

NISINA EN PRODUCTOS CÁRNICOS PARA INHIBICIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*: REVISIÓN DE TRABAJOS REALIZADOS EN LA ARGENTINA



INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes, bacteria Gram positiva, ubicua, psicrofílica, anaerobia facultativa, es el agente etiológico de la listeriosis. Esta enfermedad, que puede ser transmitida por alimentos, produce severos problemas de salud pública con incidencia de riesgo sanitario dramático, tanto en embarazadas -en las que puede provocar abortos prematuros, con septicemia o meningitis- como en adultos mayores, en los que puede generar meningitis y encefalitis.

La bacteria puede sobrevivir en condiciones relativamente extremas, tales como temperaturas bajas (mínima de -0,4°C) o altas (máxima de 45°C), bajo pH (4,4), actividad de agua reducida ($A_w = 0,92$) y alto contenido de sal. Debido a su carácter psicrofílico, es un patógeno de interés en los alimentos refrigerados como por ejemplo, los productos cárnicos. Una estrategia para su control -que se está empleando en diversos países para la elaboración de este tipo de productos- es la adición de nisina como complemento antibacteriano natural, a fin de reasegurar la inocuidad alimentaria y superar la tolerancia a la baja temperatura y eventuales descuidos en la manipulación higiénico-sanitaria del producto final antepackaging.

El objetivo de este trabajo es revisar los antecedentes referidos a la inclusión de la nisina en la legis-

Ricardo A. Sobol¹; Silvia Raffellini²;
Verónica Berges Soubies³

¹LAS-ICMSF. Universidad Tecnológica Nacional – UBA. Argentina.

²Universidad Nacional de Luján.
Luján, Buenos Aires, Argentina.

³Universidad Argentina de la Empresa.
Buenos Aires, Argentina.

lación alimentaria argentina y su utilización en el país como antimicrobiano natural para controlar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en los alimentos, con énfasis en productos cárnicos cocidos, ya sea mediante su agregado directo o a través de la sinergia con factores intrínsecos y/o extrínsecos de crecimiento para la formación de efectos barrera que ayuden a la inhibición de la multiplicación microbiana y a asegurar el consumo inocuo de alimentos.

Palabras clave: Nisina; productos cárnicos; *Listeria monocytogenes*.

ANTECEDENTES DE LA INCLUSIÓN DE LA NISINA EN LA LEGISLACIÓN ALIMENTARIA ARGENTINA

En la Argentina, la nisina ha sido aprobada para su uso en alimentos a partir de un brote de botulismo acaecido por el consumo de quesos fundidos en el año 1974 (de Lagarde, 1974; Briozzo *et al.*, 1983). La industria láctea fabrica quesos fundidos con el sabor propio de la mezcla de los distintos quesos que normalmente intervienen en su fabricación. Durante la elaboración, estos productos se calientan a una temperatura que no supera los 80°C, tratamiento térmico equivalente a una pasteurización, para producir el fundido de los quesos y el mezclado homogéneo. Posteriormente el queso fundido se envasa para su comercialización y se conserva bajo refrigeración.

Este tratamiento térmico en la fabricación alcanza sólo para eliminar las bacterias banales y las patógenas no esporuladas que pudieran estar en la mezcla. Si se descuida la temperatura de refrigeración

en la conservación de los quesos fundidos, en caso de haber bacterias esporuladas, estas pueden generar gases que deterioran la calidad del producto. Esto suele dar lugar a reclamos a las empresas elaboradoras por la formación de gas, que deteriora la calidad de presentación del producto, con hinchamientos y a veces con olores nauseabundos generados por bacterias del género de *Bacillus* spp y *Clostridium* spp resistentes a las temperaturas de pasteurización.

En la década del '70, en la Argentina la industria comenzó a desarrollar quesos fundidos con el agregado de sabores, vegetales desecados y vegetales frescos molidos que le daban un flavor especial, de acuerdo al vegetal ingresado a la mezcla inicial del queso a fundir. Así, por ejemplo, una importante empresa comenzó a fabricar queso fundido con el agregado de cebolla cruda molida. Algunas de las operaciones para su fabricación consistían en limpiar, moler la cebolla cruda, desinfectarla y luego introducirla a la mezcla de los quesos en fundición, homogeneizándola y pasteurizándola como se hacía normalmente. Dado que la pasteurización elimina parcialmente la carga microbiana vegetativa, pueden quedar viables esporas de microorganismos más resistentes al calor que implican algún riesgo sanitario.

Precisamente, esto ocurrió con una partida de esos quesos que se comercializó: se comenzaron recibir reclamos de personas que luego de consumirlos manifestaban señales de botulismo, como dificultad para tragar o hablar, boca seca, debilidad facial a ambos lados de la cara, visión borrosa o doble, párpados caídos, dificultad para respirar (ataca el diafragma), náuseas, vómitos y calambres abdominales y parálisis. Se originó un brote importante con una docena de casos fatales. Tanto la empresa como las autoridades de fiscalización sanitaria se volcaron de inmediato a una dificultosa recuperación de las unidades de estos quesos. En esa época, no estaban planificadas las medidas para el retiro rápido de alimentos en el mercado cuando se presentaran riesgos para la salud (recall) y los comercios eran un sinnúmero de almacenes pequeños y fiambrerías distribuidos por el país, antes del advenimiento de los supermercados.

La causa del problema estuvo en la fallida limpieza y eventual falta de adecuada desinfección de un bulbo que está debajo de la tierra con la posibilidad de arrastrar esporas de *Clostridium botulinum* a la mezcla de los quesos que luego de fundidos, no alcanzaron las temperaturas necesarias para destruir la presencia de las esporas de este microorganismo presente. El proceso térmico aplicado destruyó toda la flora microbiana no esporulada presente y dejó libre la posibilidad de

que las bacterias esporuladas empezaran a multiplicarse y generar toxina botulínica. Esto sucedió cuando se mantuvieron los quesos a temperaturas de refrigeración posiblemente no adecuadas, o sin refrigeración, y dentro de una masa de queso muy anaerobia, justamente por la cocción de su fabricación, germinaron las esporas y se transformaron en formas vegetativas. Con la actividad de agua muy baja, el pH neutro, los nutrientes presentes en el queso y la extrema falta de aire, las bacterias empezaron a multiplicarse y generar toxinas.

A raíz de este importante brote y ante la emergencia, Salud Pública de la Nación aceptó el agregado de la nisina como aditivo de conservación para proteger al consumidor al inhibir el crecimiento de esporas de *Clostridium botulinum* que pudieran estar contaminando este tipo de quesos, además de otros anaerobios esporulados que deterioraban la calidad.

En aquel momento, la Firma ESCO S.A. obtuvo la representación exclusiva de la firma internacional APLIN & BARRETT para la distribución de la nisina con la marca NISAPLIN® en la Argentina. Con el agregado de la nisina como conservador en los quesos fundidos se logra la interferencia necesaria para impedir el crecimiento de las bacterias esporuladas Gram positivas que pueden alterar la calidad de estos quesos y además inhibir el crecimiento de bacterias esporuladas patógenas como el *C. botulinum*.

El uso de la nisina en la industria alimentaria fue ratificado en los principales centros internacionales, generándose numerosos trabajos científicos sobre sus propiedades antibacterianas. Sus características también fueron reconocidas y definidas por el Comité Conjunto Experto de la Organización Mundial de la Salud (WHO) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).

En nuestro país, la nisina fue evaluada en el Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología - INFyB (actual Instituto Nacional de Alimentos - INAL) y luego considerada por la Comisión Nacional del Código Alimentario Argentino, que aprobó su inclusión en el mencionado código a través del Acta N° 50 del 24 de noviembre de 1983. Posteriormente esta acta fue protocolizada por el Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación con la Resolución N° 1.130 del 12 de julio de 1985, incorporando a la Nisina en el Código Alimentario Argentino.

LA NISINA EN EL CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO

En la Argentina, la nisina está permitida como conservador en diversos productos lácteos, según se consigna en varios Artículos del Capítulo VIII – Alimentos

TABLA 1 - Autorización de nisina en Código Alimentario Argentino

Resolución	Artículo	Producto	Límite
SPRyRS N° 33/2006, SAGPyA N° 563/2006 y GMC N° 079/94 (Mercosur)	553	Quesos (*)	0,00125 g / 100 g o ml
SPRyRS N° 33/2006, SAGPyA N° 563/2006 y GMC N° 136/96 (Mercosur)	640 bis	Queso en polvo	0,00125 g / 100 g o ml
SPRyRS N° 33/2006 y SAGPyA N° 563/2006	641	Quesos fundidos o procesado	0,00125 g / 100 g o ml
SPRyRS N° 33/2006, SAGPyA N° 563/2006 y GMC N° 134/96 (Mercosur)	641 bis	Requesón o Requeijão	0,00125 g / 100 g o ml

(*) m.a.h. quesos de muy alta humedad / a.h. quesos de alta humedad / m.h. quesos de mediana humedad / b.h. quesos de baja humedad.

Lácteos del Código Alimentario Argentino (Tabla 1).

ASPECTOS TÉCNICOS GENERALES DE LA NISINA

La nisina está reconocida internacionalmente como un agente antimicrobiano bien definido, muy efectivo, de baja toxicidad y una historia demostrada de uso inocuo. La nisina es producida por fermentación microbiana en la fase exponencial de crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, que es un reconocido cultivo iniciador en productos lácteos (Delves-Broughton & Gasson, 1994).

El uso de nisina está actualmente aprobado en varios países del mundo en una amplia variedad de productos alimenticios, incluido el queso y los productos del queso, postres lácteos, hortalizas y sopas en conserva, y productos de panadería. La eficacia del uso de nisina como agente antimicrobiano en los alimentos ha sido bien documentada. Gill & Holley (2003) probaron el efecto de diversos compuestos (solos o combinados), entre éstos la nisina y el nitrito de sodio, sobre el crecimiento de diversos cultivos de bacterias gram negativas y gram positivas de interés para productos cárnicos. Mientras que la nisina fue eficaz en la inhibición de bacterias ácido lácticas y *Listeria monocytogenes*, el nitrito no inhibió eficazmente el crecimiento de todas las cepas de bacterias ácido lácticas probadas y su efecto inhibitorio sobre la *Listeria* fue inferior a la nisina.

La nisina es efectiva contra bacterias gram positivas y se ha demostrado también que es efectiva contra bacterias gram negativas cuando se aplica como parte del enfoque de la tecnología de obstáculos (aplicación simultánea de varios procedimientos o barreras) para la inocuidad y preservación de los alimentos. La nisina inhibe los microorganismos alteradores, incluidas las bacterias de deterioro del ácido láctico, ayudando a prolongar el período de validez y

mantener la calidad del producto. También se utiliza cada vez más como una intervención primaria para desactivar o inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos en los alimentos, como *Listeria*, *Staphylococcus* y *Mycobacterium*, y las bacterias de formación de esporas *Bacillus* y *Clostridium*, ayudando a la inocuidad del alimento. La dosis de nisina necesaria para obtener el efecto deseado depende de varios factores, que incluyen el procesado y las condiciones de almacenamiento, las materias primas, la carga bacteriana y la formulación del producto a elaborar.

Sobre la base de los resultados obtenidos por numerosos investigadores, la nisina es una alternativa de interés tecnológico para ser empleada, por sus características químicas y por su potencial antimicrobiano, en la carne y productos cárnicos, incluidos los de aves de corral. Las bacterias gram positivas asociadas con los productos cárnicos procesados tienen (a diferencia de muchas bacterias gram negativas) una tolerancia relativamente alta de la actividad acuosa reducida, temperaturas de refrigeración, bajo pH y la presencia de sales emulsionantes de nitrato y fosfato. Además, mientras las temperaturas utilizadas en el procesado son suficientes para matar la mayoría de bacterias, no son efectivas contra esporas termorresistentes. Las carnes procesadas son también propensas a la contaminación posterior durante las operaciones de corte y envasado. El crecimiento de organismos de deterioro acorta la vida útil de los productos cárnicos procesados, incluso a temperaturas de refrigeración. Este tipo de productos son también especialmente susceptibles al rápido deterioro a consecuencia de un almacenamiento a temperaturas de abuso (mayores que la temperatura de refrigeración).

Bacterias de deterioro comunes en productos cárnicos procesados son, por ejemplo, las bacterias gram positivas de ácido láctico, que dan lugar a la producción de mucosidades de superficie (limo), decoloraciones, gases y olores desagradables. Sin embargo, la contaminación por *Listeria monocytogenes* -que tiene una alta resistencia al calor y además puede crecer a temperaturas de refrigeración pues es una bacteria psicrófila- es de mayor preocupación. La nisina, especialmente cuando se utiliza en combinación con otras tecnologías (efectos barrera), es efectiva a dosis bajas de uso para prevenir o retrasar el crecimiento de estas bacterias en los productos cárnicos procesados. Estudios demuestran que es efectiva para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* cuando persiste en el alimento después del procesamiento. Por tanto, el uso de nisina en estos alimentos mejora la protección contra el deterioro bacteriano, beneficiando a los consumidores, al comercio al por menor y a los fabricantes de alimentos, mediante la reducción de pérdidas de productos, aumento del período de vida útil y ayudando a la salud pública y a la inocuidad.

La nisina es una bacteriocina, un péptido que elimina o inhibe el crecimiento de otras bacterias circundantes, ayuda a los cultivos lácteos a sobrevivir en un entorno competitivo y tiene un estrecho espectro de actividad que afecta principalmente a células vegetativas y esporas de bacterias Gram positivas. Las bacteriocinas se diferencian de los antibióticos en su síntesis, modo de acción, espectro antimicrobiano, toxicidad y mecanismos de resistencia. La nisina ingerida es desactivada por enzimas digestivas de un modo similar a otras proteínas y péptidos alimenticios. En contraste con ello, se ha demostrado que, en las mismas condiciones, los antibióticos para uso terapéutico son más estables. Sobre la base de la revisión de los datos científicos disponibles, la Food Standards Australia New Zealand (FSANZ), máxima autoridad gubernamental de Australia y Nueva Zelanda en el área de alimentos, concluyó que: *“Dado que la nisina es un polipéptido que está sujeto a degradación proteolítica, no es probable que haya ninguna nisina activa biológicamente que pueda entrar en el colon y crear en el ser humano condiciones favorables para desarrollar resistencia bacteriana”*.

El mecanismo principal de la acción de la nisina contra células vegetativas implica daños a la membrana celular bacteriana debido a su interacción con sus componentes y también, en altas concentraciones, puede llegar a inhibir la síntesis de algunos componentes de la pared celular. La nisina forma poros en la membrana celular, produciendo un goteo de material

celular fuera de la célula. En bacterias esporuladas, la nisina inhibe la fase de crecimiento pos-germinativo. Esto sucede con esporas de *Clostridium botulinum* A, B y E. Su resistencia térmica también se reduce, ya que las esporas injuriadas por el calor se hacen más sensibles a la nisina. Se sugiere que el sitio activo en las esporas recién germinadas son los grupos sulfhidrilos de la membrana (Harris *et al.*, 1992).

En contraste con ello, por regla general, los antibióticos terapéuticos se unen a sitios objetivos específicos y trastornan el funcionamiento apropiado de la célula a nivel bioquímico. Con ese modo de acción hay mayores posibilidades de mutación genética y de desarrollo de resistencia. Hasta la fecha, en la bibliografía científica no hay informes de resistencia cruzada relacionada con la nisina y los antibióticos terapéuticos. Los expertos que evalúan esta cuestión señalan que esto se debe probablemente a las diferencias en el modo de acción entre antibióticos y nisina, por lo cual el desarrollo de resistencia antibiótica en la nisina no es de preocupación en los alimentos. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) manifiesta que esto se debe al mecanismo de acción diferente de la nisina y los antibióticos, específicamente por los distintos sitios de acción. Como se ha señalado, el desarrollo de resistencia antibiótica debida al uso de nisina en alimentos fue recientemente revisada en profundidad por la EFSA y la FSANZ, ambos órganos de autoridad han concluido que la nisina se puede utilizar y que el desarrollo de resistencia no es de preocupación en relación con este uso.

EXPERIENCIAS REALIZADAS EN LA ARGENTINA QUE PUEDEN RELACIONARSE CON LA APLICACIÓN DE NISINA EN MATRICES CÁRNICAS PARA LA INHIBICIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Como se ha reportado en secciones previas, en la Argentina la nisina es un aditivo de uso aprobado en Código Alimentario Argentino para la elaboración de quesos procesados. Por lo tanto, en esta instancia se ha dirigido la búsqueda de información hacia los trabajos realizados en el país en los cuales se haya estudiado la actividad de la nisina aplicada en productos cárnicos y en especial, su capacidad de inhibición contra *Listeria monocytogenes*, en vistas a la ampliación de su utilización a matrices alimenticias no lácteas. Se reportan además algunas experiencias realizadas en el país con nisina aplicada en otras matrices diferentes (se exceptúan los trabajos en matrices lácteas por el hecho de que en las mismas ya está suficientemente documentada su efectividad) y cuyos resultados podrían extrapolarse, con las debidas reservas, a las matrices cárnicas.

Existe a nivel internacional una prolífica bibliografía en la que se ha reportado la actividad antilisteria de nisina (Muriana, 1996; Cintas *et al.*, 1998) y sus limitaciones, como por ejemplo la naturaleza cepa-dependiente de la sensibilidad (Ukuku *et al.*, 1997) y la relativamente alta frecuencia con la que suele producirse el desarrollo de tolerancia y o resistencia a la bacteriocina (Harris *et al.*, 1991). Si bien estas características podrían considerarse una limitación para la aplicación de bacteriocinas, existen innumerables trabajos en los que se ha comprobado la efectividad antimicrobiana de la nisina en alimentos (información recopilada en revisiones como la recientemente efectuada por Gharsallaoui *et al.*, 2015), e incluso trabajos en los que se estudió el efecto inhibitorio en matrices cárnicas de la bacteriocina ya sea sola o en combinación con otros factores de estrés que complementen su acción y que potencien su actividad (Gharsallaoui *et al.*, 2015; Huq *et al.*, 2015).

Sin embargo, las experiencias realizadas en la Argentina pueden presentar como valor adicional el hecho de haber sido realizadas en matrices alimenticias originadas en el país, bajo sus propias condiciones ecológicas que pueden aportar características diferenciales a los productos, y con microbiotas específicamente adaptadas a estos nichos, que por tal motivo podrían presentar mayor resistencia ante los factores de estrés a los que son expuestas.

Si bien se han realizado en el país numerosos trabajos en los que se evaluó la capacidad inhibitoria de la nisina, son escasas las investigaciones que se han localizado hasta la fecha en las cuales se ha aplicado la bacteriocina en productos cárnicos de origen vacuno y en las que, además, el efecto microbiano sea evaluado sobre *Listeria monocytogenes*. Estos trabajos han sido realizados en forma preponderante en el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), Instituto del CONICET localizado en la ciudad de Tucumán, específicamente por el equipo de investigación que dirige la Dra. Graciela Vignolo. Por otra parte, otros grupos argentinos de investigación han evaluado la actividad de la nisina en matrices alimenticias no lácteas, aplicada sola o en combinación con diferentes factores de estrés o incluida como aditivo conservador en películas, y sus resultados pueden ser de utilidad para la industria cárnica. En ese sentido se destacan los trabajos realizados en otras instituciones argentinas como por ejemplo:

- Universidad de Buenos Aires (UBA), en el Dto. de Industrias (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - FCEyN) y el Dto. de Ingeniería Química (Facultad de Ingeniería - FI), localizados en Ciudad Universitaria, por

los equipos de investigación liderados por las Dras. Carmen Campos y Rosa Jagus, respectivamente.

- Universidad Nacional del Chaco Austral, por el equipo dirigido por el Dr. Oscar Garro.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), por el equipo dirigido por el Dr. Marcelo Masana, en el Instituto de Tecnología de Alimentos.
- Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI-Plásticos), por el equipo dirigido por la Dra. Patricia Eisenberg.

TRABAJOS REALIZADOS POR INVESTIGADORES DEL CERELA

El CERELA es una institución argentina de excelencia, líder en Latinoamérica en investigaciones referidas al estudio de las bacterias lácticas. Posee un importante banco de cepas autóctonas de bacterias lácticas, las cuales son estudiadas exhaustivamente para profundizar su conocimiento tanto de los aspectos básicos como sus posibilidades de aplicación industrial.

Los trabajos realizados por el equipo liderado por la Dra. Graciela Vignolo están focalizados en la utilización de cepas de bacterias lácticas aisladas en el país o sus metabolitos como agentes bioprotectores para prolongar la vida útil de productos cárnicos. Por consiguiente, la mayoría de sus trabajos se basan en empleo de cepas autóctonas de *Lactobacillus* sp. o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y de las bacteriocinas que ellas producen, y básicamente se utiliza nisina comercial en combinación con los productos autóctonos o bien como patrón de referencia para comparar poder inhibitorio.

En los primeros trabajos realizados, Castellano *et al.* (2001) evaluaron el efecto de la nisina (marca comercial Nisaplin®, 2500 UI/ml) sobre cinco cepas de *Listeria monocytogenes* inoculadas en medios de cultivo líquido (cargas bacterianas de 3 y 7 log/ml) a diferentes pH (5, 6 y 7) e incubados 24 horas a 20°C. En estas condiciones, se corroboró que la sensibilidad hacia la nisina era cepa-dependiente y se obtuvieron pérdidas de viabilidad que fluctuaron entre 1,5 – 1,8 log, con un máximo de 3 log a pH 5, lo cual demostró la existencia de células de *Listeria* que sobrevivieron al tratamiento con nisina.

Con el objeto de potenciar la actividad inhibitoria de la nisina y de superar la aparición de células de *Listeria monocytogenes* nisina-resistentes, se desarrollaron investigaciones en las cuales se combinó nisina comercial con otras bacteriocinas (Vignolo *et al.*, 2000) o con cultivos lácticos bioprotectores (Schillinger *et al.*, 2001). Vignolo *et al.* (2000) evaluaron la capacidad de

las bacteriocinas lactocin 705 (producida por la cepa autóctona *Lactobacillus casei* CRL 705), enterocin CRL 35 (producida por la cepa autóctona *Enterococcus faecium* CRL 35) y nisina (Nisaplin, 2000 UI/ml), en forma individual y combinadas, para inhibir el desarrollo de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* en medio de cultivo líquido y en sistemas cárnicos. En medio líquido, ante las bacteriocinas evaluadas en forma independiente, ambas especies de *Listeria* mostraron una disminución inicial del recuento de células viables seguido por el desarrollo de los sobrevivientes después de una hora de incubación. Una mayor actividad antilisteria se observó cuando se combinaron las bacteriocinas en pares, sobre todo si la nisina estaba incluida en el par. Cuando se evaluó el "mix" de las tres bacteriocinas, no se observaron sobrevivientes después de 24 h de incubación. Se obtuvieron resultados similares en sistemas cárnicos (carne fresca magra, picada asépticamente) inoculados con *L. monocytogenes* (105 células/g) e incubadas 24 h a 20°C. La nisina (dosis de 2000 UI/ml) aplicada individualmente tuvo efecto bacteriostático (las cargas microbianas se mantuvieron estables durante el período del ensayo), y tuvo efecto bactericida cuando se combinó con las otras dos bacteriocinas simultáneamente (lactocin 705 y enterocin CRL 35).

Con respecto a la combinación de nisina con cultivos bioprotectores, los trabajos realizados por la Dra. Vignolo con investigadores alemanes (Schillinger *et al.*, 2001) demostraron que en medio de cultivo líquido, cultivos bioprotectores bacteriocinogénicos nisina-resistentes constituidos por cepas de *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus sakei* (106 cel/ml), usados en combinación con nisina (Nisaplin, 100 UI/ml), fueron capaces de suprimir la proliferación de células de *Listeria* (carga original: 106 cel/ml) que sobrevivieron al tratamiento luego de siete días de incubación a 10°C (carga final 102 cel/ml). En el mismo trabajo, se utilizó tofú casero como sistema alimenticio modelo para evaluar el efecto inhibitorio contra *Listeria monocytogenes* (carga inicial: 102) de la nisina o su combinación con bacterias lácticas bacteriocinogénicas (carga inicial 106), durante el almacenamiento a 10°C por una semana. En los ensayos en los que se usó solamente nisina, se requirieron 2000 UI/ml para mantener en el límite de detección la carga de *Listeria*, mientras que en los ensayos con la aplicación combinada de nisina + cultivos lácticos fue suficiente la adición de 700 UI de nisina/ml, para obtener el mismo resultado. Por lo tanto, se consiguió un mayor efecto inhibitorio de *Listeria monocytogenes* con la aplicación de nisina y cultivos bioprotectores.

Bajo la misma hipótesis de trabajo, Peña *et al.* (2013) evaluaron el efecto de la aplicación de diferentes bacteriocinas y ácidos orgánicos sobre la vida útil de salchichas envasada al vacío y almacenadas a temperatura de abuso (10 °C) durante 36 días. Nisina y bacteriocinas producidas por las cepas autóctonas *Lactobacillus curvatus* CRL705 y *Lactobacillus sakei* CRL1862, solas o en combinación con ácido láctico y acético (2,5%) se aplicaron por inmersión en salchichas previamente inoculadas con *L. monocytogenes* (103 UFC/g). En los tratamientos con bacteriocinas + nisina + ácidos orgánicos se obtuvieron reducciones iniciales de 1,9 log CFU/g de *Listeria*, y ya no se encontraron células viables desde el día 6 hasta el final del período de incubación.

Trabajos del mismo estilo se han efectuado en productos de pesca y con otros cultivos bioprotectores. Por ejemplo Schöbitz *et al.* (2006) evaluaron la capacidad inhibitoria de tres sustancias antibacterianas producidas por bacterias lácticas frente a *Listeria monocytogenes* en medio de cultivo líquido y en salmón ahumado en frío envasado bajo vacío y almacenado a 3,5±0,5°C durante 20 días. Cuando se ensayó el efecto de lactocina 705 producida por *Lactobacillus curvatus* CRL705, nisina (NisaplinTM) y la sustancia tipo bacteriocina producida por *Carnobacterium piscicola* L103 en forma individual en medio TSB a 25°C durante 72 h se observó una cinética bactericida con lactocina 705 y nisina. La estrategia más eficiente fue la combinación de las tres bacteriocinas, que produjo una disminución de los viables a <10 células/ml. Por otra parte, la aplicación de las bacteriocinas en forma de spray a trozos de salmón mostró un efecto bacteriostático impidiendo el crecimiento de *L. monocytogenes* hasta los 15 días de almacenamiento. El uso de una combinación de bacteriocinas podría ser un mecanismo efectivo para reducir la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos como salmón ahumado en frío, limitando además la presencia de células resistentes a las bacteriocinas.

Otras líneas de investigación, en lugar de evaluar nisina, trabajaron con la aplicación en la matriz cárnica de cultivos autóctonos productores de nisina. Así por ejemplo, Vignolo *et al.* (2005) evaluaron el efecto de la aplicación de la cepa autóctona *Lactococcus lactis* CRL1109 productora de nisina en la extensión de vida útil de medias reses y recortes bovinos almacenados a 8°C. Si bien no se evaluó el efecto sobre *Listeria monocytogenes*, la aplicación de la cepa bacteriocinogénica en forma de spray a medias reses vacunas mostró una disminución en los microorganismos totales (0,74 y 0,71 ciclos log) y coliformes (1,12 y 1,48 ciclos log) para cuartos traseros y delanteros, respectivamen-

te, luego de seis días de almacenamiento y diez de faena, conservando sus características sensoriales. En recortes vacunos, la impregnación con el cultivo protector mostró un efecto bacteriostático sobre la microbiota total, retardando su deterioro en diez días, mientras que en cortes porcinos se observó una disminución de 2,9 log en la población de coliformes a los 15 días de almacenamiento a 8°C. Estos resultados podrían ser de interés para aprobar la inclusión de la nisina como aditivo en la industria cárnica. Resultados sumamente alentadores presentaron Castellano *et al.* (2008) en un congreso de microbiología que tuvo lugar en la Argentina. En su trabajo evaluaron la efectividad de inhibición de cultivos lácticos autóctonos bacteriocinogénicos *Lactobacillus curvatus* CRL705 y *Lactococcus lactis* CRL1109, usados como cultivos bioprotectores, y de sus bacteriocinas (lactocina 705 y nisina) contra *Listeria monocytogenes* (102 UFC/g) en hamburguesas almacenadas a 5°C. La adición de 106 UFC/g de cada cultivo bioprotector en forma individual a la carne produjo un efecto bacteriostático sobre *L. monocytogenes* durante la 72 h de almacenamiento a 5°C bajo condiciones aeróbicas. No se observó efecto sinérgico cuando ambos cultivos se aplicaron en forma conjunta, sin embargo, cuando se aplicaron sus bacteriocinas liofilizadas se observó la inhibición inmediata del microorganismo patógeno, lo cual demuestra su mayor efectividad en comparación con la aplicación de los cultivos bacterianos que la producen.

En el marco de los estudios con cultivos autóctonos, se están realizando también trabajos de investigación para evaluar la efectividad de bacteriocinas producidas por cepas autóctonas (entre ellas nisina) combinadas con agentes quelantes (EDTA-Na) para inhibición de *Escherichia coli* O157:H7, patógeno de interés en industria cárnica en la Argentina por su alta prevalencia en el país. Así, al ensayar la efectividad en medio de cultivo líquido, la nisina producida por la cepa autóctona *Lactococcus lactis* CRL1109 produjo la inactivación total de las cepas más sensibles de *E. coli* O157:H7 cuando se aplicó en forma combinada con 1000 mM de EDTA (cargas iniciales 5 log) y un descenso de la población de 2 log en las cepas más resistentes (Belfiore *et al.*, 2007). Sobre la base de estos resultados, se realizó un trabajo aplicando EDTA (48mM) y los cultivos bioprotectores *Lactococcus lactis* CRL1109 (productor de nisina) y *Lactobacillus curvatus* CRL705 (cargas: 107/g) en hamburguesas congeladas de carne vacuna picada, inoculadas con *Escherichia coli* O157:H7 (102 cel/g) y sometiénolas a temperatura de abuso (5°C) durante nueve días. Los tratamientos simultáneos con

cultivos bioprotectores y Na2EDTA produjeron una reducción de 1,62, 1,95, 3,41 y 3,90 log a tiempo de dos, tres, seis y nueve días, respectivamente, en *E. coli* O157:H7, comparados con el control. En coliformes autóctonos, con ese mismo tratamiento, la disminución fue de 1,55 log comparada con el control. Pero sin EDTA no hubo inhibición (Castellano *et al.*, 2011).

TRABAJOS REALIZADOS POR INVESTIGADORES DE LA UBA

En la UBA los grupos de investigación relacionados con la industria alimentaria que han realizado ensayos con nisina en matrices alimenticias no lácteas son los dirigidos por la Dra. Carmen Campos (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales) y por la Dra. Rosa Jagus (Facultad de Ingeniería). Los primeros trabajos realizados con nisina por la Dra. Campos estuvieron focalizados en sistemas que modelan el efecto de la aplicación de aderezos (emulsiones aceite en agua) para inhibición de microorganismos alteradores habituales en estos productos, como por ejemplo *Lactobacillus fructivorans* (Castro *et al.*, 2009). La investigación efectuada aporta datos referidos a la incidencia de los diferentes contenidos de grasa y de la estructura física de las emulsiones sobre la efectividad antimicrobiana de la nisina (Novasina®, 0,5g/kg), los cuales podrían ser extrapolados en alguna medida a la elaboración de emulsiones de matriz cárnica.

Más recientemente, el equipo de investigación liderado por la Dra. Campos ha trabajado sobre el efecto inhibitorio de la nisina (Nisaplin®, Danisco) sobre bacterias alterantes de los productos de pesca (*Pseudomonas* sp., *Shewanella putrefaciens* y *Lactobacillus plantarum*) y sobre *Listeria innocua* (como subrogante de *L. monocytogenes*), aplicada sola o en combinación con otros conservantes (quitosano, lactato de sodio y sorbato de potasio). Los valores de mínima concentración inhibitoria (MCI) de nisina, ensayados en caldo Mueller Hinton a pH 5,5, rondaron las 1000 UI/ml (*S. putrefaciens*: 1075 – *L. plantarum* y *L. innocua*: 1183) y no se observó efecto inhibitorio sobre *Pseudomonas* sp. ni efecto bactericida sobre ninguna de las cepas probadas a la mayor concentración ensayada (4300 UI/ml). Al combinar quitosano con nisina se observó un comportamiento sinérgico sobre la inhibición de *S. putrefaciens*. Sin embargo, el comportamiento fue aditivo sobre la inhibición de *L. innocua* y no hubo interacción con *L. plantarum* (Schelegueda *et al.*, 2012a).

Sobre la base de los resultados obtenidos en caldo, se realizaron ensayos en sistemas alimenticios. Cuando se aplicó un tratamiento combinado de nisina (3000 UI/g) y quitosano (300 ppm) a homogenatos de

filetes de merluza (*Merluccius hubbsi*), inoculados en ensayos independientes con *L. innocua* y *S. putresfaciens* (105 UFC/g) e incubados 72 h a 30°C, se observó una reducción de 2,3 log respecto al control en *L. innocua* y de aproximadamente 4 log en *S. putresfaciens* (Schelegueda *et al.*, 2012a). En otro trabajo se evaluó la aplicación de nisina (5000 UI/g) sola sobre la misma matriz alimenticia inoculada con *S. putresfaciens* (105 UFC/g), pero con pH ajustado a 5,5 y 6 e incubado a 4°C durante siete días. En esas condiciones, la nisina sólo tuvo efecto a pH 5,5, produciendo una reducción de 1 log en la población comparada con el control sin nisina durante el almacenamiento (Schelegueda *et al.*, 2012b).

Con respecto a los trabajos realizados por el equipo de la Dra. Jagus, se destacan aquellos en los cuales se evalúa el potencial sensibilizador de la nisina hacia células de *Listeria innocua* (Lehrke *et al.*, 2011), cuya exposición a la bacteriocina las hace más sensibles a la acción inhibidora del ácido láctico y del ácido cítrico, y aquellos realizados en colaboración con la Dra. L. Gerschenson, en los que se evalúa la acción antimicrobiana de la nisina incorporada a películas comestibles, las cuales podrían aplicarse a futuro en alimentos de matriz cárnica (Basch *et al.*, 2011; Carpenco *et al.*, 2011; Ollé Resa *et al.*, 2012, 2014).

TRABAJOS REALIZADOS EN OTRAS INSTITUCIONES ARGENTINAS

En otras instituciones del sistema científico-tecnológico argentino se han realizado trabajos con nisina cuyos resultados podrían extrapolarse a la industria cárnica, con las adecuaciones pertinentes.

En la Universidad Nacional del Chaco Austral, el equipo liderado por el Dr. Oscar Garro está a cargo de diversas líneas de investigación que involucran la utilización de nisina en distintos tipos de alimentos. Este grupo suele realizar trabajos en colaboración con la

Dra. G. Vignolo (CERELA) y la Dra. C. Campos (UBA). Entre estos trabajos se destacan el estudio del efecto de temperatura, pH y NaCl sobre la capacidad inhibitoria frente a *Lactobacillus fructivorans* (Herman *et al.*, 2009) y la determinación de la concentración mínima inhibitoria de nisina a aplicar para inhibir bacterias deteriorantes de embutidos cárnicos cocidos, aisladas a partir de productos regionales elaborados en la provincia de Chaco (Palavecino *et al.*, 2009).

En la Argentina se han realizado también trabajos en los cuales se estudió el efecto antimicrobiano de la nisina en tratamientos combinados con tecnologías físicas emergentes. En este sentido, se pueden señalar los trabajos realizados por el Dr. Miguel Galvagno, en los cuales se aplicaron nisina y campos eléctricos pulsantes para la inhibición de *E. coli* y de la microbiota alterante en cervezas (Galvagno *et al.*, 2007), y los realizados por el Dr. Marcelo Masana en el Instituto de Tecnología de Alimentos de INTA, en los cuales se evaluaron el efecto inhibitorio del tratamiento combinado de nisina y altas presiones hidrostáticas contra *Escherichia coli* O157:H7 (Cap *et al.*, 2014).

Por último, se destacan los trabajos que se están realizando en el INTI-Plásticos, área Micro y Nanotecnologías, por el equipo liderado por la Dra. Patricia Eisenberg, una de cuyas líneas de investigación se aboca al estudio y desarrollo de materiales con actividad biológica mediante la inclusión de nisina y otras bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, a ser empleados en envases activos como barrera para el control de contaminantes y patógenos en alimentos. Así, Correa *et al.* (2103) han logrado desarrollar películas nanocompuestas biodegradables activadas con nisina que poseen capacidad inhibitoria contra *Listeria innocua*, y que podrían emplearse como una barrera adicional para asegurar la inocuidad de los alimentos, entre ellos los productos de origen cárnico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Basch C., Carpenco J., Jagus R., Flores S. 2011. Individual and combined performance of nisin and potassium sorbate supported in tapioca starch edible films. 11th International Congress on Engineering and Food. Grecia.

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

Briozzo J., Amato de Lagarde E., Chirife J., Parada J. 1983. Clostridium botulinum type A growth and toxin production in media and process cheese spread. *Applied and Environmental Microbiology* 45:1150-1152

Cap M., Barrio Y., Sancho A., Ortigoza G., Sanow C., Vaudagna S., Masana M. 2014. Inactivación de *Escherichia coli* O157:H7 por el efecto combinado de altas presiones hidrostáticas y nisina en buffer PBS. MICROAL 2014. Brasil.

Carpenco J., Flores S., Jagus R.J. 2011. Películas comestibles como soporte de nisina y sorbato de potasio en forma individual o combinada: efecto del pH. XIII Congreso CYTAL – AATA. Argentina.

Castellano P., Belfiore C., Vignolo G. 2011. Combination of bioprotective cultures with EDTA to reduce *Escherichia coli* O157:H7 in frozen ground-beef patties. *Food Control* 22: 1461-1465.

- Castellano P., Blanco Massani M., Vignolo G. 2008. Growth control of *Listeria monocytogenes* in temperatura abused hamburgers stored of 5°C. IV Congreso Argentino de Microbiología General. Argentina.
- Castellano P., Farías M., Holzapfel W., Vignolo, G. 2001. Sensitivity variations of *Listeria* strains to the bacteriocins lactocin 705, enterocin CRL35 and nisin. *Biotechnology Letters*. 23: 605-608.
- Castro M., Rojas A., Campos C. Gerschenson L. 2009. Effect of preservatives, tween 20, oil content and emulsion structure on the survival of *Lactobacillus fructivorans* in model salad dressings, *LWT - Food Science and Technology* 42:1428-1434.
- Cintas L., Casaus P., Fernandez M., Hernández P.1998. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A, and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiology* 15:289-298.
- Correa J., Molina V., Blanco Massani M., Eisenberg P. 2013. Películas nanocompuestas biodegradables activadas con nisina. XIV Congreso Cytal. Argentina.
- de Lagarde E. 1974. Boletín informativo del Centro Panamericano de Zoonosis, vol. 1. Centro Panamericano de Zoonosis, Buenos Aires, Argentina.
- Delves-Broughton J., Gasson M. 1994. Nisin, In V.M. Dillon and R. G.Board (ed.), *Natural antimicrobial systems and food preservation*. CAB International, Wallingford, United Kingdom, p.99-131.
- Galvagno M., Gil G., Iannone L., Cerrutti P. 2007. Exploring the use of natural antimicrobial agents and pulsed electric fields to control spoilage bacteria during a beer production process. *Revista Argentina de Microbiología* 39: 170-176.
- Gharsallaoui A., Oulahal N., Joly C., Degraeve P. 2015. Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, DOI: 10.1080/10408398.2013.763765.
- Gill A., Holley R. 2003. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 °C. *International Journal of Food Microbiology* 80: 251-259.
- Harris L., Fleming H., Klaenhammer T. 1992. Developments in nisin research. *Food Research International* 25: 57-66.
- Harris L., Fleming H., Klaenhammer T. 1991. Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A and UAL500 to nisin. *Journal of Food Protection* 54: 836-840.
- Herman C., Maguna F., Garro O., Castro E. 2009. Efecto de temperatura, pH y NaCl sobre actividad de nisina frente a *Lactobacillus fructivorans*. *Journal of the Argentine Chemical Society* 97: 11-18.
- Huq T., Dang Vu K., Riedl B., Bouchard J., Lacroix M. 2015. Synergistic effect of gamma (•)-irradiation and microencapsulated antimicrobials against *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) meat. *Food Microbiology* 46: 507-514.
- Lehrke G., Hernaez L., Mugliaroli S., von Staszewski M., Jagus R. 2011. Sensitization of *Listeria innocua* to inorganic and organic acids by natural antimicrobials *LWT - Food Science and Technology* 44: 984-991.
- Muriana P.1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *Journal of Food Protection* 59 (Suppl): 54-63.
- Ollé Resa C., Jagus R., Gerschenson L. 2012. Biodisponibilidad de nisina y natamicina en películas de almidón de mandioca y su efecto sobre las propiedades físicas. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Argentina.
- Ollé Resa C., Gerschenson L., Jagus R., 2014. Natamycin and nisin supported on starch edible films for controlling mixed culture growth on model systems and Port Salut cheese. *Food Control* 44: 146-151.
- Palavecino N., Castro M., Garro O., Campos C. 2009. Determinación de la concentración mínima de nisina sobre flora alterante aislada de productos cárnicos cocidos, III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Argentina.
- Peña N., Castellano P., Perez Ibarreche M., Vignolo G. 2013. Bacteriocins and organic acids for the control postprocessing *Listeria monocytogenes* contamination of frankfurters. IV International Symposium on Lactic Acid Bacteria: Food, Health and Applications. Argentina.
- Schelegueda L., Gliemmo M., Campos C. 2012a. Antimicrobial synergic effect of chitosan with sodium lactate, nisin or potassium sorbate against the bacterial flora of fish. *Journal of Food Research* 1: 272-281.
- Schelegueda L., Gliemmo M., Campos C. 2012b. Efecto del pH sobre la actividad inhibitoria de quitosano y nisina contra *Shewanella putrefaciens* en homogenatos de pescado. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Argentina.
- Schillinger U., Becker B. Vignolo G., Holzapfel W. 2001. Efficacy of nisin in combination with protective cultures against *Listeria monocytogenes* Scott A in tofu, *International Journal of Food Microbiology* 71: 159-168.
- Schöbitz R., González J., Vignolo G., Molina L. 2006. Control de *Listeria monocytogenes* en salmón ahumado mediante la aplicación de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. *La Alimentación Latinoamericana* 265: 64-69.
- Ukuku D., Shelef L. 1997. Sensitivity of six strains of *Listeria monocytogenes* to nisin. *Journal of Food Protection* 60: 867-869.
- Vignolo G., Castellano P., Gentile F. 2005. Aplicación de cultivos bioprotectores en medias reses, recortes vacunos y porcinos. *La Industria Cárnica Latinoamericana* 25: 47-51.
- Vignolo G., Palacios J., Farías M., Sesma F., Schillinger U., Holzapfel W., Oliver G. 2000. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Current Microbiology* 41: 410-416.