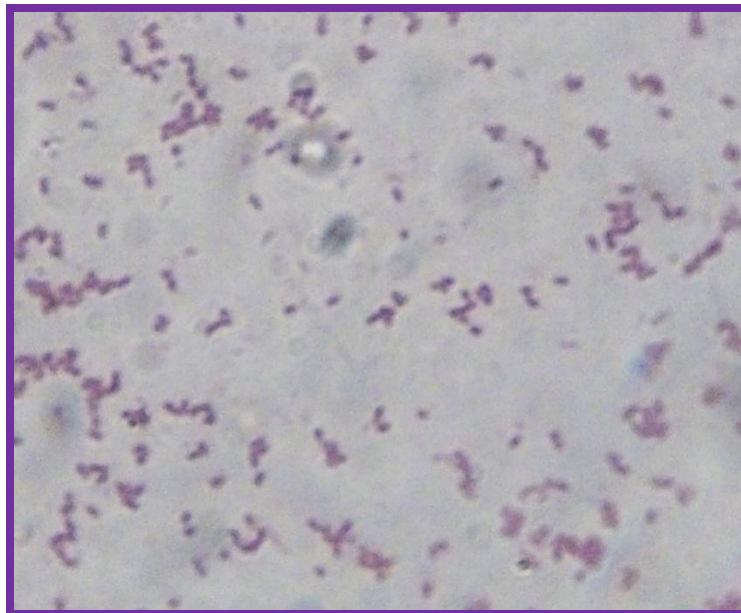


Figura 8: Bacilos Gram positivos, correspondientes a *Listeria* observado en microscopio óptico (1000X).

Acorde a las pruebas bioquímicas propuestas en el Manual de Bergey para la identificación fenotípica de *Listeria*, se identificaron un total de 26 cepas de *L. monocytogenes* (Tabla 6 y 7).

Tabla 6: Pruebas bioquímicas para la identificación del género *Listeria*.

Pruebas bioquímicas	Resultados
Catalasa	(+)
Producción de ácido de la D-glucosa	(+)
Hidrólisis de la esculina	(+)
Voges-Proskauer	(+)
Rojo de metilo	(+)
Movilidad	(+)
Hidrólisis de la urea	(-)
Producción de SH ₂	(-)
Sensibilidad a la gentamicina	Sensible
Sensibilidad a la vancomicina	Sensible

Tabla 7: Pruebas bioquímicas para la identificación de *Listeria monocytogenes*

Pruebas bioquímicas	Resultados
β - hemólisis	(+)
Prueba de CAMP (con <i>Staphylococcus aureus</i>)	(+)
Hidrólisis del hipurato	(+)
Producción de ácido de la D-xilosa	(-)
Producción de ácido del manitol	(-)
Producción de ácido de α -metil-D-manósido	(+)
Producción de ácido de la ramnosa	(+)

Una vez identificadas las cepas de *Listeria* se repicaron periódicamente en placas de agar Muller- Hinton (MH), obteniendo un desarrollo microbiano de colonias blancas y pequeñas (Figura 9), para su uso en las posteriores experiencias.

**Figura 9:** Colonias típicas de *Listeria monocytogenes* en placas de agar MH.

6.3 Detección de la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre *Listeria monocytogenes*

Al evaluar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 se halló que el 100% de las cepas de *L. monocytogenes* estudiadas fueron inhibidas por la acción de los mismos, con zonas de inhibición promedio del crecimiento bacteriano de 18,42 mm y 18,60 mm respectivamente. De esta manera, la actividad antibacteriana de estos SLCs de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Anexo 8.1). Estos resultados son comparables a los obtenidos por Zapata y col. (2009), quienes utilizando el SLC de *Lactobacillus plantarum* LPBM10, hallaron porcentajes similares de inhibición sobre distintas bacterias Gram negativas y positivas, incluyendo a *L. monocytogenes*. En la tabla 8 se muestran los halos de inhibición producidos por las distintas fracciones de los sobrenadantes de ambos lactobacilos, para cada una de las cepas de listeria ensayadas.

Los SLCs de ambos lactobacilos, luego de ser neutralizados con Na (HO) hasta alcanzar un pH 6- 7 continuaron con actividad inhibitoria sobre el 100% de las cepas de *Listeria*. En el caso del SLC neutralizado de *L. fermentum* L23, esta actividad correspondió directamente a la bacteriocina, denominada aquí B23. El tamaño de los halos de inhibición para esta fracción del SLC de la cepa L23 osciló entre 11mm y 22,67 mm, con un valor promedio de 15,97 mm sobre las 26 cepas de *Listeria* ensayadas. En la figura 10, se aprecian los halos de inhibición del crecimiento bacteriano del sobrenadante entero y del neutralizado de *L. fermentum* L23 sobre una cepa sensible de *L. monocytogenes*.

Tabla 8: Actividad antimicrobiana producida por ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre *Listeria monocytogenes*.

Valores medios de los halos de inhibición de crecimiento (mm) ± DS.					
Cepa de <i>Listeria monocytogenes</i>	L23	B23	L60	N60	B60
1	14,67±1,53	13,33±0,58	17±1	15,33±0,58	14,67±0,58
2	17,33±0,58	17,33±1,15	16,33±1,53	14,33±0,58	12,67±1,15
3	19,33±0,58	17±1	16,33±0,58	13,67±0,58	12,33±0,58
4	20,33±0,58	17,67±0,58	17,67±0,58	15,33±0,58	13,67±0,58
5	16,67±0,58	14±1	17±1	13±0	12,33±0,58
6	22±1	17±1	20,33±1,53	17,33±1,15	16,67±0,58
7	17,67±0,58	17,33±1,15	16,33±0,58	16,33±0,96	16±0
8	21±1	18±0	19,67±0,58	18±0	16,67±1,15
9	20,67±0,58	16±1	18,33±1,53	15,33±0,58	14,33±0,58
10	22,33±1,53	18±2	20,67±1,15	17±1	16±1
11	26,67±1,15	17,67±1,53	27,33±1,15	17,33±0,58	16,33±0,58
12	13,67±0,58	12±0	17±0	16±0	14,00±1,73
13	25,67±0,58	22,67±1,15	24,33±2,89	21,33±0,58	19,67±0,58
14	26,67±3,06	22,33±2,52	26,33±0,58	17,33±0,58	16,67±2,08
15	21,33±1,15	18,00±1,73	19,33±1,53	17±1	15,33±0,58
16	18±1	15,33±0,58	17,33±0,58	15,33±0,58	14,33±0,58
17	15,00±1,73	13,67±0,58	16±1	13,67±1,53	13,33±1,53
18	14±1	13±0	17,67±0,58	15,33±0,58	15±0
19	22,67±0,58	20,33±1,15	29,67±0,58	21±1	20,67±0,58
20	14,67±1,15	14±1	14,67±0,58	14,33±0,58	14,33±0,58
21	12,33±1,53	11±0	16,67±0,58	13,67±1,53	12,67±0,58
22	15,33±1,15	14,67±0,58	15,33±0,58	14±0	13,67±1,15
23	15,67±1,15	14,33±0,58	16±2	13,67±0,58	13±0
24	14±0	13±0	14,67±0,58	13,33±1,53	12,67±0,58
25	15,33±0,58	14,67±0,58	15,33±1,53	14,67±0,58	14±0
26	16±1	13±0	16,33±0,58	13±1	12,33±0,58
Valor medio	18,42±4,19	15,97±2,98	18,60±4,01	15,64±2,21	14,74±2,15

Referencias: L23: sobrenadante libre de células de *Lactobacillus fermentum* L23. B23: bacteriocina de *Lactobacillus fermentum* L23. L60: sobrenadante libre de células de *Lactobacillus rhamnosus* L60. N60: sobrenadante libre de células neutralizado de *Lactobacillus rhamnosus* L60. B60: bacteriocina de *Lactobacillus rhamnosus* L60. DS: desvío estándar.

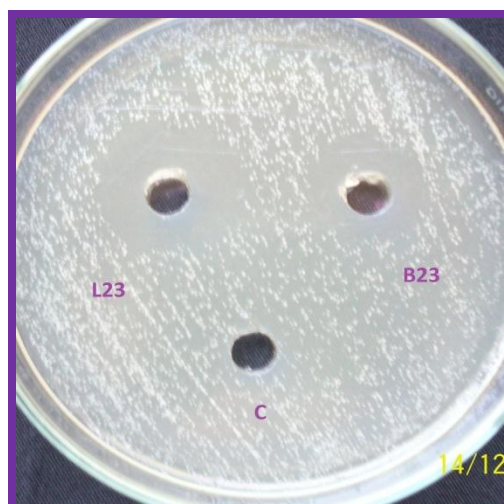


Figura 10: Halos de inhibición del crecimiento bacteriano de *Listeria monocytogenes*, frente al sobrenadante libre de células y bacteriocina de *Lactobacillus fermentum* L23.

Referencias: L23: sobrenadante libre de células. B23: bacteriocina. C: control negativo.

Estos resultados coinciden parcialmente con lo hallado por Martínez y De Martinis (2005b), quienes evaluando la actividad antimicrobiana de una bacteriocina de *L. sakei* sobre cepas de *L. monocytogenes* encontraron un porcentaje de inhibición considerablemente menor frente a dicha sustancia entre las listerias probadas.

La inhibición obtenida en este trabajo con el SLC neutralizado de *L. fermentum* no coinciden con los resultados de Kaushik y col (2009), quienes probando la actividad antilisteria de un SLC neutralizado de *L. plantarum* Lp9, observaron ausencia de actividad inhibitoria, cuando se comparó con la misma fracción ácida, atribuyendo su capacidad antimicrobiana a los ácidos orgánicos sintetizados por dicho lactobacilo. A diferencia de lo que ocurre con la cepa L23, donde la acción antibacteriana está dada por la bacteriocina B23.

Para la cepa de *L. rhamnosus*, la inhibición hallada con el sobrenadante neutralizado (N60), es atribuido a la acción conjunta del peróxido de hidrógeno y de su bacteriocina, designada por conveniencia B60. Los halos de inhibición encontrados con la fracción N60 del SLC de la cepa L60, estuvieron comprendidos entre 13 mm y 21,33 mm con un diámetro de inhibición promedio de 15,64 mm. La actividad antilisteria demostrada con la fracción N60 difiere con los resultados de los ensayos de Lima y col

(2007), ya que ellos usando otras cepas de lactobacilos de origen aviar, observaron que solo el 20% de los SLCs activos contra *L. monocytogenes*, continuaron presentando actividad listericida luego de haber sido neutralizados, con halos de inhibición de tamaño menor a los obtenidos en este trabajo. Más aún, estos autores no pudieron discernir que sustancias eran responsables de dicha actividad, mientras que con la fracción N60, el H₂O₂ y la bacteriocina B60, son los productos responsables de la actividad contra listeria.

Cuando el SLC de *L. rhamnosus* L60 fue neutralizado y tratado con peroxidasa, esta fracción continuó presentando inhibición en todas las cepas de *L. monocytogenes*; responsabilizando por esta antibiosis, a la bacteriocina producida por esta cepa L60 (bacteriocina B60). Los halos de inhibición del crecimiento bacteriano encontrados, estuvieron comprendidos entre 12,33 mm y 20,67 mm, con un valor promedio de 14,74 mm. En la figura 11 se muestra el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano producidos por las tres fracciones del SLC de *L. rhamnosus* sobre una cepa de *L. monocytogenes*.

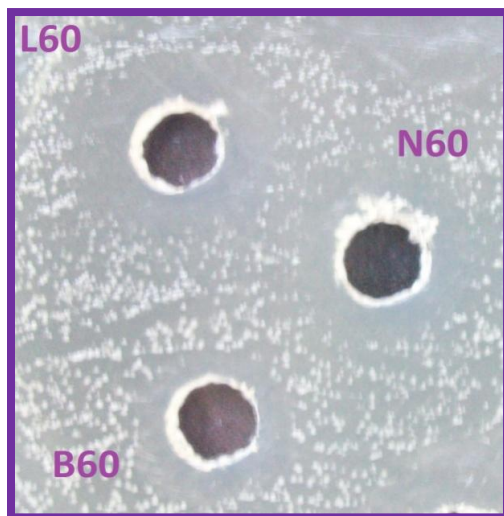


Figura 11: Halos de inhibición del crecimiento bacteriano de *Listeria monocytogenes*, frente al sobrenadante libre de células, sobrenadante libre de células neutralizado y bacteriocina de *Lactobacillus rhamnosus* L60.

Referencias: L60: sobrenadante libre de células. N60: sobrenadante libre de células neutralizado. B60: bacteriocina.

La actividad antilisteria de la bacteriocina B60 demostrada en este trabajo resultó parcialmente similar a los hallazgos de Alvarado- Rivas y Díaz- Rivero (2009), ya que ellos demostraron la actividad inhibitoria del sobrenadante neutralizado de una cepa de *L. plantarum*, frente a un número menor de cepas de *L. monocytogenes*, producido por una sustancia de naturaleza proteica.

Al realizar el análisis de los halos de inhibición promedio producidos por el SLC de la cepa L23 y de la misma fracción neutralizada, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) (Anexo 8.2). En la figura 12, se muestran los halos de inhibición medios entre ambas fracciones del SLC de la cepa L23 frente a las cepas de *L. monocytogenes*.

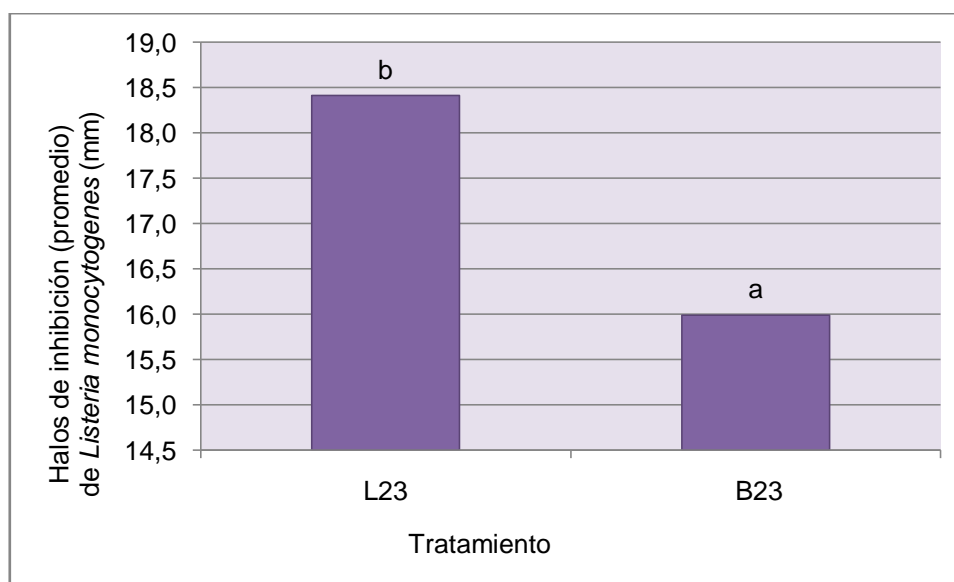


Figura 12: Actividad antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum* L23 frente a cepas de *Listeria monocytogenes*.

Referencias: L23: sobrenadante libre de células. B23: Sobrenadante libre de células neutralizado.

^{a-b} Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas acorde a la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,01$).

n= 26

Estos resultados se explican ya que en el SLC de *L. fermentum* L23 actúan conjuntamente los ácidos orgánicos derivados del catabolismo fermentativo de los azúcares y la bacteriocina B23 sintetizada por esta cepa; aumentando considerablemente la capacidad antimicrobiana sobre las cepas de *L. monocytogenes*. En la figura 13 se aprecia comparativamente los halos de inhibición de estas dos fracciones del sobrenadante en cada una de las cepas de *L. monocytogenes* estudiadas.

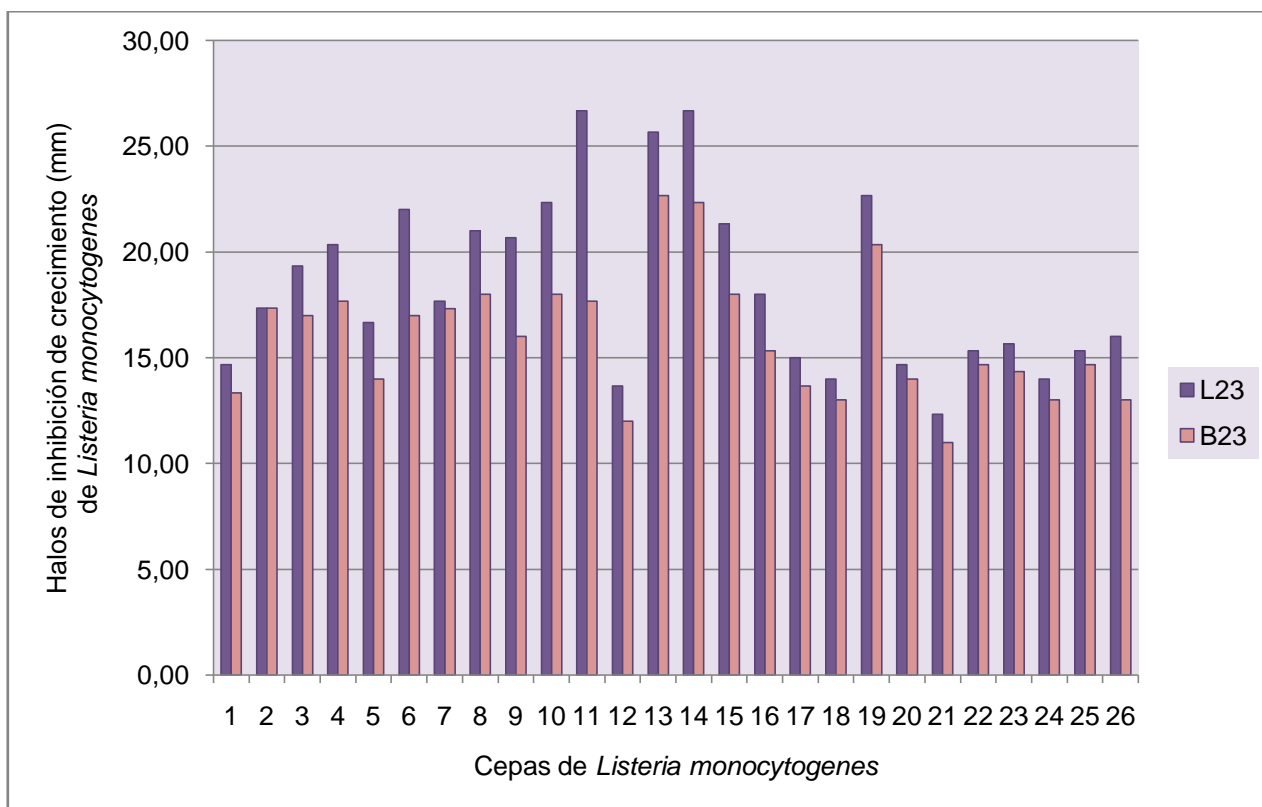


Figura 13: Inhibición de cada cepa de *Listeria monocytogenes* frente a los efectos del sobrenadante libre de células (L23) y el sobrenadante libre de células neutralizado de *Lactobacillus fermentum* L23 (B23).

n=26

Las diferencias en la actividad antilisteria producida entre los SLCs enteros y neutralizados de la cepa L23 coinciden con lo observado por Vallejo y col. (2009), quienes utilizando los SLCs de otras cepas de lactobacilos, encontraron efectos similares al logrado en este trabajo ya que la inhibición se debía a los ácidos y a sustancias tipo bacteriocinas.

En el presente estudio, además de demostrar que en los SLCs de la cepa L23 bajo los diferentes tratamientos persistía la actividad antilisteria y de identificar cuáles eran las sustancias que participaban de la inhibición, también se intentó estimar en qué medida éstos metabolitos eran responsables de dicha actividad. En función al total de cepas de *L. monocytogenes* probadas, se observó que para *L. fermentum* L23 el 88% del efecto inhibitorio correspondió a la acción de la bacteriocina y el 12% restante al efecto de los ácidos orgánicos liberados por esta cepa (Figura 14).

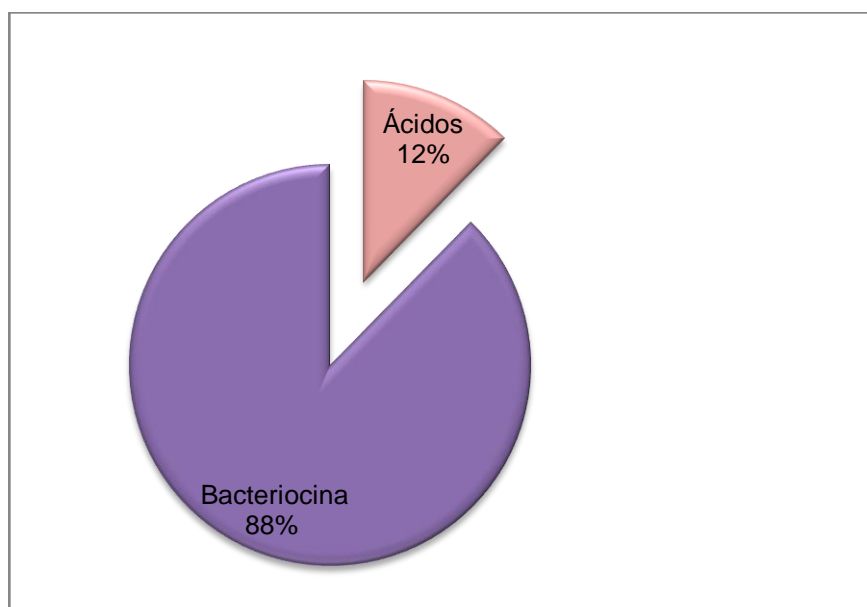


Figura 14: Inhibición del crecimiento bacteriano por la acción de ácidos orgánicos y bacteriocina producido por *Lactobacillus fermentum* L23 sobre *Listeria monocytogenes*.

En el caso de las distintas fracciones tratadas del SLC de *L. rhamnosus* L60 mediante el análisis de comparación múltiple (ANOVA), se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la inhibición producida por el SLC entero, SLC neutralizado y el SLC neutralizado y tratado con peroxidasa sobre el desarrollo bacteriano de las cepas de *L. monocytogenes* ($p < 0,01$) (Anexo 8.3).

En la figura 15, se observan las diferencias en el tamaño de los halos de inhibición bacteriana de cada fracción del SLC de la cepa L60.

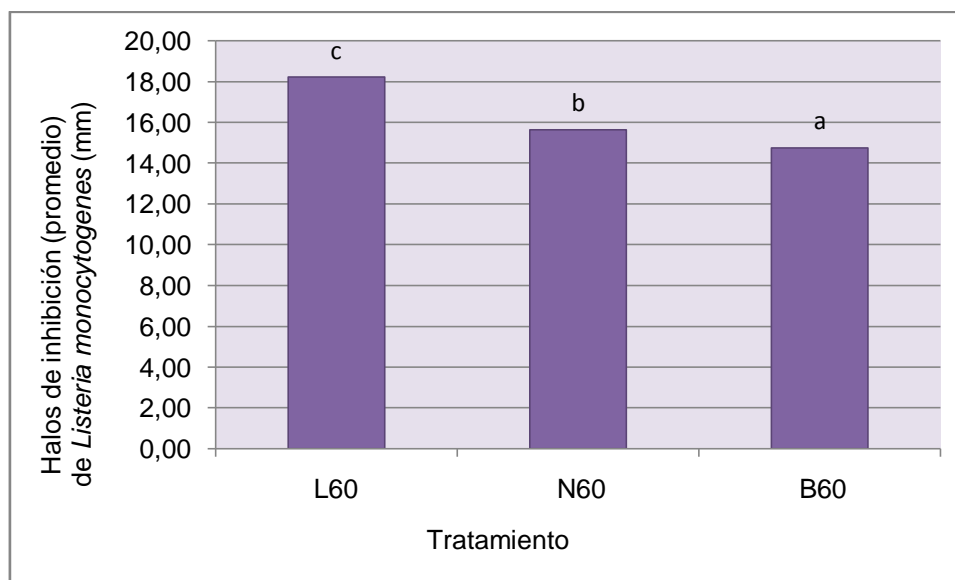


Figura 15: Actividad antimicrobiana de *Lactobacillus rhamnosus* L60 frente a cepas de *Listeria monocytogenes*.

Referencias: L60: sobrenadante libre de células. N60: sobrenadante libre de células neutralizado. B60: sobrenadante libre de células neutralizado y tratado con peroxidasa.

^{a-c} Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas acorde a la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,01$).

n= 26

Este descenso gradual en la actividad antimicrobiana de las distintas fracciones del SLC de la cepa L60 se explica debido a la acumulación de las sustancias con actividad biológica presente en el sobrenadante entero de *L. rhamnosus* potenciando la actividad antilisteria respecto a las otras dos fracciones donde actúan el H_2O_2 y la bacteriocina B60 conjuntamente y, por último, la bacteriocina individualmente, sobre las cepas de *Listeria*. Estos resultados son similares a los hallados recientemente por Aguilar y Bernadette (2010), ya que estos autores probaron la actividad antimicrobiana de sobrenadantes de otras especies de lactobacilos, también productoras de ácidos, H_2O_2 y de sustancias tipo bacteriocinas, y encontraron un efecto inhibitorio superior con los sobrenadantes sin tratar, en comparación a los mismos neutralizados sobre un número de bacterias susceptibles. Este efecto lo atribuyeron a la sumatoria de metabolitos activos sintetizados por los lactobacilos.

En la figura 16, se observa el efecto antimicrobiano producido por las distintas fracciones del SLC de *L. rhamnosus* L60 para cada una de las cepas de *L. monocytogenes*. En la mayoría de los casos, se obtuvo un halo de inhibición del crecimiento mayor cuando la cepa patógena se enfrentó al SLC sin tratar.

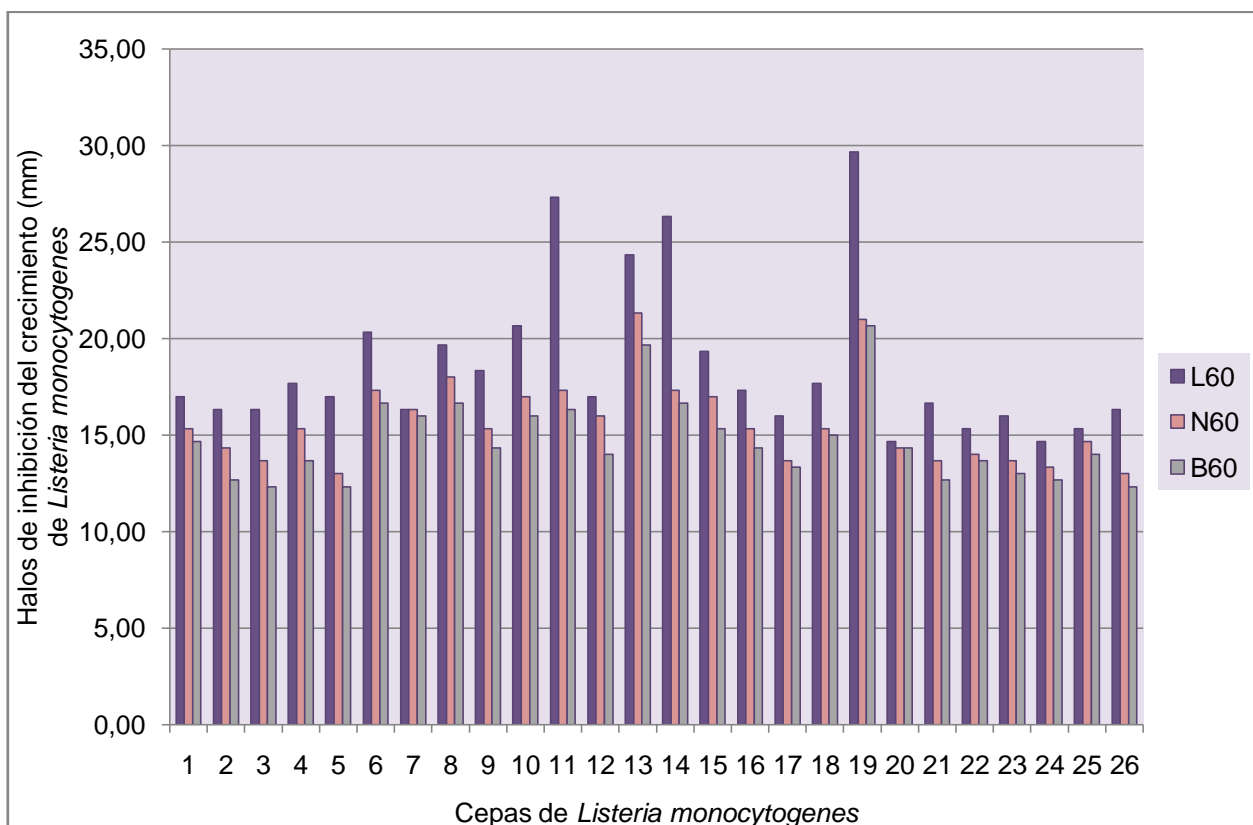


Figura 16: Inhibición de cada cepa de *Listeria monocytogenes* frente a los efectos del sobrenadante libre de células (L60), sobrenadante libre de células neutralizado (N60) y el sobrenadante libre de células neutralizado y tratado con peroxidasa (B60) de *Lactobacillus rhamnosus* L60.

n=26

Se determinó la proporción en que eran responsables del efecto antimicrobiano cada uno de los metabolitos liberados por la cepa de *L. rhamnosus* L60. Se estimó que el 80% de la actividad inhibitoria correspondió a la bacteriocina B60, seguido por la acción de los ácidos (15%) y en menor medida por el H_2O_2 (5%) (Figura 17).

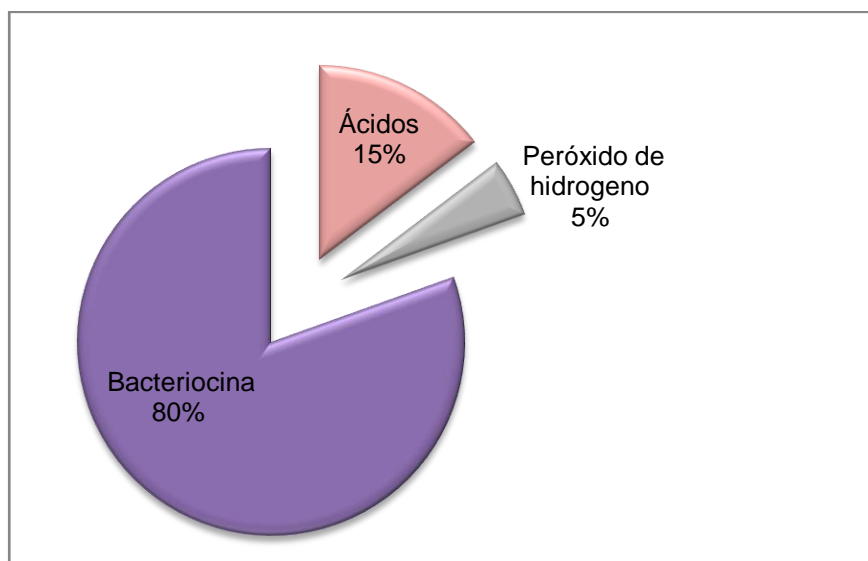


Figura 17: inhibición del crecimiento bacteriano por la acción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocina producido por *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre *Listeria monocytogenes*.

Basados en estos resultados, se destaca la acción de las bacteriocinas de ambos lactobacilos sobre las listerias. El mayor porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano fue debido a la producción de este metabolito secundario. Cuando se comparó el efecto inhibitorio de las bacteriocinas de las cepas lácticas L23 y L60 frente a todas las cepas de listeria, realizando el análisis de la varianza mediante la prueba de Kruskal-Wallis, se determinó que ambas bacteriocinas presentaban diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Anexo 8.4) (Dato no mostrado). La bacteriocina B23 de *L. fermentum* L23 demostró una mayor actividad que la bacteriocina B60 de *L. rhamnosus* L60 sobre las cepas de *L. monocytogenes* probadas.

En la tabla 9, se observan los valores porcentuales de cada sustancia antimicrobiana producida por ambos lactobacilos sobre cada una de las cepas de *L. monocytogenes*.

Tabla 9: Comparación de la inhibición (en por ciento- %) de cada fracción del sobrenadante libre de células sobre *Listeria monocytogenes*.

	<i>L. fermentum</i> L23		<i>L. rhamnosus</i> L60		
	Ácidos	Bacteriocina	Ácidos	H ₂ O ₂	Bacteriocina
1	9	91	10	4	86
2	0	100	12	10	78
3	12	88	17	8	75
4	13	87	14	9	77
5	16	84	23	4	73
6	23	77	15	3	82
7	2	98	0	2	98
8	14	86	8	7	85
9	23	77	17	5	78
10	19	81	18	5	77
11	34	66	36	4	60
12	12	88	6	12	82
13	12	88	12	7	81
14	16	84	34	3	63
15	16	84	12	9	79
16	15	85	11	6	83
17	9	91	15	2	83
18	7	93	13	2	85
19	10	90	29	1	70
20	5	95	2	0	98
21	11	89	18	6	76
22	4	96	9	2	89
23	9	91	15	4	81
24	7	93	9	4	87
25	4	96	5	4	91
26	19	81	21	4	75
Valor medio	12	88	15	5	80

6.4 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de las bacteriocinas de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre *Listeria monocytogenes*

Se determinó la CIM de las bacteriocinas B23 y B60 necesarias para inhibir el crecimiento de 5 cepas de *L. monocytogenes* seleccionadas previamente por su gran susceptibilidad a dichas sustancias, es decir, por presentar los mayores halos de inhibición del crecimiento bacteriano.

En la tabla 10 se expresan los halos de inhibición del crecimiento bacteriano y los valores de CIM de las cepas de *L. monocytogenes* para la bacteriocina de *L. fermentum* L23.

Tabla 10: Concentración inhibitoria mínima de la bacteriocina de *Lactobacillus fermentum* L23 sobre *Listeria monocytogenes*.

Cepa *	Halos de inhibición del crecimiento (mm) frente a diferentes concentraciones de bacteriocina (UA/ml)							CIM
	640	320	160	80	40	20	10	
8	19,67±0,58	15,33±0,58	13±1	11,33±0,58	0	0	0	80
11	20,67±0,58	14±1	12,67±0,58	12,67±0,58	0	0	0	80
14	22±1	19±0	16,67±0,58	15,33±0,58	14,67±0,58	13,33±0,58	0	20
15	22,67±0,58	17±1	16,67±0,58	16±1	14±1	0	0	40
19	22,33±1,53	14,33±0,58	14,33±0,58	13,33±0,58	0	0	0	80

* Cepa de *Listeria monocytogenes*

Se determinó que la CIM de la bacteriocina de *L. fermentum* L23 correspondió a 80 UA/ml para el 60% de las listerias ensayadas, a 40UA/ml para el 20% y 20UA/ml para el 20% restante. Es decir, que la bacteriocina aún diluída 32 veces, presentó actividad inhibitoria sobre el 20% de las cepas de *L. monocytogenes* ensayadas (Figura 18).

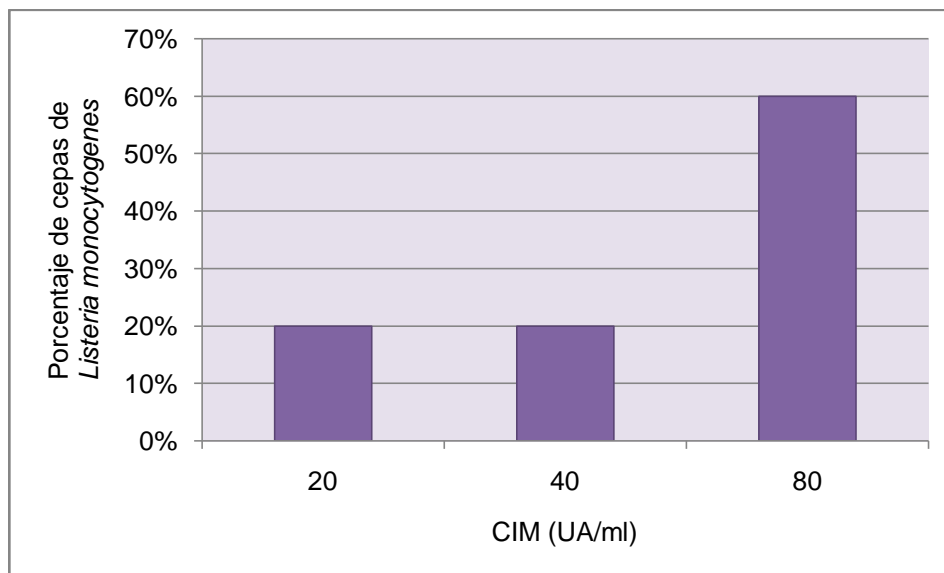


Figura 18: Valores de CIM de la bacteriocina de *Lactobacillus fermentum* L23 sobre diferentes cepas de *Listeria monocytogenes*.

n= 5.

En la figura 19 se muestran los halos de inhibición del crecimiento bacteriano para las distintas diluciones de la bacteriocina B23 de *L. fermentum* sobre una cepa de *L. monocytogenes*.

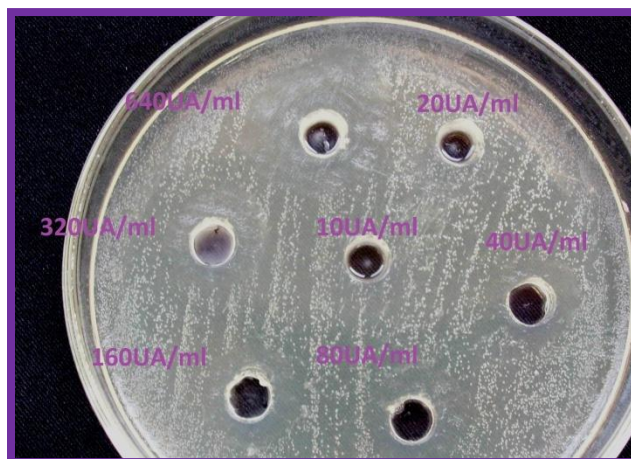


Figura 19: Valores de CIM de una cepa de *Listeria monocytogenes* frente a la bacteriocina B23. La CIM para esta cepa es 40 UA/ml.

Al evaluar la CIM de las cepas de *L. monocytogenes* respecto a la bacteriocina B60, se determinó que el 60% de ellas presentaron una CIM de 160 UA/ml, mientras el 40% restante tuvieron una CIM de 40 UA/ml. En este caso, la bacteriocina B60, aún diluída 16 veces mostró actividad inhibitoria sobre *L. monocytogenes*. En la tabla 11 se muestran los valores de CIM de las listerias probadas y sus respectivos halos de inhibición frente a cada dilución de la bacteriocina de *L. rhamnosus* L60.

Tabla 11: Concentración inhibitoria mínima de la bacteriocina de *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre *Listeria monocytogenes*.

Halos de inhibición del crecimiento (mm) frente a diferentes concentraciones de bacteriocina (UA/ml)								
Cepa*	640	320	160	80	40	20	10	CIM
8	17±1	14,33±0,58	13,33±0,58	0	0	0	0	160
11	19,33±1,15	14,33±2,08	12,67±0,58	0	0	0	0	160
14	26±1	17,33±0,58	16,67±0,58	15,67±0,58	15±0	0	0	40
15	16±0	14±0	13,33±0,58	0	0	0	0	160
19	20,67±0,58	15,33±1,15	15,33±0,58	15±0	13,67±0,58	0	0	40

*Cepa de *Listeria monocytogenes*

Es de destacar la actividad antimicrobiana de ambas bacteriocinas, ya que aún diluídas varias veces continúan mostrando inhibición sobre el desarrollo bacteriano. En la figura 20 se presentan los valores porcentuales de *L. monocytogenes* inhibidas por dos concentraciones de bacteriocina B60.

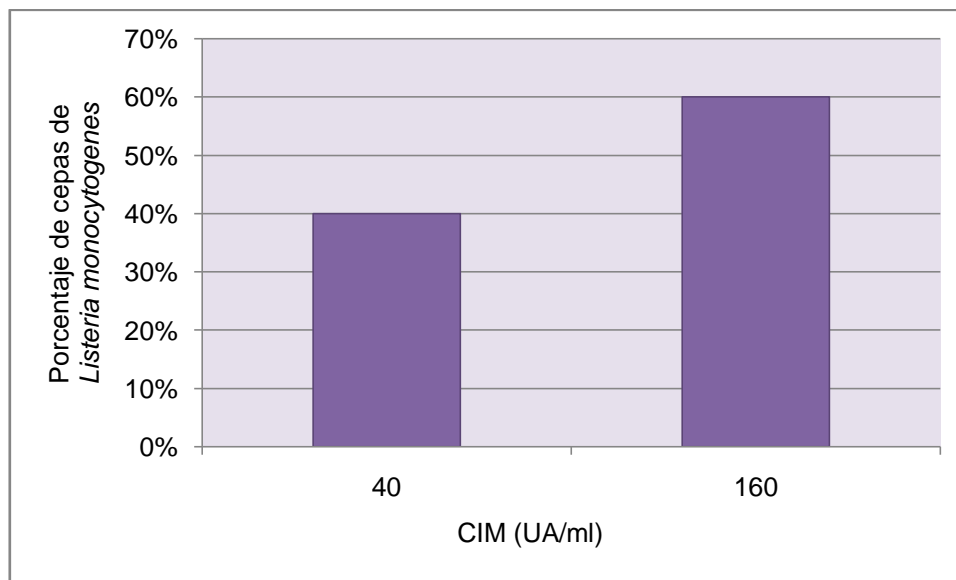


Figura 20: Valores de CIM de la bacteriocina de *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre diferentes cepas de *Listeria monocytogenes*.

n= 5

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, coincidieron con los hallazgos de Katla y col. (2003), quienes demostraron que la sakacina P, sakacina A, pediocina PA-1 y nisina inhibían el desarrollo de cepas de *L. monocytogenes* a valores reducidos de CIM, siendo la bacteriocina más potente la sakacina P producida por *Lactobacillus sakei* LTH673. Eijsink y col (1998), cuantificaron la actividad listericida de cuatro bacteriocinas de clase IIa (pediocina PA-1, enterocina A, sakacina P y curvacina A) y obtuvieron valores bajos de CIM para todas ellas.

6.5 Interacciones de las bacteriocinas B60 y B23 sobre *Listeria monocytogenes*

Al realizar la técnica de interacción de ambas bacteriocinas y compararla con la actividad inhibitoria de cada una de ellas sobre el desarrollo de *L. monocytogenes*, se encontró sinergismo entre B60 y B23 en la totalidad de las cepas ensayadas mediante la técnica de difusión en pozos en el agar. En la figura 21, se observa mayor efecto inhibitorio producido por la mezcla de bacteriocinas que la inhibición lograda por cada una de ellas sobre una cepa susceptible de *L. monocytogenes*.

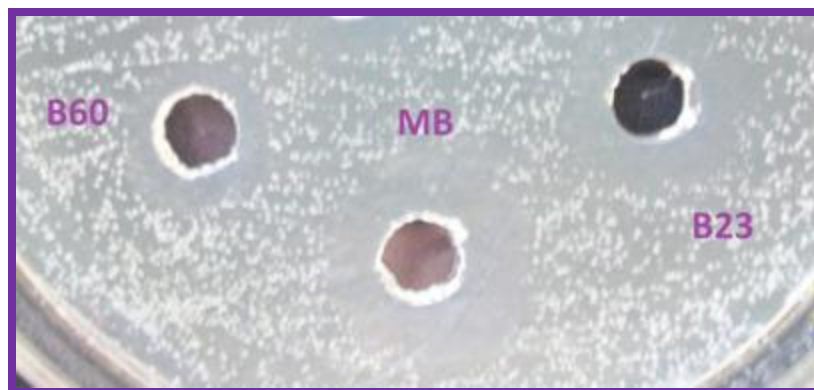


Figura 21: Halos de inhibición del crecimiento bacteriano producidos por las bacteriocinas de *Lactobacillus fermentum* L23 (B23) y *Lactobacillus rhamnosus* L60 (B60) y la mezcla de ambas bacteriocinas (MB).

Aplicando la prueba de mínimas diferencias de Fisher (LSD) sobre estos resultados obtenidos, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la inhibición producida por la bacteriocina B23, B60 y la mezcla de ambas (MB) sobre todas las cepas de listerias probadas ($p < 0,05$) (Anexo 8.5). De esta manera, se demostró que la actividad sinérgica antilisteria lograda con la mezcla de bacteriocinas supera positivamente a la inhibición por las bacteriocinas B23 y B60 de forma independiente (Figura 22).

En la tabla 12, se detallan los valores promedios de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano producidos por las bacteriocinas de *L. fermentum* L23, *L. rhamnosus* L60 y la combinación de ambas sustancias.

Dado que los halos de inhibición promedio obtenidos con la mezcla de bacteriocinas (20,28 mm) fueron superiores a la suma de los halos producidos por las bacteriocinas B23 (7,99 mm) y B60 (7,37 mm), se determinó que la acción combinada de estas sustancias resultó en un sinergismo de potenciación. En la figura 23, se observan comparativamente las diferencias en el tamaño de las zonas de inhibición, producidos por la mezcla de bacteriocinas, y de cada una de ellas, sobre las cepas de *L. monocytogenes* estudiadas.

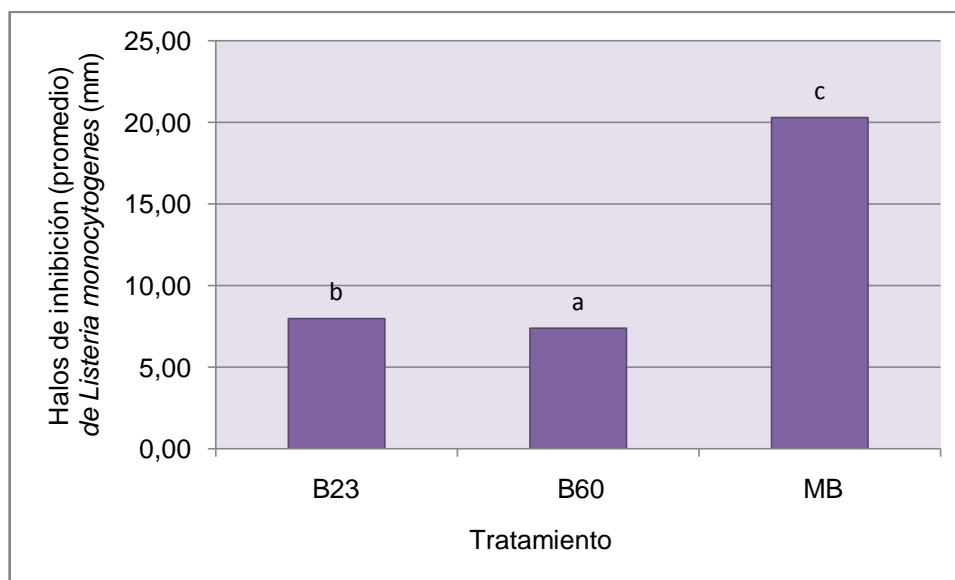


Figura 22: Actividad antimicrobiana de las bacteriocinas B23 y B60 y de la mezcla de ambas (MB).

^{a-c} Letras distintas indican diferencias significativas acorde al test de Fisher (LSD) ($p \leq 0,05$).

n= 26

Estos resultados sobre sinergismo entre las bacteriocinas producidas por *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 coinciden parcialmente con los hallazgos recientes de Aguilar y Bernadette (2010), quienes utilizando una mezcla de bacteriocinas sintetizadas por tres BALs, encontraron un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de un número de microorganismos susceptibles (entre ellos cepas de *L. monocytogenes*), producto de la interacción sinérgica entre las sustancias liberadas por dichas bacterias lácticas.

En otro trabajo, Eijsink y col (1998), analizaron los posibles efectos sinérgicos inhibitorios de cuatro bacteriocinas clase IIa, realizando combinaciones de a dos y contrariamente a lo ocurrido en este trabajo, éstos investigadores no observaron efecto sinérgico.

Tabla 12: Actividad antimicrobiana de las bacteriocinas de *Lactobacillus fermentum* L23 y de *Lactobacillus rhamnosus* L60 en forma conjunta y por separado sobre *Listeria monocytogenes*.

Valores medios de los halos de inhibición de crecimiento (mm) \pm DS.			
Cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	B23	B60	MB
1	6,67 \pm 0,29	7,33 \pm 0,29	19 \pm 1
2	8,67 \pm 0,58	6,33 \pm 0,58	19,67 \pm 1,53
3	8,50 \pm 0,50	6,17 \pm 0,29	21,67 \pm 2,08
4	8,83 \pm 0,29	6,83 \pm 0,29	19,67 \pm 1,53
5	7,00 \pm 0,50	6,17 \pm 0,29	17,67 \pm 1,15
6	8,50 \pm 0,50	8,33 \pm 0,29	21,33 \pm 1,15
7	8,67 \pm 0,58	8 \pm 0	20,33 \pm 1,53
8	9 \pm 0	8,33 \pm 0,58	23 \pm 0
9	8,00 \pm 0,50	7,17 \pm 0,29	20,67 \pm 0,58
10	9,00 \pm 0,19	8,00 \pm 0,50	28 \pm 2
11	8,83 \pm 0,76	8,17 \pm 0,29	24 \pm 0
12	6 \pm 0	7,00 \pm 0,87	16 \pm 1
13	11,33 \pm 0,58	9,83 \pm 0,29	27,67 \pm 1,53
14	11,17 \pm 1,26	8,33 \pm 1,04	22 \pm 1
15	9,00 \pm 0,87	7,67 \pm 0,29	24,33 \pm 1,15
16	7,67 \pm 0,29	7,17 \pm 0,29	20 \pm 2
17	6,83 \pm 0,29	6,67 \pm 0,58	17,33 \pm 1,15
18	6,50 \pm 0,00	7,50 \pm 0,00	18,33 \pm 0,58
19	10,17 \pm 0,58	10,33 \pm 0,29	22,33 \pm 0,58
20	7,00 \pm 0,50	7,17 \pm 0,29	18,33 \pm 1,53
21	5,50 \pm 0,00	6,33 \pm 0,29	14 \pm 1
22	7,33 \pm 0,29	6,83 \pm 0,58	19 \pm 1
23	7,17 \pm 0,29	6,50 \pm 0,00	20,33 \pm 1,15
24	6,50 \pm 0,00	6,33 \pm 0,29	17 \pm 1
25	7,33 \pm 0,29	7 \pm 0	18 \pm 1
26	6,50 \pm 0,00	6,17 \pm 0,29	17,67 \pm 0,58
Promedio	7,99\pm1,49	7,37\pm1,08	20,28\pm3,27

Referencias: B23: bacteriocina de *Lactobacillus fermentum*. B60: bacteriocina de *Lactobacillus rhamnosus*. MB: Mezcla L23:60 en proporción 1:1. DS: desviación estándar.

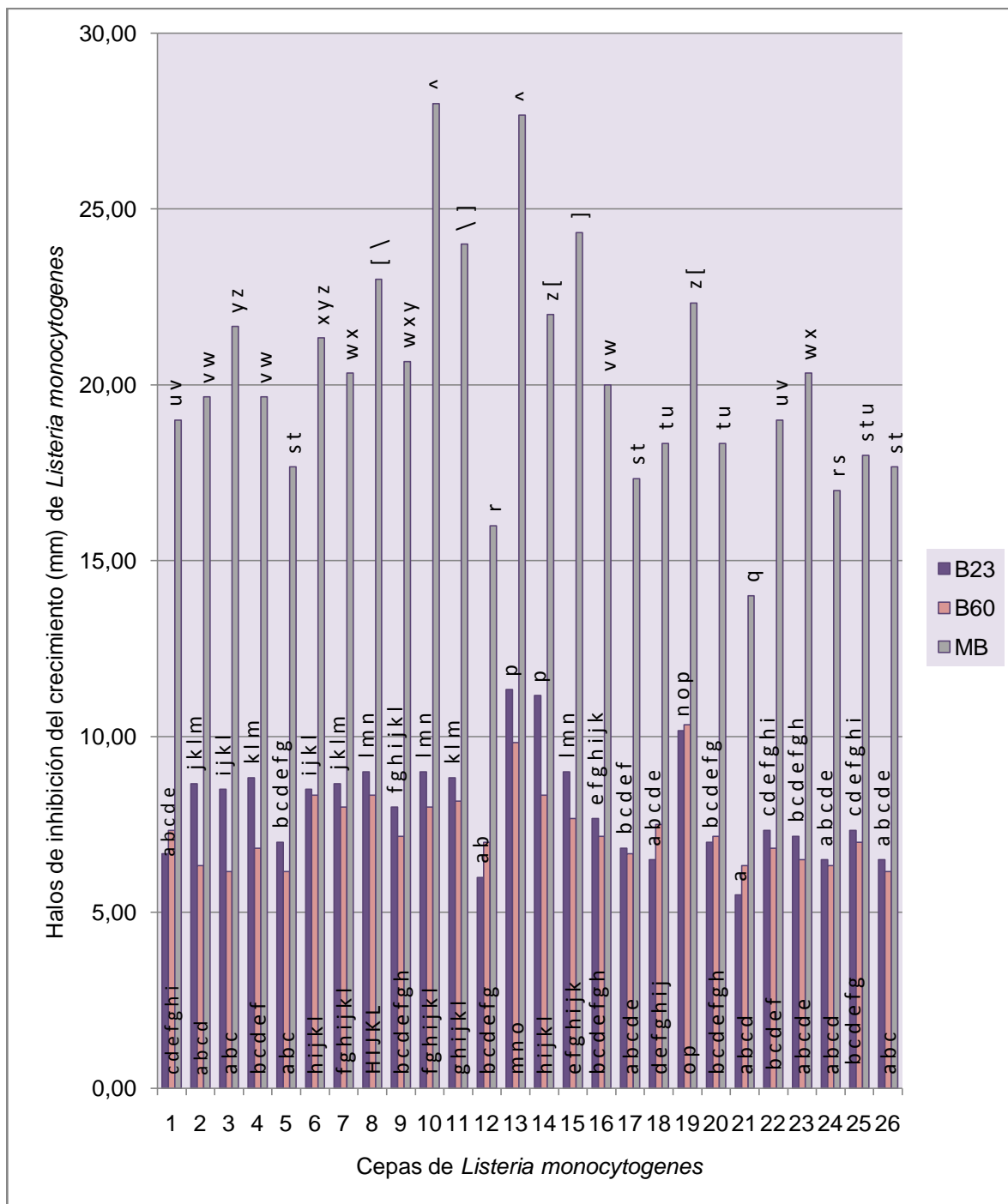


Figura 23: Comportamiento de cada cepa frente a las bacteriocina B23 y B60, evaluadas individualmente y en forma conjunta (MB).

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Fisher (LSD) ($p < 0,05$)

n = 26.

6.6 Perfil de susceptibilidad antibiótica de las cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas

Cuando se investigó el perfil antibiótico de las cepas de *L. monocytogenes*, se encontró que el 100% de las cepas aisladas fueron sensibles a norfloxacina, trimetoprima-sulfametoxazol, ampicilina/ sulbactama, eritromicina, penicilina y gentamicina. En el caso de clindamicina, el 60% de las cepas de *Listeria* presentaron sensibilidad, mientras que el 40% restante mostraron una sensibilidad intermedia a dicho antibiótico (Figura 24).

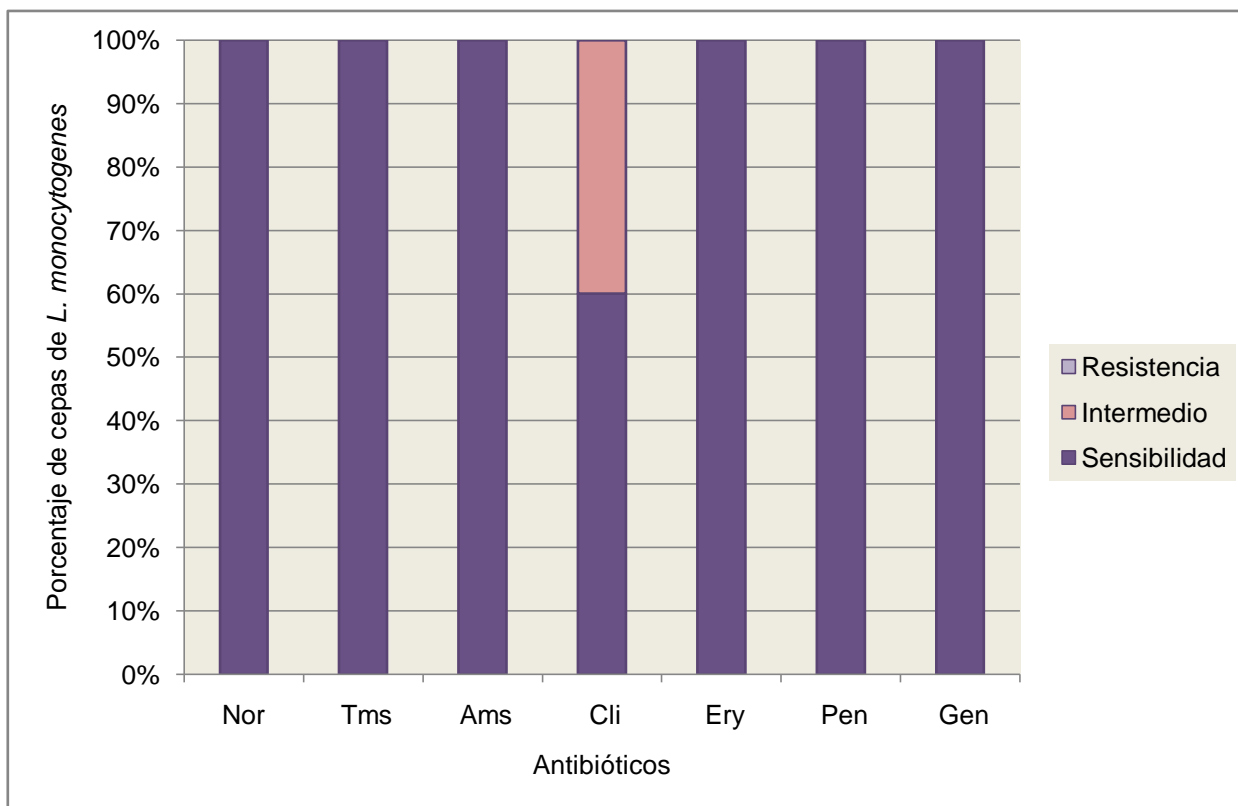


Figura 24: Susceptibilidad de las cepas de *Listeria monocytogenes* frente a diferentes antibióticos.

Referencias: Nor: norfloxacina. Tms: trimetoprima-sulfametoxazol. Ams: ampicilina/ sulbactama. Cli: clindamicina. Ery: eritromicina. Pen: penicilina. Gen: gentamicina.

La susceptibilidad a eritromicina entre las cepas estudiadas difieren con lo encontrado por Villalobos de Bastardo y Martínez Nazaret (2006), quienes observaron que solo el 60% de las *L. monocytogenes* ensayadas mostraron sensibilidad a eritromicina. Sin embargo, resultados similares a los expuestos en este trabajo fueron observados por el grupo de investigación de Morvan (2010), quienes encontraron solo tres cepas resistentes a este antibiótico sobre un total de 4.668 cepas de *L. monocytogenes* analizadas.

El porcentaje de susceptibilidad observado con penicilina y trimetoprima-sulfametoxazol, coincide con lo encontrado en otro trabajo realizado por Kiss y col (2006), donde la totalidad de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de humanos y provenientes de alimentos fueron inhibidas por estas sustancias. Ruiz Bolívar y col (2011), sin embargo, encontraron que solo el 98% y 84% de las cepas de *L. monocytogenes* estudiadas mostraron ser susceptibles a trimetoprima-sulfametoxazol y penicilina respectivamente.

La antibiosis observada en esta experiencia con clindamicina no coincide con los resultados de Zamora y col (2006), ya que estos autores analizando muestras de origen alimentario y clínico, hallaron entre las cepas de listeria un 100% de resistencia a este antibiótico. No obstante, en trabajos realizados por Davis y Jackson (2009) pocas cepas aisladas fueron resistentes a la clindamicina (21%).

La susceptibilidad a ampicilina y gentamicina obtenidas con las cepas aisladas en este trabajo, coinciden con los resultados de Chaves y Arias (2009), ya que éstos autores hallaron un porcentaje similar de cepas susceptibles a estos antibióticos, sobre un número semejante de cepas de *L. monocytogenes* de origen alimentario. En trabajos realizados por Di Pasquale (2009), la resistencia a gentamicina fue común entre las cepas estudiadas; Conter y col (2009) observaron cepas resistentes a ampicilina, estos resultados muestran como *L. monocytogenes*, poco a poco, va adquiriendo resistencia a los antibióticos a lo largo del tiempo.

Para las infecciones en mujeres, neonatos e incluso en animales la terapéutica actual continúa siendo mediante el uso de antibióticos tales como penicilina y aminoglucósidos (Morvan y col, 2010).

Las cepas estudiadas en el presente trabajo, muestran un buen perfil de susceptibilidad a estos antibióticos. Pero como se informa a nivel mundial, es urgente la búsqueda de nuevas terapias alternativas o de apoyo para disminuir el impacto de la resistencia antibiótica entre muchos microorganismos, incluida *L. monocytogenes* (Conter y col, 2009).

El interés por utilizar como probióticos a los lactobacilos, se debe a las propiedades benéficas que ellos poseen, el principal objetivo de la terapia con agentes bioterapéuticos podría ser prevenir el desarrollo de patógenos al mismo tiempo que restablecer la microbiota y evitar los efectos secundarios de los tratamientos farmacológicos convencionales (Mc Lean y Rosenstein, 2000; Gillor y col, 2008a).

Los resultados hallados *in vitro* afirman la hipótesis planteada.

7 CONCLUSIONES

- Todas de las cepas de *L. monocytogenes* estudiadas fueron sensibles a la acción de las bacteriocinas producidas por *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60.
- La bacteriocina de *L. fermentum* produjo halos de inhibición del crecimiento bacteriano promedio de mayor tamaño que los producidos por la bacteriocina de *L. rhamnosus* sobre las cepas de listerias.
- Los sobrenadantes libres de células de ambos lactobacilos sin tratamiento presentaron los mayores halos de inhibición del crecimiento bacteriano sobre las diferentes cepas de *L. monocytogenes*.
- El mayor porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano fue debido a la producción de bacteriocinas en las dos cepas de lactobacilos estudiadas.
- Ambas bacteriocinas, aún diluídas, continuaron teniendo actividad antimicrobiana frente a las cepas de listerias estudiadas.
- La interacción observada entre ambas bacteriocinas frente a todas las cepas de *L. monocytogenes* ensayadas corresponde a un sinergismo de potenciación.
- Las cepas de *L. monocytogenes* estudiadas presentaron un alto grado de susceptibilidad a los antibióticos ensayados.

Los resultados de este estudio son promisorios respecto a la efectividad de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 como importantes inhibidoras en el control biológico de cepas de *Listeria monocytogenes*.

Estos hallazgos sugieren que las cepas de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 podrían utilizarse como una posible alternativa bioterapéutica en el control de *L. monocytogenes*, reemplazando a los tratamientos farmacológicos convencionales y evitando así sus efectos secundarios.

8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

8.1 Análisis de varianza: L23 vs L60

Fuente de datos: 1 dato en VIRGINIA.SNB

Test de normalidad: Falló ($P < 0,050$)

Análisis de varianza mediante la prueba de Kruskal-Wallis

Fuente de datos: 1 dato en VIRGINIA.SNB

Grupo	N	Ausente	Mediana	25%	75%
L23	78	0	17,000	15,000	21,000
L60	78	0	17,000	16,000	20,000

$H = 0,221$ con 1 grado de libertad. ($P = 0,638$)

Las diferencias en los valores medios entre los grupos de tratamiento no son suficientes para excluir la posibilidad de que la diferencia se deba a la variabilidad del muestreo aleatorio; no hay una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0,638$).

8.2 Análisis de varianza: L23 vs B23

Fuente de datos: 1 dato en Notebook 4

Test de normalidad: Falló ($P < 0,050$)

Análisis de varianza mediante la prueba de Kruskal-Wallis

Fuente de datos: 1 dato en Notebook 4

Grupo	N	Ausente	Mediana	25%	75%
L23	78	0	17,000	15,000	21,000
B23	78	0	15,500	13,000	18,000

$H = 12,707$ con 2 grados de libertad. ($P \leq 0,001$)

Las diferencias en los valores medios entre los grupos de tratamiento son mayores de lo que se esperaría por azar, hay una diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,001$).

Para aislar el grupo o los grupos que difieren de otros, se utiliza el método de múltiple comparación.

Todos los procedimientos de comparación múltiple por parejas (Método de Student-Newman-Keuls).

Comparación	Diferencias de rango	q	$P < 0,01$
L23 vs B23	2003,000	5,020	Si

8.3 Análisis de varianza: L60 vs N60 vs B60

Fuente de datos: 1 dato en VIRGINIA.SNB

Test de normalidad: Falló ($P < 0,050$)

Análisis de varianza mediante la prueba de Kruskal-Wallis

Fuente de datos: 1 dato en VIRGINIA.SNB

Grupo	N	Ausente	Mediana	25%	75%
L60	78	0	17,000	16,000	20,000
N60	78	0	15,000	14,000	17,000
B60	78	0	14,000	13,000	16,000

$H = 61,671$ con 2 grados de libertad. ($P = <0,001$)

Las diferencias en los valores medios entre los grupos de tratamiento son mayores de lo que se esperaría por azar, hay una diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,001$)

Para aislar el grupo o los grupos que difieren de otros, se utiliza el método de múltiple comparación.

Todos los procedimientos de comparación múltiple por parejas (Método de Student-Newman-Keuls).

Comparación	Diferencia de rangos	q	P<0,01
L60 vs B60	6447,500	10,784	Si
L60 vs N60	4394,500	11,014	Si
N60 vs B60	2053,000	5,145	Si

8.4 Análisis de varianza: B23 vs B60

Fuente de datos: 1 dato en VIRGINIA.SNB

Test de normalidad: Falló ($P < 0,050$)

Análisis de varianza mediante la prueba de Kruskal-Wallis

Fuente de datos: 1 dato en VIRGINIA.SNB

Grupo	N	Ausente	Mediana	25%	75%
B23	78	0	15,500	13,000	18,000
B60	78	0	14,000	13,000	16,000

$H = 6,619$ con 1 grado de libertad. ($P = 0,010$)

Las diferencias en los valores medios entre los grupos de tratamiento son mayores de lo que se esperaría por azar, hay una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0,010$)

Para aislar el grupo o los grupos que difieren de otros, se utiliza el método de múltiple comparación.

8.5 Análisis de varianza: B23 vs B60 vs MB

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Tamaño del halo	234	0,99	0,98	6,79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9336,65	77	121,26	186,36	<0,0001
Tratamiento	8273,65	2	4136,82	6358,08	<0,0001
Cepa	733,54	25	29,34	45,10	<0,0001
Tratamiento*Cepa	329,46	50	6,59	10,13	<0,0001
Error	101,50	156	0,65		
Total	9438,15	233			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,25513

Error: 0,6506 gl: 156

Tratamiento	Medias	n	
B60	7,37	78	A
B23	7,99	78	B
MB	20,28	78	C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,30093

Error: 0,6506 gl: 156

Tratamiento Cepa Medias n

Tratamiento	Cepa	Medias	n								
B23	21,00	5,50	3	A							
B23	12,00	6,00	3	A	B						
B60	5,00	6,17	3	A	B	C					
B60	3,00	6,17	3	A	B	C					
B60	26,00	6,17	3	A	B	C					
B60	2,00	6,33	3	A	B	C	D				
B60	24,00	6,33	3	A	B	C	D				
B60	21,00	6,33	3	A	B	C	D				
B23	24,00	6,50	3	A	B	C	D	E			
B23	26,00	6,50	3	A	B	C	D	E			
B23	18,00	6,50	3	A	B	C	D	E			
B60	23,00	6,50	3	A	B	C	D	E			
B23	1,00	6,67	3	A	B	C	D	E			
B60	17,00	6,67	3	A	B	C	D	E			
B23	17,00	6,83	3		B	C	D	E	F		
B60	4,00	6,83	3		B	C	D	E	F		
B60	22,00	6,83	3		B	C	D	E	F		
B23	20,00	7,00	3		B	C	D	E	F	G	
B23	5,00	7,00	3		B	C	D	E	F	G	
B60	25,00	7,00	3		B	C	D	E	F	G	
B60	12,00	7,00	3		B	C	D	E	F	G	

B23	23,00	7,17	3	B	C	D	E	F	G	H									
B60	9,00	7,17	3	B	C	D	E	F	G	H									
B60	16,00	7,17	3	B	C	D	E	F	G	H									
B60	20,00	7,17	3	B	C	D	E	F	G	H									
B23	25,00	7,33	3		C	D	E	F	G	H	I								
B23	22,00	7,33	3		C	D	E	F	G	H	I								
B60	1,00	7,33	3		C	D	E	F	G	H	I								
B60	18,00	7,50	3			D	E	F	G	H	I	J							
B23	16,00	7,67	3				E	F	G	H	I	J	K						
B60	15,00	7,67	3				E	F	G	H	I	J	K						
B23	9,00	8,00	3					F	G	H	I	J	K	L					
B60	10,00	8,00	3					F	G	H	I	J	K	L					
B60	7,00	8,00	3					F	G	H	I	J	K	L					
B60	11,00	8,17	3						G	H	I	J	K	L					
B60	14,00	8,33	3							H	I	J	K	L					
B60	8,00	8,33	3							H	I	J	K	L					
B60	6,00	8,33	3							H	I	J	K	L					
B23	6,00	8,50	3								I	J	K	L					
B23	3,00	8,50	3								I	J	K	L					
B23	7,00	8,67	3									J	K	L	M				
B23	2,00	8,67	3									J	K	L	M				
B23	4,00	8,83	3										K	L	M				
B23	11,00	8,83	3										K	L	M				
B23	15,00	9,00	3											L	M	N			

B23	8,00	9,00	3								L	M	N
B23	10,00	9,00	3								L	M	N
B60	13,00	9,83	3	M	N	O							
B23	19,00	10,17	3		N	O	P						
B60	19,00	10,33	3			O	P						
B23	14,00	11,17	3				P						
B23	13,00	11,33	3				P						
MB	21,00	14,00	3					Q					
MB	12,00	16,00	3					R					
MB	24,00	17,00	3					R	S				
MB	17,00	17,33	3						S	T			
MB	26,00	17,67	3						S	T			
MB	5,00	17,67	3						S	T			
MB	25,00	18,00	3						S	T	U		
MB	18,00	18,33	3							T	U		
MB	20,00	18,33	3							T	U		
MB	1,00	19,00	3								U	V	
MB	22,00	19,00	3								U	V	
MB	2,00	19,67	3									V	W
MB	4,00	19,67	3									V	W
MB	16,00	20,00	3									V	W

9 BIBLIOGRAFÍA

- **Adzitey, F.; Huda, N.** 2010. *Listeria monocytogenes* in foods: Incidences and possible control measures. African Journal of Microbiology Research. 4: 2848- 2855.
- **Aguilar, C.; Bernadette K.** 2010. Bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) of acid lactic bacteria: A biocontrol alternative for the food industry. Alfa editores técnicos. Universidad Sabana, Colombia.
- **Alvarado- Rivas, C.C.; Díaz- Rivero, C.G.** 2009. Efecto antagónico de *Lactobacillus plantarum* aislado de pastizal de finca lechera. Revista Salud Pública y Nutrición. Vol 10.
- **Amant, D.C.; Valentin-Bon, I.E.; Jerse, A.E.** 2002. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by *Lactobacillus* species that are commonly isolated from the female genital tract. Infection and Immunity. 70: 7169- 7171.
- **Aroucheva, A.; Gariti, D.; Simon, M.; Shott, S.; Faro, J.; Simoes, J.; Gurguis, A.; Faro, S.** 2001. Defense factors of vaginal lactobacilli. American Journal of Obstetrics & Gynecology. 185: 275– 379.
- **Bakardjiev, A.I.; Theriot, J.A.; Portnoy, D.A.** 2006. *Listeria monocytogenes* traffics from maternal organs to the placenta and back. PLoS Pathogens. 2: e66.
- **Barboza-Corona, J.E.; Vázquez-Acosta, H.; Salcedo-Hernandez, R.; Bautista-Justo, M.** 2004. Probióticos y conservadores naturales en alimentos. Acta Universitaria. Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México. 14: 32- 38.
- **Barcia Hernandez, E.; Negro Alvarez, S.** 2002. Fundamentos de las interacciones Farmacodinámicas (I). Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. 68: 126- 172.
- **Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.** 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology. 45: 493- 496.
- **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** 1994, 9th Edition. Ed. by Holt, John G, Williams & Wilkins, Baltimore. pp 566- 568, 570.
- **Bortolussi, R.** 2008. Listeriosis: a primer. Canadian Medical Association Journal. 179: 795– 797.76- 1485.
- **Botina, B.A.; Zimmermann, B.H.; Vanegas M.L.** 2008. Partial characterization of antilisterial compounds produced by native lactic acid bacteria. Revista MVZ Córdoba. 13: 1476- 1485.

- **Callejo, R.; Prieto, M.; Martínez, C.; Aguerre, L.; Rocca, F.; Martínez, G.** 2008a. Manual de procedimientos. Aislamiento, identificación y caracterización de *Listeria monocytogenes*. Centro Regional de Referencia del WHO Global Salmonella Surveillance.
- **Callejo, R.; Prieto, M.; Martínez, C.; Aguerre, L.; Rocca, F.; Martínez, G.; Palmieri, O.** 2008b. Estudio mediante PCR múltiple de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados en Argentina. Revista Argentina de Microbiología. 40: 89- 92.
- **Charteris, W.; Kelly, P.; Morelli, L.; Collins, J.** 2001. Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic Lactobacilli. Journal of Food Protection. 64: 2002-2014.
- **Chávez, C.; Arias, M.L.** 2009. Caracterización de cepas de *Listeria monocytogenes* realizados a partir de queso fresco proveniente de diferentes zonas productoras costarricenses. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 59: 66- 70.
- **Cheung, V.; Sirkin, W.** 2009. Listeriosis complicating pregnancy. Canadian Medical Association Journal. 181: 821– 822.
- **Collado Amores, M.C.** 2004. Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico. Tesis Doctoral. Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia.
- **Conter, M.; Paludi, D.; Zanardi, E.; Ghidini, S.; Vergara, A.; Ianieri, A.** 2009. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology. 128: 497- 500.
- **Cossart, P.; Toledo-Arana, A.** 2008. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. Microbes and Infection 10: 1041- 1050.
- **Cribby, S.; Taylor, M.; Reid, G.** 2008. Vaginal microbiota and use of probiotics. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. ID 256490.
- **Daniele, M.B.;** 2009. Control biológico de las infecciones genitales por *Lactobacillus fermentum*. Tesis doctoral. UNRC. Marzo 2009.
- **Davis, J.A.; Jackson, C.R.** 2009. Comparative antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, and *L. welshimeri*. Microbial Drug Resistance. 15: 27- 32.
- **Di Pasquale, F.** 2009. Characterization of *Listeria* strains isolated from meat products. 14th Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology - University of Sassari Oristano.
- **Dolz, M.C.** 2008. Bacteriocins of probiotics. New biotherapeutical approaches: PINHE. Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria. 28: 20- 37.

- **Drider, D.; Fimland, G.; Hechard, Y.; McMullen, L.; Prevost, H.** 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70: 564– 582.
- **Eijsink, V.; Skeie, M.; Middelhoven, P.; Nes, I.** 1998. Comparative Studies of Class IIa Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3275– 3281.
- **Esteban, J.I.; Oporto, B.; Aduriz, G.; Juste, R.A.; Hurtado, A.** 2009. Faecal shedding and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain. *BMC Veterinary Research*. 5: 2. doi:10.1186/1746-6148-5-2.
- **Freitag, N.E.; Port, G.C.; Miner, M.D.** 2009. *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. 7: 623- 8.
- **Garcia Rodriguez, J.A.; García Sánchez, J.E.; Gómez Lus, M.L., Martínez Martínez, L.; Rodríguez Avial, C.; Vila, J.** 2001. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Cap 12. www.seimc.org
- **Gardiner, G.E.; Heinemann, C.; Bruce, A.W.; Beuerman, D.; Reid, G.** 2001. Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 but Not *L. rhamnosus* GG in the human vagina as demonstrated by randomly amplified polymorphic DNA. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 9: 92- 96.
- **Gillespie, I.A.; McLauchlin, J.; Little, C.L.; Penman, C.; Mook, P.; Grant, K.; O'Brien, S.J.** 2009. Disease presentation in relation to infection foci for non-pregnancy-associated human listeriosis in England and Wales, 2001 to 2007. *Journal of Clinical Microbiology*. 47: 3301– 3307.
- **Gillor, O; Etzion, A.; Riley, M.A.** 2008a. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81: 591– 606.
- **Gillor, O.; Vriezen, J.; Riley, M.** 2008b. The role of SOS boxes in enteric bacteriocin regulation. *Microbiology*. 154: 1783- 1792.
- **Gilmour, M. W.; Graham, M.; Van Domselaar, G.; Tyler, S.; Kent, H.; Trout-Yakel, K. M.; Larios, O.; Allen, V.; Lee, B.; Nadon, C.** 2010. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics*. 11: 120. doi:10.1186/1471-2164-11-120.
- **González Martínez, B.E.; Gómez Treviño, M.; Jiménez Salas, Z.** 2003. Bacteriocinas de probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*. 4(2).

- **Grayo, S.; Join-Lambert, O.; Desroches, M.C.; Le Monnier, A.** 2008. Comparison of the *in vitro* efficacies of moxifloxacin and amoxicillin against *Listeria monocytogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52: 1697– 1702.
- **Guías prácticas de la Organización mundial de Gastroenterología.** 2008. Probióticos y prebióticos. Organización Mundial de Gastroenterología.
- **Hammami, R.; Zouhir, A.; Hamida, J.B.** 2007. Bactibase: a new web-accessible database for bacteriocin characterization. *BMC Microbiology*. 7: 1471- 2180.
- **Huang, S.L.; Choub, Y.T.; Hsieh, Y.C.; Huang, Y.C.; Lin, T.Y.; Chiu; C.H.** 2010. Epidemiology and clinical characteristics of *Listeria monocytogenes* bacteremia in a Taiwanese medical center. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 43: 485– 490.
- **InfoStat (2008).** *InfoStat versión 2008*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- **Janakiraman, V.** 2008. Listeriosis in pregnancy: diagnosis, treatment, and prevention. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*. 1: 179– 185.
- **Katla, T.; Naterstad, K.; Vancanneyt, M.; Swings, J.; Axelsson, L.** 2003. Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to sakacin P, sakacin A, pediocin PA-1, and nisin. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 4431– 4437.
- **Kaushik, J.K.; Kumar, A.; Duary, R.K.; Mohanty, A.K.; Grover, S.; Batish, V.K.** 2009. Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. *PLoS One*. 4: e8099.
- **Kemperman, R.; Kuipers, A.; Karsens, H.; Nauta, A.; Kuipers, O.; Kok, J.** 2003. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 1589- 1597.
- **Kenneth Todar.** 2008. *Listeria monocytogenes*. Online Textbook of Bacteriology. <http://www.textbookofbacteriology.net/Listeria.html>. Fecha de acceso: julio del 2011.
- **Kirkham, C.; Berkowitz, J.** 2010. Listeriosis in pregnancy. Survey of British Columbia practitioners' knowledge of risk factors, counseling practices, and learning needs. *Canadian Family Physician*. 56: e158– e166.
- **Kiss, R.; Tirczka, T.; Szita, G.; Bernáth, S.; Csikó, G.** 2006. *Listeria monocytogenes* food monitoring data and incidence of human listeriosis in Hungary, 2004. *International Journal of Food Microbiology* 112: 71– 74.
- **Laciar, A.L.; Hsuoka, R.P.; Correa, S.M.; Miranda, A.M.; Centorbi, O.N.P.** 2000. Symptomatic hidrocephalus in a newborn infected with *Listeria monocytogenes*. *Brazilian Journal of Microbiol.* 31(1).

- **Laciar, A.L.; Vaca Ruiz, M.L.; Le Monnier, A.** 2011. Neonatal *Listeria*-meningitis in San Luis, Argentina: a three-case report. *Revista Argentina de Microbiología*. 43: 45- 47.
- **Larrain, D.; Abarzua, F.; Jourdan, F.; Merino, P; Belmar, C.; Garcia, P.** 2008. Infecciones por *Listeria monocytogenes* en mujeres embarazadas: experiencia del Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile. *Revista Chilena de Infectología*. 25: 336-41.
- **Larraín, D.; Carvajal, J.** 2008. Los aspectos fisiopatológicos y moleculares involucrados en el traspaso de *Listeria monocytogenes* a través de la barrera placentaria (una revisión bibliográfica). *Boletín de la escuela de medicina U.C., pontificia Universidad Católica de Chile* 33.
- **Le Monnier, A.; Autret, N.; Join-Lambert, O.F.; Jaubert, F.; Charbit, A.; Berche, P.; Kayal, S.** 2007. ActA is required for crossing of the fetoplacental barrier by *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*. 75: 950- 7.
- **Le Monnier, A.; Join-Lambert, O.F.; Jaubert, F.; Berche, P.; Kayal, S.** 2006. Invasion of the placenta during murine listeriosis. *Infection and Immunity*. 74: 663- 72.
- **Li, J.; Arouycheva, A.A.; Faro, S.; Chikindas, M.L.** 2005. Mode of action of lactocin 160, a bacteriocin from vaginal *Lactobacillus rhamnosus*. *Infectious Diseases and Obstetrics and Gynecology*. 13: 135- 140.
- **Lima, E.T.; Andreatti Filho, R.L.; Okamoto, A.S.; Noujaim, J.C.; Barros, M.R.; Crocci, A.J.** 2007. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. *Canadian Journal of Veterinart Research*. 71: 103– 107.
- **López, V.; Suárez, M.; Chico-Calero, I.; Navas, J.; Martínez- Suárez, J.V.** 2006. *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos?. *Revista Argentina de Microbiología*. 38: 224- 234.
- **Manual de la OIE sobre animales terrestres.** 2004. *Listeria monocytogenes*. Capítulo 2.10.14. pp 1222- 1237.
- **Makarova, K; Koonin, E.** 2007. Evolutionary Genomics of lactic acid bacteria. *The Journal of Bacteriology*. 189: 1199- 1208.
- **Mamma, C.; Aleo, A.; Romani, C.; Pellissier, N.; Nicoletti, P.; Pecile, P.; Nastasi, A.; Pontello, M.M.** 2009. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human listeriosis cases in Italy. *Journal of Clinical Microbiology*. 47: 2925– 2930.

- **Martinez, R.C.R.; De Martinis, E.C.P.** 2005a. Antilisterial activity of a crude preparation of *Lactobacillus sakei* bacteriocin and its lack of influence on *Listeria monocytogenes* haemolytic activity. *Food Control*. 16: 429- 433.
- **Martínez, R.C.R.; De Martinis, E.C.P.** 2005b. Evaluation of bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* against *Listeria monocytogenes* 1/2^a growth and hemolytic activity. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36: 83- 87.
- **Martinez, R.C.R.; Franceschini, S.A.; Patta, M.C.; Quintana, S.M.; Nunes, A.C.; Moreira, J.L.S.; Anukam, K.C.; Reid, G.; De Martinis, E.C.P.** 2008. Analysis of vaginal lactobacilli from healthy and infected Brazilian women. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 4539- 4542.
- **Martín, R.; Soberón, N.; Vanechoutte, M.; Vazquez Camino, F.; Suárez, J.E.** 2008a. Characterization of indigenous vaginal lactobacilli from healthy women as probiotic candidate. *Spanish Society for Microbiology*. 11: 261- 266.
- **Martín, R.; Soberón, N.; Vázquez, F.; Suárez, J.E.** 2008b. La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 26: 160- 167.
- **Marzocca, M.A.; Marucci, P.L.; Sica, M.G.; Álvarez, E.E.** 2004. Detección de *Listeria monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras ambientales de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de Bahía Blanca (Argentina). *Revista Argentina de Microbiología*. 36: 179- 181.
- **Mc Lean, N.; Rosenstein, I.** 2000. Characterization and selection of a *Lactobacillus* species to recolonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. *Journal of Medical Microbiology*. 49: 543- 52.
- **Mennickent, S.; Green, K.** 2009. Los probióticos y su utilidad terapéutica. *Ciencia Ahora*. 24: 31- 38.
- **Michanie, S.** 2004. *Listeria monocytogenes* La bacteria emergente de los 80. *Revista Ganados & Carnes*. Buenos Aires. Argentina. http://www.bpm-haccp.com.ar/index_archivos/pdf/Listeria-monocytogenes.pdf. Fecha de acceso: julio del 2011.
- **Monroy Dosta, M.C.; Castro Barrera, T.; Fernández Perrino, F.J.; Mayorga Reyes, L.** 2009. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS*. 73: 63- 72.
- **Mook, P.; O'Brien, S.J.; Gillespie, I.A.** 2011. Concurrent conditions and human listeriosis, England, 1999–2009. *Emerging Infectious Diseases*. 17: 38- 43.

- **Moreira Dos Santos, W.L.** 1993. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen cárnico. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- **Moroni, O.; Kheadr, E.; Boutin, Y.; Lacroix, C.; Fliss, I.** 2006. Inactivation of adhesion and invasion of food-borne *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Bifidobacterium* strains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 6894– 6901.
- **Morvan, A.; Moubareck, C.; Leclercq, A.; Herve´-Bazin, M.; Bremont, S.; Lecuit, M.; Courvalin, P.; Le Monnier, A.** 2010. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54: 2728– 2731.
- **Normas CLSI-NCCLS.** 2005. Tabla de interpretación de los resultados, método de difusión en agar. <http://www.brizuela-lab.com.ar/tablan.htm>. Fecha de acceso: Julio de 2011.
- **Nuñez, G.A.; Cayré, M.E.; Castro, M.P.; Garro, O.A.** 2007. Efectividad y modo de acción de Nisina sobre *Lactobacillus fructivorans*. *Mundo Lácteo y Cárnico*. Marzo-Abril 2007 pp 28-30.
- **Ocaña, V.S.; Nader-Macías, M.E.** 2004. Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria II: screening bacteriocin-producing strains with probiotic purposes and characterization of a *Lactobacillus* bacteriocin. *Methods in Molecular Biology*. 268: 347- 353.
- **Oevermann, A.; Zurbriggen, A.; Vandeveld, M.** 2010. Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: a zoonosis on the rise? *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 632513.
- **Papagianni, M.; Anastasiadou, S.** 2009. Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories*. 8: 3.
- **Pascual L.M.** 2004. Bacteriocinogenia en el Género *Lactobacillus*: características benéficas de lactobacilos de vagina humana. Tesis Doctoral, UNRC
- **Pascual, L.M.; Daniele, M.B.; Pájaro, C.; Barberis, I.L.** 2006. *Lactobacillus* species isolated from the vagina; identification, hydrogen peroxide production and nonoxynol-9 resistance. *Contraception*. 73: 78– 81.
- **Pascual, L.M.; Daniele, M.B.; Giordano, W.; Pájaro, M.C. y Barberis, I.L.** 2008a. Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Current Microbiology*. 56: 397- 402.
- **Pascual, L.M.; Daniele, M.B.; Ruiz, F.; Giordano, W.; Pájaro, C.; Barberis, I.L.** 2008b. *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potencial probiotic isolated from human vagina. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 54: 141- 148.

- **Ragon, M.; Wirth, T.; Hollandt, F.; Lavenir, R.; Lecuit, M.; Le Monnier, A.; Brisse, S.** 2008. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. PLoS Pathogens. 4: e1000146.
- **Ramaswamy, V.; Cresence, V.M.; Rejitha, J.S.; Lekshmi, M.U.; Dharsana, K.S.; Prasad, S.P.; Vijila, M.H.** 2007. Listeria- review of epidemiology and pathogenesis. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 40: 4- 13.
- **Ramírez Mérida, L.G.; Morón de Salim, A.; Alfieri Graterol, A.Y.; Gamboa, O.** 2009. Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de tomates (*Lycopersicum esculentum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) frescos en tres supermercados de Valencia. Venezuela. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 59: 318- 324.
- **Reid, G.; Hammond, J.** 2005. Probiotics: some evidence of their effectiveness. Canadian Family Physician. 51: 1487- 1493.
- **Rojas, C.; Vargas, P.** 2008. Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. Tecnología en Marcha. 21: 9- 16.
- **Rossi, M.L.; Paiva, A.; Tornese, M.; Chianelli, S.; Troncoso, A.** 2008. *Listeria monocytogenes* outbreaks: A review of the routes that favor bacterial presence. Revista Chilena de Infectología. 25: 328- 335.
- **Ruiz-Bolivar, Z.; Poutou-Piñales, R.A.; Carrascal-Camacho, A.K.** 2008. Resistencia antimicrobiana y a desinfectantes de *Listeria* spp. Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 6: 201- 218 /236.
- **Ruiz-Bolivar, Z.; Neuque-Rico, M.C.; Poutou-Piñales, R.A.; Carrascal-Camacho, A.K.; Mattar, S.** 2011. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* food isolates from different cities in Colombia. Foodborne Pathogens and Disease. 8: 913- 9.
- **Ruiz, F.O.; Gerbaldo, G.; Asurmendi, P.; Pascual, L.M.; Giordano, W.; Barberis, I.L.** 2009. Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. Current Microbiology. 59: 497- 501.
- **Samaniego Fernández, L.M.; Sosa del Castillo, M.** 2000. *Lactobacillus* spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Reseña. Centro de Estudios Biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”. Matanzas, Cuba. Editorial Universitaria del Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba. pp 3- 7, 9, 10- 12.
- **Sabet, C.; Toledo-Arana, A.; Personnic, N.; Lecuit, M.; Dubrac, S.; Poupel, O.; Gouin, E.; Nahori, M.A.; Cossart, P.; Bierne, H.** 2008. The *Listeria monocytogenes* virulence factor

InJ is specifically expressed *in vivo* and behaves as an adhesin. *Infection and Immunity*. 76: 1368- 78.

- **Schöbitz, R.; Ciampi, L.; Nahuelquin, Y.** 2009. *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la industria alimentaria. *AGRO SUR* 37: 1- 8.
- **Sgouras, D.; Maragkoudakis, P.; Petraki, K.; Martinez-Gonzalez, B.; Eriotou, E.; Michopoulos, S.; Kalantzopoulos, G.; Tsakalidou, E.; Mentis, A.** 2004. *In vitro* and *in vivo* inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 518- 526.
- **SigmaStat 3.5 de Windows.** Versión 2006 de Systat Software, Inc, Point Richmond, CA, USA
- **Suárez, M.M.; Bautista, R.M.; Almela, M.; Soriano, A.; Marco, F.; Bosch, J.; Martínez, J.A.; Bové, A.; Trilla, A.; Mensa, J.** 2007. Bacteriemia por *Listeria monocytogenes*: análisis de 110 casos. *Medicina Clínica (Barcelona)*. 129: 218- 21.
- **Tagg, J. ; Mc Given, R.** 1971. Assay system for bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*. 21: 943.
- **Tahara, T.; Kanatani, K.** 1997. Isolation and partial amino acid sequence of bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 61: 884- 886.
- **Tam, C.; Erebara, A.; Einarson, A.** 2010. Food-borne illnesses during pregnancy. Prevention and treatment. *Canadian Family Physician*. 56: 341– 343.
- **Taroco, R.; Seija, V.; Vignoli, R.** 2006. Método de estudio de la sensibilidad antibiótica. En: *Temas de bacteriología y virología médica*. 2º edición. Cap 36. pp.663- 671.
- **Tomas, M.S.; Otero, C.; Ocana, V.; Nader-Macias, E.** 2004 Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria I: Determination of hydrogen peroxide. *Methods in Molecular Biology*. 268: 337- 346.
- **Vallejo, M.; Olivera, N.; Sequeiros, C.; Marguet, E.** 2009. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from marine fish. *Analacta veterinaria*. 29: 19- 23.
- **Villalobos de Bastardo, L.B.; Martínez Nazaret, R.E.** 2006. Susceptibilidad antimicrobiana de *Listeria* spp. aisladas de alimentos durante el periodo 2003- 2004. Cumaná, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 26:31-34.
- **Vitas A.I.; Sánchez, R.M.; Aguado, V.; García-Jalón, I.** 2007. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food and clinical cases in Navarra, Spain. *Journal of Food Protection*. 70: 2402- 6.

-
- **Waldir, E.; Rychtera, M.; Melzoch, K.; Quillama, E.; Egoavil, E.** 2007. Production of lactic acid by *Lactobacillus plantarum* L10 on batch and continuous cultivation. *Revista Peruana de Biología*. 14: 271- 275.
 - **Yildiz, O.; Aygen, B.; Esel, D.; Kayabas, U.; Alp, E.; Sumerkan, B.; Doganay, M.** 2007. Sepsis and meningitis due to *Listeria monocytogenes*. *Yonsei Medical Journal*. 48: 433– 439.
 - **Zamora, J.M.; Cháves, C.; Arias, M.L.** 2006. Comparación del perfil de sensibilidad a antibióticos de cepas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. aisladas a partir de alimentos con cepas de origen clínico. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 56: 171- 174.
 - **Zapata, S.; Muñoz, J.; Ruiz, O.S.; Montoya, O.I.; Gutiérrez, P.A.** 2009. Isolation of *Lactobacillus plantarum* LPBM10 and partial characterization of its bacteriocin. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia*. 16: 75- 82.