

# ESTUDIO DEL EFECTO SINÉRGICO DE BACTERIOCINAS DE BACTERIAS LÁCTICAS COMBINADAS CON COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS FRENTE A *Listeria*.

Verdi<sup>1</sup>, MC; Castellano<sup>2</sup>, P.; Vignolo<sup>2</sup>, G.; Eisenberg<sup>1,3</sup>, P.; Blanco Massani<sup>1</sup>, M.  
<sup>1</sup>INTI Plásticos; <sup>2</sup>CERELA-CONICET; <sup>3</sup>3iA-UNSAM.  
mverdi@inti.gov.ar

## Introducción

A diferencia de muchas bacterias, *Listeria* puede crecer y multiplicarse en algunos alimentos refrigerados, causando severos brotes de infección alimentaria. En estudios previos de nuestro grupo de trabajo, se evaluaron combinaciones de nisina (Nis) con sorbato de potasio (SP), propionato de calcio (PC) y lactato de sodio (LS) mostrando efectos inhibitorios sinérgicos frente a *Listeria innocua* 7 [1].

Las bacteriocinas de bacterias lácticas tienen potencial como conservantes naturales de alimentos. *Lactobacillus curvatus* CRL705, cepa aislada de un producto cárnico fermentado [2], produce la bacteriocina conocida como "lactocina AL705" (AL705) con actividad antilisteria [3].

## Objetivo

Con el fin de reducir la cantidad de compuestos antimicrobianos utilizados para inhibir *Listeria*, el presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto de la adición de AL705 a las combinaciones previamente evaluadas y además, determinar los efectos inhibitorios (bacteriostáticos o bactericidas) de mezclas ternarias.

## Descripción

**Microorganismos y condiciones de cultivo.** *Listeria innocua* 7 (cedida por CERELA-CONICET) fue cultivada (18-24h) a 35°C en medio Mueller Hinton (MH). *Lactobacillus curvatus* CRL1579, bacteria derivada de *L. curvatus* CRL705 y capaz de producir lactocina AL705, fue cultivada en MRS a 30°C [4]. Hasta su uso las cepas fueron mantenidas a -20°C en 15% de glicerol.

**Agentes antimicrobianos.** Lactocina AL705 fue obtenida a partir del crecimiento de *Lactobacillus curvatus* CRL1579 y posterior precipitación con sulfato de amonio según lo informado por Blanco Massani y col. 2013 [5].

Se prepararon soluciones madre de AL705, nisina (Maxinis®, Argentina), sorbato de potasio (Inmobal Nutrer, Argentina), propionato de calcio (Inmobal Nutrer, Argentina) y lactato de sodio (Sigma, EEUU) en buffer fosfato estéril (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,067M, pH 5,4) en las concentraciones apropiadas para cada experimento.

**Combinaciones ternarias.** Para evaluar las interacciones originadas al agregar AL705 a las combinaciones de Nis+SP, Nis+PC y Nis+LS, se construyeron gráficos tridimensionales, donde cada eje representó la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano. De esta manera los gráficos presentaron dos ejes fijos (CIM AL705 y CIM Nis) y un eje variable compuesto por la CIM de X (X= SP, PC o LS). Se calculó el plano conformado por la CIM de cada compuesto (plano aditivo) y luego se evaluaron tres puntos para cada combinación por el método de difusión en agar, (i) un punto aditivo sobre el plano mencionado; (ii) un punto por debajo de este indicando interacción sinérgica; (iii) un punto por encima indicando antagonismo. Para evitar informar falsos positivos, en todas las composiciones ternarias las concentraciones de cada antimicrobiano evaluadas fueron menores a la CIM individual.

**Efecto inhibitorio.** Para determinar el modo de acción (bacteriostático o bactericida) de las combinaciones antimicrobianas, un inóculo conocido de *L. innocua* 7 (10<sup>6</sup> UFC/ml) se incubó en medio Muller Hinton (MH) líquido (pH 5,4, 35°C, 24h) en contacto con las soluciones antimicrobianas. Se tomó el recuento inicial y final del microorganismo sensible y la densidad óptica (turbidez). Se utilizó como control negativo de inhibición un tubo conteniendo buffer en lugar de las mezclas.

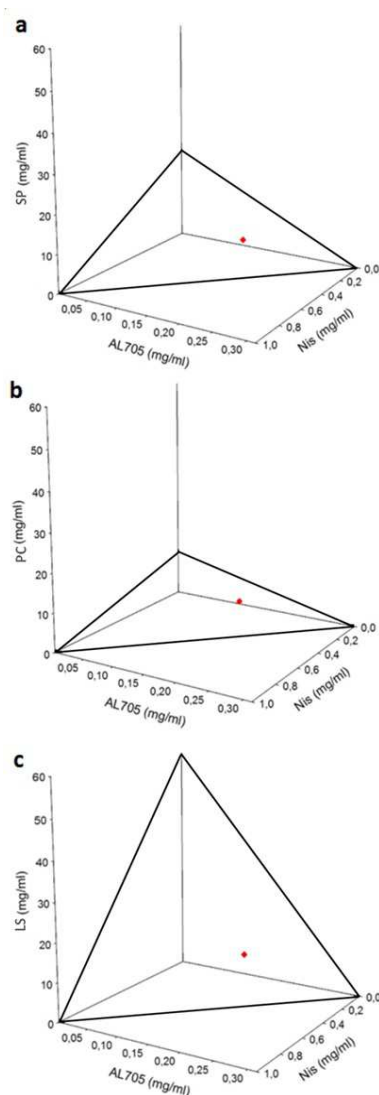
## Resultados

**Combinaciones ternarias.** Los resultados mostraron que la adición de lactocina AL705 a las combinaciones de Nis+X redujo las cantidades de antimicrobianos necesarias para inhibir el crecimiento de *L. innocua* 7 a concentraciones subinhibitorias. Los puntos

que representan las mezclas antimicrobianas estuvieron por debajo del plano aditivo, lo que sugiere un efecto sinérgico (Fig. 1a, b y c).

La interacción entre Nis y SP, PC o LS frente a *L. innocua* ha sido previamente determinada mostrando actividad inhibitoria sinérgica. En el presente trabajo, la presencia de lactocina AL705 aumentó el efecto sinérgico que ya se había observado.

La adición de AL705 a Nis+X permitió reducciones del 61,6% (AL705), 97,5% (Nis), 90% (LS), 90% (PC) y 91,7% (SP).



**Figura 1:** Gráficos tridimensionales obtenidos a partir de las combinaciones de antimicrobianos estudiadas. El plano aditivo se encuentra conformado por la CIM Nis vs CIM AL705 vs CIM X (con X= SP, PC, LS).

**Efecto inhibitorio.** La Tabla 1 muestra los recuentos bacterianos y la turbidez obtenidos después de 24h de incubación. Para dos de las mezclas ternarias (Nis+PC+AL705 y Nis+LS+AL705), la turbidez permaneció igual,

mientras que para la tercera (Nis+SP+AL705), se vio un muy pequeño aumento respecto al tiempo cero. En contraste, el tratamiento control mostró un notable aumento de la turbidez luego de la incubación. Esto, junto con la reducción del número de células viables en comparación con el control, indicó un efecto bactericida para todas las combinaciones ternarias estudiadas.

**Tabla 1:** Recuento (Log UFC/ml) y turbidez luego de la incubación (24h, 35°C) para las combinaciones ternarias con AL705 y el control.

Tratamiento	Turbidez (530nm)	Log UFC/ml	Turbidez (530nm)	Log UFC/ml
	0hs		24hs	
Control	0,01 ± 0,01	6,89 ± 0,96	0,50 ± 0,13	8,73 ± 0,31
Nis+SP+AL705	0,01 ± 0,01	NE	0,05 ± 0,01	ND
Nis+PC+AL705	0,01 ± 0,01	NE	0,01 ± 0,01	ND
Nis+LS+AL705	0,00 ± 0,01	NE	0,01 ± 0,01	ND

NE: no evaluado; ND: no detectado

## Conclusiones

En conclusión, los resultados presentados en este trabajo demostraron que AL705 combinado con nisina, sorbato de potasio, propionato de calcio o lactato de sodio presentan un efecto sinérgico y bactericida contra *L. innocua* 7. Estos resultados son prometedores para el diseño de estrategias para satisfacer las demandas de los consumidores por alimentos más seguros y saludables.

## Bibliografía

- [1] Verdi MC (2016). Efectos sinérgicos de nisina, sorbato de potasio, propionato de calcio y lactato de sodio frente a *Listeria innocua* y *Staphylococcus aureus*. XIV Congreso Argentino de Microbiología 2016.
- [2] Vignolo G (1993). Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. J Appl Bacteriol, 75, 344-349.
- [3] Hebert E (2012). Genome Sequence of the Bacteriocin-Producing *Lactobacillus curvatus* Strain CRL705. J Bacteriol, 194, 538-539.
- [4] Castellano P (2006). Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins. Letters in Applied Microbiology, 43(2), 194-199.
- [5] Blanco Massani M (2013). Adsorption of the bacteriocins produced by *Lactobacillus curvatus* CRL705 on a multilayer-LLDPE film for food-packaging applications. LWT-Food Science and Technology, 53(1), 128-138.