

**Evaluación del efecto antimicrobiano del
sobrenadante producido por *Lactobacillus
casei* en suero dulce de leche contra *Listeria
monocytogenes***

**Jonatan Abdiel Acosta Quiros
David Otoniel Ramón Ramón**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2013

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Evaluación del efecto antimicrobiano del
sobrenadante producido por *Lactobacillus
casei* en suero dulce de leche contra *Listeria
monocytogenes***

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingenieros en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Jonatan Abdiel Acosta Quiros
David Otoniel Ramón Ramón**

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2013

Evaluación del efecto antimicrobiano del sobrenadante producido por *Lactobacillus casei* en suero dulce de leche contra *Listeria monocytogenes*

Presentado por:

Jonatan Abdiel Acosta Quiros
David Otoniel Ramón Ramón

Aprobado:

Mayra Márquez, Ph.D.
Asesora Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria
Alimentaria

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Efecto antimicrobiano del sobrenadante producido por *Lactobacillus casei* en suero dulce de leche contra *Listeria monocytogenes*.

Jonatan Abdiel Acosta Quiros
David Otoniel Ramón Ramón

Resumen: Entre las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) está la listeriosis, infección causada por *Listeria monocytogenes*. Las bacterias ácido lácticas (BAL), presentan efectos antagónicos contra microorganismos patógenos. El suero dulce de leche es utilizado como sustrato para la producción de sustancias antimicrobianas en presencia de BAL. El objetivo de este estudio fue determinar y evaluar el efecto antimicrobiano contra *Listeria monocytogenes* generado por el sobrenadante producido por *Lactobacillus casei* en un medio de suero dulce puro y suplementado con caldo Man Rogosa Sharpe (MRS). La actividad antimicrobiana del sobrenadante de *L. casei* en suero contra *L. monocytogenes* se determinó mediante la técnica de difusión por gota. Para poder evaluar el efecto antimicrobiano se hicieron soluciones de sobrenadante y caldo Universal de Preenriquecimiento (UPE), se inocularon con *Listeria monocytogenes* a 4 Log₁₀ UFC/mL. Se realizaron recuentos en tiempos de 0 a 72 horas para ver el comportamiento de *L. monocytogenes* en las soluciones a temperaturas de 12 °C y tiempo de 0 a 48 horas para 35 °C. El sobrenadante suplementado a 35 °C resultó ser más efectivo, reduciendo los recuentos de *L. monocytogenes* por debajo del límite de detección (1 UFC/mL) después de cuatro horas. En el suero sin suplementar los recuentos fueron de 5 Log₁₀ UFC/mL después de cuatro horas bajo condiciones similares. El efecto inhibitorio del sobrenadante suplementado se pierde cuando la solución tiene un pH de 6.5. El suero dulce de leche suplementado con caldo MRS puede utilizarse para producir soluciones con actividad bactericida para control de *L. monocytogenes*.

Palabras clave: Bacterias ácido lácticas, bacteriocina, inhibición de crecimiento, Gram positivas y patógeno.

Abstract: Among the foodborne disease (FBD) is listeriosis, an infection caused by *Listeria monocytogenes*. Lactic acid bacteria (LAB) have antagonistic effect against pathogens. The sweet whey is used as substrate for the production of antimicrobial substances in the presence of LAB. The objective of this study was to determine and assess the antimicrobial effect against *Listeria monocytogenes* produced by the supernatant produced by *Lactobacillus casei* sweet whey pure and supplemented with Man Rogosa Sharpe broth (MRS). The antimicrobial activity of the supernatant of *L. casei* in whey against *L. monocytogenes* was determined by the diffusion agar technique. In order to assess the antimicrobial effect supernatant solutions were diluted with Universal pre-enrichment broth (UPE) and were inoculated with *Listeria monocytogenes* at 4 Log₁₀ CFU/mL. Counts were performed in times between 0 to 72 hours to see the behavior of *L. monocytogenes* in solutions at temperatures of 12 °C and times from 0 to 48 hours at 35 °C. The whey supernatant supplemented with MRS at 35 °C was more effective, reducing counts *L. monocytogenes* below the detection limit (1 CFU/mL) after four hours. In non supplemented whey counts were up to 5 Log₁₀ CFU/mL after four hours under similar conditions. The inhibitory effect of supernatant supplemented is lost when the solution has a pH of 6.5. The sweet whey supplemented with MRS broth can be used to produce solutions with bactericidal activity to control *L. monocytogenes*.

Keywords: Bacteriocin, Growth inhibition, lactic acid bacteria, pathogen.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	4
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
4. CONCLUSIONES.....	17
5. RECOMENDACIONES.....	18
6. LITERATURA CITADA	19
7. ANEXOS.....	21

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

	Cuadros	Página
1.	Diseño experimental de prueba preliminar.	5
2.	Diseño experimental para la evaluación del comportamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> con seis relaciones de sobrenadante a dos temperaturas.	6
3.	Diseño experimental para evaluar el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en presencia de sobrenadante de suero suplementado.	7
4.	Evaluación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes.	8
5.	Comportamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en sobrenadante producido por <i>Lactobacillus casei</i> en suero dulce a 12 °C.....	10
6.	Comportamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en sobrenadante producido por <i>Lactobacillus casei</i> en suero dulce a 35 °C.....	11
7.	Diámetro del halo de inhibición obtenido de <i>Lactobacillus casei</i> en suero suplementado con caldo MRS.....	13
8.	Comportamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en sobrenadante producido por <i>Lactobacillus casei</i> en suero dulce suplementado con 50% de caldo MRS a 12 °C.	15
9.	Comportamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en sobrenadante producido por <i>Lactobacillus casei</i> en suero dulce suplementado con 50% de caldo MRS a 35°C	16
	Anexos	Página
1.	Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> a 12 °C en seis tratamientos de las relaciones sobrenadante y UPE, utilizando el sobrenadante generado por <i>L. casei</i> en cuatro horas en medio de suero dulce sin suplementar.....	21
2.	Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> a 35 °C en seis tratamientos de las relaciones sobrenadante y UPE, utilizando el sobrenadante generado por <i>L. casei</i> en cuatro horas en medio de suero dulce sin suplementar.....	22
3.	Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> a 12 °C en cuatro tratamientos de las relaciones sobrenadante y UPE utilizando el sobrenadante generado por <i>L. casei</i> en 24 horas en suero suplementado con caldo MRS.....	22
4.	Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> a 35 °C en cuatro tratamientos de las relaciones sobrenadante y UPE, utilizando el sobrenadante generado por <i>L. casei</i> en 24 horas en suero suplementado con caldo MRS.....	23
5.	Consumo de proteínas y carbohidratos para la producción de metabolitos antimicrobianos (nisina).....	23
6.	Halos formados por la inhibición de los sobrenadantes.....	24
7.	Evaluación del crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> y <i>L. casei</i> en medio agar MRS, PCA y Oxford.....	24

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) son de gran importancia, por la alta incidencia de infecciones, intoxicaciones y tóxicas reportadas en los últimos años. Se han generado brotes de ETA's en varios países, ligado a consumo de alimentos de todo tipo, principalmente los mínimamente procesados (Rojas-Herrera y González-Flores 2006). La facilidad de los microorganismos patógenos de adaptarse a distintos medios y tener una tasa de crecimiento acelerado incrementan el riesgo de contaminación de alimentos (Zamudio *et al.* 2011).

Listeria monocytogenes es una bacteria patógena Gram positiva, psicrófila (Swapnali Guajarathi *et al.* 2008). Esta bacteria se encuentra distribuida en el ambiente de forma natural y es el agente patógeno causante de la listeriosis, enfermedad que puede causar la muerte en personas mayores, inmunocomprometidas y embarazadas, como consecuencia de la infección (Technical briefs 2004). *L. monocytogenes* es de gran interés y ha sido catalogada como el tercer patógeno más importante dentro de las ETA's en Estados Unidos (CDC 2011). Esta bacteria se ha encontrado en alimentos como: quesos de estructura blanda, mariscos, embutidos, mantequilla, vegetales y frutas (Technical briefs 2004). Entre el 2009 y 2011 se han reportaron 1651 casos de listeriosis relacionados al consumo de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* (CDC 2011).

Un antimicrobiano natural es una sustancia capaz de inhibir el crecimiento de algún microorganismo, puede ser extraído de plantas y producido como metabolito por microorganismos (Rodríguez Saucedo 2011). Los antimicrobianos naturales actúan de distintas formas: inhibiendo la biosíntesis de los ácidos nucleicos, degradando la membrana celular, creando enzimas metabólicas y modificando el pH por la producción de ácidos orgánicos, entre otros (Rodríguez Saucedo 2011).

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) han tenido trascendencia en los alimentos por los beneficios generados como: enriquecer la flora intestinal, producción de atributos sensoriales en alimentos y la producción de bacteriocinas. Las bacteriocinas son cadenas de péptidos producidas como metabolitos por BAL durante la fermentación, las bacteriocinas tienen efecto antimicrobiano principalmente sobre bacterias Gram positivas causando daño en la pared celular (Monroy Dosta *et al.* 2009).

Las bacteriocinas de acuerdo a su composición química están clasificadas en: Clase 1; Lantibióticos, péptidos de cadena corta, termo resistente, que trabajan sobre la membrana celular y se caracterizan por tener aminoácidos poco comunes (β -metil lantionina e dihidroalanina), estos aminoácidos son producto de variaciones posteriores a la traducción durante el proceso de replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN), ejemplo de este tipo de bacteriocinas es la nisina.

Clase 2: no Lantibióticos, estos péptidos tienen peso molecular variable, están formados por aminoácidos comunes y se subdividen en 3 clases:

Clase 2a: cadenas de péptidos con actividad ante *L. monocytogenes*, en este grupo de bacteriocina está la pediosina PA-1 y la sakacina P.

Clase 2b: cadenas formados de complejos de dos péptidos diferentes, que es necesario la presencia de ambos para tener una mejor actividad antimicrobiana, entre este grupo esta la lactococcina G, plantaricina EF, plantaricina JK.

Clase 2c: péptidos cortos que no tienen aminoácidos modificados, termoestables y requieren de un péptido que lo transporte, entre estos la divergicina A, acidicina B.

Clase 3: son péptidos de gran tamaño (>30 kDa) como la helveticina J, helveticina V, acidofilicina A, lactacinas A, lactacina B.” (González Martínez *et al.* 2003).

Los metabolitos producidos por las BAL son una alternativa natural para el control de bacterias patógenas. Entre ellos el metabolito más estudiado es la nisina; que es aceptado por Food and Drug Administration (FDA) con la categoría de Generalmente Reconocido como Inocuo (GRAS). La nisina puede ser utilizada como sustancia inhibitoria, sin efecto negativo en las personas al ser ingerido, debido a que se degradan durante la digestión (FDA 1988).

Es posible obtener nisina a partir de cepas de *Lactococcus lactis* sp. *lactis* aislada de queso, utilizando como medio de cultivo suero dulce suplementado (González Toledo *et al.* 2010). El suero dulce se utiliza en este tipo de medio como fuente de carbohidratos, lacto-albuminas lacto-globulinas y algunas vitaminas (Piña Suárez *et al.* 2011).

La industria de lácteos cada vez ha ido creciendo y con ellos sus desechos, que han sido fuente de contaminación por no darle el tratamiento adecuado (Cruz Terán *et al.* Sf). Una forma de utilizar el suero de leche es emplearlo como sustrato para las BAL, que pueden transformar el suero en metabolitos con efecto antimicrobiano aprovechables para desinfectar alimentos (Piña Suárez *et al.* 2011).

El género *Lactobacillus* es uno de los más estudiados por las características los beneficios que este presenta dentro del grupo de los probióticos y BAL, son bacilos Gram positivos, hetero-fermentativos facultativos, productores de compuestos como el ácido láctico y bacteriocinas como sakacina A, sakacina P, Curvacina A, Mesentericina Y105 entre otros (González Martínez *et al.* 2003). *Lactobacillus casei* tiene efecto antagónico (Gutiérrez Ramírez y Acosta Otálvaro 2008) al crecimiento de microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli*. (Scolari y Vescovo 2004). Esta bacteria al estar en un medio con los nutrientes adecuados para su crecimiento y metabolismo puede generar un extracto complejo con ácidos orgánicos, peróxidos y péptidos a los cuales se les atribuye la actividad bactericida (Gutiérrez Ramírez *et al.* 2005).

Existen métodos para la determinación del efecto que puede tener una sustancia y la susceptibilidad el microorganismo estudiado. Entre estos métodos están: difusión en agar dilución en agar, dilución en caldo, métodos automatizados y e-test (Stella Ramirez y Marin Castaño 2009).

El estudio se realizó con los siguientes objetivos:

Determinar el efecto antimicrobiano que tiene el sobrenadante obtenido de la fermentación de suero dulce por *Lactobacillus casei* contra *Listeria monocytogenes*.

Evaluar el efecto de la concentración, temperatura y tiempo de contacto en la actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* generada por el sobrenadante producido por *Lactobacillus casei* en medio de suero dulce.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, para ello se utilizaron los cultivos comerciales Choozit RA 21 LYO 125 DCU “R21” (contiene las cepas de *Lactococcus lactis* sp *lactis*, *Lactococcus lactis* sp *cremoris* y *Streptococcus salivarius* sp *termophilus*) y *Lactobacillus casei* 431[®] Juice, ambos de la casa comercial Christian Hansen. Se utilizó como medio de cultivo el caldo Man Rogosa Sharpe (MRS), suero dulce (pH 6.5 ± 0.2) de queso crema y de queso cheddar de la Planta de Lácteos Zamorano, pasteurizados (110 °C/7 minutos). El cultivo de *L. monocytogenes* fue proporcionada por el Laboratorio de Microbiología de Alimentos Zamorano (LMAZ), que estaba conservado en agar de soya tripticasa (TSA).

Estudios Preliminares. Con el objetivo de producir nisina, al inicio del estudio; se intentó aislar *Lactococcus lactis* a partir del cultivo láctico Choozit RA 21 LYO 125 DCU (R21). Se aislaron colonias por diferencia morfológica y se incubaron en un medio de suero dulce enriquecido. Se extrajeron los sobrenadantes por centrifugación a $7500 \times g$. durante 30 minutos a 4 °C, se realizaron pruebas de difusión en pozos; sin obtener resultados satisfactorios en inhibición de *L. monocytogenes*.

Para obtener el sobrenadante producido de las bacterias ácido lácticas presentes en el cultivo R21 y *Lactobacillus casei* se procedió de acuerdo al método descrito por González Toledo *et al.* (2010) con modificaciones. Brevemente, se inocularon 8 Log_{10} UFC/mL a partir de una solución de 0.1 g de cultivo de *L. casei* y del cultivo R21 en diez mililitros de buffer de fosfato. A partir de esta solución se inoculó en proporción de 1% (v/v) en suero dulce pasteurizado (110 °C/ 7 min) y en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS); se incubó a 35 °C durante cuatro horas, y fueron centrifugados a $7500 \times g$ durante 30 minutos a 4 °C.

Para determinar la inhibición generada por los sobrenadantes producidos por las bacterias del cultivo Choozit RA 21 LYO 125 DCU y *Lactobacillus casei* 431[®] Juice se implementó el método de difusión por gota (Şahingil *et al.* 2009), que consistió en colocar una gota de 10 µL del sobrenadante centrifugado sobre el medio base MRS Agar; una vez que secó la gota se llevó a incubación a 35 °C durante 24 horas, pasado el periodo de incubación se vertió una doble capa de Agar UPE, inoculado con *L. monocytogenes* (6 Log_{10} UFC/mL). La concentración para el inóculo de *L. monocytogenes* se obtuvo a partir de diluciones seriadas, de un caldo Universal de Pre enriquecimiento (UPE) que fue inoculado por una azada de colonias de *L. monocytogenes* presentes en Agar Soya Tripticasa + Extracto de Levadura (TSA + YE) que fue incubada durante 24 horas a 35 °C. A las gotas se les midió el halo de inhibición 24 horas después de ser incubados a 35 °C; se estimó el halo inhibitorio por la diferencia entre el diámetro de la gota y el diámetro del halo.

Con estos resultados se determinó la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes generados en el suero dulce de leche contra *L. monocytogenes*; para este estudio se realizaron tres repeticiones de los tratamientos y todo por duplicado con controles de suero dulce pasteurizado y caldo MRS estéril.

Diseño experimental para estudio preliminar. Se realizó un diseño completo al azar (DCA) con arreglo de tres factores $2 \times 2 \times 2$, dos cultivos lácticos, dos medios (MRS y suero dulce) y dos formas de obtener el sobrenadante (centrifugado y sin centrifugar) teniendo ocho tratamientos (cuadro 1). Se realizaron tres repeticiones con duplicado de cada tratamiento, se aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) con un nivel de significancia de $P < 0.05$ y separación de medias Tukey, para analizar los datos se utilizó el programa Sistema de Análisis Estadístico (SAS 9.3).

Cuadro 1. Diseño experimental de prueba preliminar.

Medio	Cultivo láctico	
	<i>Lactobacillus casei</i>	Cultivo R21
Caldo MRS	Lb. MRS	R21 MRS
Caldo MRS	Lb. MRS c	R21 MRS c
Suero dulce	Lb. S	R21 S
Suero dulce	Lb. Sc	R21 Sc

Lb: *Lactobacillus casei*; c: centrifugado; S: suero dulce, R21: cultivo láctico R21, MRS: caldo MRS.

Evaluación del comportamiento de *Listeria monocytogenes* en presencia de relaciones de sobrenadante: UPE. Se utilizó como medio de cultivo el suero dulce (de queso crema) pasteurizado a $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante siete minutos, se inoculó con 8 Log_{10} UFC/mL de *L. casei*, y se incubó durante cuatro horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una incubadora Fisher Scientific. Una vez incubado se extrajo el sobrenadante usando una centrífuga Thermo Scientific modelo Sorval ST16R, utilizando $7500 \times g$ durante 30 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se utilizó como diluyente y como testigo el caldo UPE; donde se realizaron seis tratamientos que contenían diferentes relaciones entre el sobrenadante extraído por centrifugación y el UPE. Se inoculó *L. monocytogenes* a una concentración de 4 Log_{10} UFC/mL para cada tratamiento, esta se obtuvo de un caldo UPE incubado con *L. monocytogenes*. Se evaluaron dos temperaturas 35 y $12\text{ }^{\circ}\text{C}$, y el comportamiento a través del tiempo, siendo los tiempos evaluados cero, cuatro, ocho, 24 y 48 horas para $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ y cero, cuatro, ocho, 24 y 72 horas para $12\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se realizaron recuentos para evaluar el comportamiento de *L. monocytogenes* en el tiempo; utilizando la técnica de vertido a partir de diluciones decimales seriadas (dos placas por tratamiento). Los medios utilizados fueron agar para métodos estándar (PCA) 12 mL por placa, debido a que fue el medio que permitió un mejor crecimiento de *L. monocytogenes* en pruebas preliminares (prueba ecométrica), con una doble capa de cinco mililitros de medio Oxford, medio diferenciador para *L. monocytogenes*. Cada recuento se realizó 24 horas después de haber sembrado e incubado a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Diseño experimental para la evaluación del comportamiento de *L. monocytogenes* con seis relaciones (sobrenadante de suero: UPE) a dos temperaturas. Se realizó un Bloques Completos al Azar (BCA), donde cada bloque estuvo determinado por la repetición. Los factores fueron temperatura (35 y 12 °C) y seis relaciones (sobrenadante: caldo UPE): 1:0Ne (Ne: este tratamiento fue ajustado a pH de 6.5 con NaOH 1N), 1:0, 2:1, 1:1, 1:2 y 0:1; para obtener un total de 12 unidades experimentales con cinco evaluaciones de comportamiento de *L. monocytogenes* en el tiempo (Cuadro 2). Se realizaron dos repeticiones; teniendo un total de 120 unidades analizadas.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con nivel de significancia de $P < 0.05$ y separación de medias LSMEANS. Se utilizó el programa Sistema de Análisis Estadístico (SAS 9.3).

Cuadro 2. Diseño experimental para la evaluación del comportamiento de *Listeria monocytogenes* con seis relaciones de sobrenadante a dos temperaturas.

Temperatura	Relaciones sobrenadante : caldo UPE					
	1:0Ne	1:0	2:1	1:1	1:2	0:1
12 °C	1SNe	1S	2S1U	1S1U	1S2U	1U
35 °C	1SNe	1S	2S1U	1S1U	1S2U	1U

S: sobrenadante, U: caldo UPE, Ne: pH modificado a 6.5.

Evaluación de la actividad antimicrobiana del suero dulce suplementado con caldo MRS.

Se evaluó la actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* de los sobrenadantes obtenidos a partir de suero dulce suplementado con caldo MRS inoculado con *L. casei*. Se evaluó el efecto antimicrobiano del suero centrifugado luego de cuatro y 24 horas de haber sido incubado con *L. casei*. El sobrenadante centrifugado se suplementó de caldo MRS al 25, 50 y 75%, se comparó estos tratamientos contra otros en los cuales se utilizó suero estéril y se suplementó con caldo MRS al 25, 50 y 75%, todos los tratamientos fueron llevados a incubación a 35 °C durante 24 horas.

Una vez terminado el periodo de incubación se tomó de la superficie de cada tratamiento los sobrenadantes y se colocó una gota de 10 µL en agar MRS, una vez que secó la gota, se colocó una capa de medio UPE agar inoculado con *L. monocytogenes* a 6 Log₁₀ UFC/mL. Se llevó a incubación a 35 °C durante 24 horas, se determinó el diámetro del halo por la diferencia entre el diámetro de la gota y el diámetro del halo utilizando una regla milimetrada.

Se evaluó el efecto antimicrobiano del sobrenadante obtenido del suero dulce suplementado, se diluyó en caldo UPE. Para esta evaluación, se utilizaron las siguientes relaciones (sobrenadante: caldo UPE) 1:0Ne con pH modificado a 6.5 usando NaOH 1N 1:0, 1:1, 0:1. Se evaluó el comportamiento del crecimiento de *L. monocytogenes* en cada

tratamiento, a los tiempos cero, cuatro, ocho y 24 horas, en las temperaturas de 12 y 35 °C; 72 horas para 12 °C. Se realizaron recuentos a partir de diluciones seriadas de cada tratamiento, se utilizó la técnica de vertido utilizando 12 mL por placa de PCA, cubierto por una capa de cinco mililitros de medio Oxford. Los recuentos se realizaron a las 24 horas después de haber sembrado e incubado a 35 °C.

Diseño experimental para la evaluación del comportamiento de *L. monocytogenes* con cuatro relaciones (sobrenadante de suero suplementado: UPE) a dos temperaturas.

Se realizó un Bloque Completo al Azar (BCA), donde cada bloque estuvo determinado por la repetición. Los factores fueron temperatura (35 y 12 °C) y cuatro relaciones (sobrenadante: caldo UPE): 1:0Ne (Ne: pH 6.5), 1:0, 1:1 y 0:1; para obtener un total de ocho unidades experimentales con cuatro evaluaciones de comportamiento de *L. monocytogenes* en el tiempo (Cuadro 3). Se realizaron dos repeticiones; teniendo un total de 64 unidades analizadas.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con nivel de significancia de P<0.05 y separación de medias LSMEANS. Se utilizó el programa Sistema de Análisis Estadístico (SAS 9.3)

Cuadro 3. Diseño experimental para evaluar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en presencia de sobrenadante de suero suplementado.

Temperatura °C	Relación sobrenadante : UPE			
	1:0N	1:0	1:1	0:1
12	1S:0U N	1S:0U	1S:1U	0S:1U
35	1S:0U N	1S:0U	1S:1U	0S:1U

S: sobrenadante, U: caldo UPE, N: pH modificado a 6.5

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó la interacción entre el medio de cultivo y el microorganismo en la generación de halos de inhibición. Se utilizó un DCA con arreglo factorial de $2 \times 2 \times 2$ siendo dos cultivo láctico y dos medios (MRS, suero dulce) centrifugados y sin centrifugar. En todos los tratamientos se observaron halos de inhibición; no se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) en el ANDEVA al hacer la separación de medias por Tukey para los medios de cultivos.

Al evaluar la interacción de los factores por LSMEANS del medio con el tipo de cultivo láctico, se encontró que el *L. casei* en caldo MRS genera mayor halo de inhibición. Este efecto se le atribuye a la carga de *L. casei* presente en el caldo que no fue centrifugado, esto permite que hayan mayor cantidad de células de *L. casei* en suspensión en el caldo. Al colocar la gota del caldo MRS con *L. casei* sin centrifugar en la base de agar MRS se genera una competencia directa de *L. casei* hacia *L. monocytogenes* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes.

Medio	Tratamientos	Diámetro del halo de inhibición
		Media \pm D.E. (mm)
Caldo MRS	Lb. MRS	17.08 \pm 0.010 ^a
Caldo MRS	Lb. MRS c	12.00 \pm 0.002 ^b
Suero dulce	Lb. S	15.08 \pm 0.080 ^b
Suero dulce	Lb. Sc	13.12 \pm 0.373 ^b
Caldo MRS	R21 MRS	12.50 \pm 0.444 ^b
Caldo MRS	R21 MRS c	14.82 \pm 0.051 ^b
Suero dulce	R21 S	14.27 \pm 0.014 ^b
Suero dulce	R21 Sc	12.32 \pm 0.958 ^b
CV: 17.43 %	R ² : 0.77	

CV: coeficiente de variación, R²: ajuste de modelo, Lb: *Lactobacillus casei*; c: centrifugado; S: suero dulce, R21: cultivo láctico R21, MRS: caldo MRS

Se considera como actividad inhibitoria a todos los halos mayores a dos milímetros (Gutiérrez Ramírez *et al.* 2005), los halos esperados para este experimento eran mayores a 10 mm de diámetro. A partir de estos resultados se eligió el *L. casei* por ser un cultivo puro, que genera el sobrenadante de suero centrifugado con mayor efecto inhibitorio contra *L. monocytogenes* después del periodo de incubación de cuatro horas a 35 °C. El cultivo R21 presentó halos de inhibición en todos los tratamientos, sin embargo no se

eligió para evaluar el crecimiento de *L. monocytogenes* en presencia de sobrenadante debido a que se dificulta identificar la cepa que produce el efecto inhibitorio.

En los estudios de sobrevivencia de *L. monocytogenes* en el sobrenadante a diferentes concentraciones y temperaturas de almacenamiento, la concentración inicial de *L. monocytogenes* para todos los tratamientos fue de 4 Log₁₀ UFC/mL. No se presentó efecto inhibitorio inmediato en ninguno de los tratamientos, no se esperaba tener efecto bactericida inmediato de los sobrenadantes, con los recuentos en el tiempo cero se quiso corroborar que la carga inoculada de *L. monocytogenes* fue consistente para todos los tratamientos.

A 12 °C luego de cuatro horas de incubación no se presentó crecimiento significativo de *L. monocytogenes* en los tratamientos, los recuentos se mantuvieron en 4 Log₁₀ UFC/mL (Cuadro 5). No se observó diferencia significativa entre los tratamientos (P<0.05); se esperaba que por lo menos uno de los tratamientos presentara efecto bactericida; el efecto bacteriostático observado se le atribuye a la temperatura de refrigeración debido a que aumenta el tiempo de generación del patógeno.

Durante todos los recuentos realizados a las ocho y las 24 horas a 12 °C no se presentó diferencia significativa entre tratamientos (P<0.05). Se observó crecimiento de un logaritmo entre ocho y 24 horas; se esperaba que al menos uno de los tratamientos tuviese efecto bactericida o bacteriostático; estos resultados no permiten reflejar el efecto antimicrobiano observado en la prueba preliminar de difusión por gota. A las 72 horas se observó diferencias entre los tratamientos (P<0.05), se esperaba que hubiese diferencia entre tratamientos. Las diferencias observadas no se pueden atribuir a los sobrenadantes obtenidos, porque la presencia de nutrientes es distinta en los tratamientos; para poder atribuir efecto bactericida o bacteriostático se necesitó que los tratamientos presentaran diferencias en las primeras horas evaluadas.

Cuadro 5. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* en sobrenadante producido por *Lactobacillus casei* en suero dulce a 12 °C.

Tratamientos	Tiempo (horas)				
	0	4	8	24	72
Medios de dilución	Media ± D.E. (Log ₁₀ UFC/mL)	Media ± D.E. (Log ₁₀ UFC/mL)	Media ± D.E. (Log ₁₀ UFC/mL)	Media ± D.E. (Log ₁₀ UFC/mL)	Media ± D.E. (Log ₁₀ UFC/mL)
1Ne	4.48 ± 0.36 ^{a(Z)}	5.02 ± 0.86 ^{a(Z)}	4.74 ± 0.08 ^{a(Z)}	5.89 ± 0.63 ^{a(Y)}	6.57 ± 1.12 ^{b(Y)}
1S	4.63 ± 0.07 ^{a(YZ)}	5.31 ± 1.03 ^{a(Y)}	4.62 ± 0.13 ^{a(Y)}	5.78 ± 0.18 ^{a(Y)}	5.45 ± 1.05 ^{b(Z)}
2S1U	4.43 ± 0.07 ^{a(Z)}	4.88 ± 0.32 ^{a(Z)}	4.60 ± 0.10 ^{a(Z)}	6.49 ± 0.37 ^{a(Y)}	6.69 ± 0.32 ^{b(Y)}
1S1U	4.68 ± 0.10 ^{a(Z)}	4.78 ± 0.63 ^{a(Z)}	4.93 ± 0.20 ^{a(Z)}	6.64 ± 0.43 ^{a(Y)}	7.82 ± 0.08 ^{a(X)}
1S2U	4.62 ± 0.01 ^{a(Z)}	4.94 ± 0.41 ^{a(Z)}	4.68 ± 0.04 ^{a(Z)}	6.79 ± 0.54 ^{a(Y)}	8.30 ± 0.32 ^{a(X)}
1U	4.67 ± 0.12 ^{a(Z)}	4.59 ± 0.26 ^{a(Z)}	4.84 ± 0.07 ^{a(Z)}	6.59 ± 0.54 ^{a(Y)}	8.09 ± 0.01 ^{a(X)}
CV: 6.70 %	R ² : 0.96				

UFC: Unidades Formadoras de Colonia, D.E.: Desviación estándar, ^{a, b, y c}: Medias seguidas con diferente letra minúscula en cada columna son significativamente diferentes (P<0.05), ^{w-x-y-z}: Medias con diferente letra mayúscula son significativamente diferentes por filas para medidas repetidas en el tiempo (P<0.05), C.V.: Coeficiente de Variación, R²: Ajuste de modelo; 1Ne: sobrenadante con pH de 6.5, 1S : sobrenadante sin diluir, 2 S1 U: dos partes de sobrenadante y una de caldo UPE, 1S 1U: una parte de sobrenadante y una de caldo UPE, 1S2U: una parte de sobrenadante y dos de caldo UPE, 1 U: caldo UPE (testigo).

Cuadro 6. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* en sobrenadante producido por *Lactobacillus casei* en suero dulce a 35 °C

Tratamientos	Tiempo (horas)				
	0	4	8	24	48
Medios de dilución	Media ± D.E. (Log ₁₀ UFC/mL)	Media ± D.E. (Log ₁₀ UFC/mL)	Media ± D.E. (Log ₁₀ UFC/mL)	Media ± D.E. (Log ₁₀ UFC/mL)	Media ± D.E. (Log ₁₀ UFC/mL)
1Ne	4.48 ± 0.36 ^{a(Z)}	5.57 ± 0.23 ^{ab(Y)}	6.30 ± 0.03 ^{a(Y)}	7.49 ± 0.63 ^{a(Y)}	6.10 ± 0.25 ^{b(Y)}
1S	4.63 ± 0.07 ^{a(Z)}	5.84 ± 0.87 ^{ab(Y)}	6.18 ± 0.20 ^{a(Y)}	6.48 ± 0.68 ^{a(Y)}	4.60 ± 0.15 ^{c(Z)}
2S1U	4.43 ± 0.00 ^{a(Z)}	6.21 ± 0.82 ^{a(Y)}	6.89 ± 0.26 ^{a(Y)}	7.15 ± 0.52 ^{a(Y)}	4.10 ± 0.01 ^{c(Z)}
1S1U	4.68 ± 0.10 ^{a(Z)}	6.20 ± 0.87 ^{a(Y)}	7.01 ± 0.03 ^{a(X)}	7.48 ± 0.28 ^{a(X)}	4.15 ± 0.20 ^{c(Z)}
1S2U	4.62 ± 0.01 ^{a(Z)}	5.96 ± 0.66 ^{ab(Z)}	7.27 ± 0.03 ^{a(Y)}	7.62 ± 0.24 ^{a(Y)}	5.18 ± 0.40 ^{c(Z)}
1U	4.67 ± 0.10 ^{a(Z)}	6.20 ± 0.86 ^{a(Y)}	7.13 ± 0.13 ^{a(X)}	7.94 ± 0.13 ^{a(W)}	7.98 ± 0.20 ^{a(W)}
CV: 6.70 %	R ² : 0.96				

UFC: Unidades Formadoras de Colonia, D.E.: Desviación estándar, ^{a, b, y c}: Medias seguidas con diferente letra minúscula en cada columna son significativamente diferentes (P<0.05), ^{w-x-y-z}: Medias con diferente letra mayúscula son significativamente diferentes por filas para medidas repetidas en el tiempo (P<0.05), C.V.: Coeficiente de Variación (6.70%), R²: Ajuste de modelo, 1Ne: sobrenadante con pH de 6.5, 1S : sobrenadante sin diluir, 2 S1 U: dos partes e sobrenadante y una de caldo UPE, 1S 1U: una parte de sobrenadante y una de caldo UPE, 1S 2U: una parte de sobrenadante y dos de caldo UPE, 1 U: caldo UPE (testigo).

A 35 °C durante 24 horas no se observó diferencia significativa ($P < 0.05$) entre tratamientos; aumentó la concentración a 7 Log₁₀ UFC/mL. Este comportamiento no refleja la actividad antimicrobiana que se observó en la prueba de difusión por gota. A las 48 horas se observan diferencias en el crecimiento de *L. monocytogenes*, se atribuye dicha diferencia a las bacterias de *L. casei* que están presentes en el sobrenadante y ejercen el efecto inhibitorio contra *L. monocytogenes*. Otra causa de la discrepancia de resultados puede atribuirse a la disponibilidad de nutrientes en solución, la cual también afecta el crecimiento de *L. monocytogenes* debido a que no es la misma concentración de nutrientes en todas las soluciones (Cuadro 6). Para poder identificar que factor causa esta disminución de *L. monocytogenes* en las soluciones es necesario hacer recuento de *L. casei* que estén en solución, evaluar temperatura o concentración de nutrientes en la solución, así como los cambios de pH y acidez en las soluciones a través del tiempo.

La producción de metabolitos con actividad antimicrobiana como la nisina, se ve afectada por la ausencia de nutrientes de origen proteico como las vitaminas que actúan como coenzimas en los procesos metabólicos. El suero dulce es una rica fuente de lactosa, pero la limitada presencia de nutrientes proteicos necesarios, afecta la producción de los metabolitos que puedan estar generando el efecto antimicrobiano (Piña Suarez *et al.* 2011).

Una condición que no se logró replicar en este experimento fue el periodo de incubación de 24 horas a 35 °C que recibió la gota que fue colocada en la base de agar MRS, durante la prueba de difusión por gota. Es posible que los metabolitos con actividad antimicrobiana observada en los halos de inhibición se generaran durante este periodo.

A causa de no poder reflejar el efecto inhibitorio observado en la prueba de difusión por gota; se evaluó el efecto antimicrobiano de los sobrenadantes obtenidos a partir del suero dulce enriquecido con MRS inoculado con *L. casei* e incubado durante 24 horas a 35 °C. Se evaluó el efecto a través de la prueba de difusión por gota; se observó la formación de halo de inhibición del sobrenadante. Esta prueba se realizó con la modificación de que el vertido de la doble capa con inóculo de *L. monocytogenes*, (6 Log₁₀ UFC/mL) se hizo una vez que la gota se hubo fijado sobre la base de agar MRS aproximadamente 20 minutos después de haber colocado la gota. Se observó que el suero dulce suplementado, tiene mayor efecto inhibitorio cuando se suplementa con 50% de caldo MRS (Cuadro 7).

Cuadro 7. Diámetro del halo de inhibición obtenido de *Lactobacillus casei* en suero suplementado con caldo MRS.

% de suplementación de suero con caldo MRS	Diámetro del halo en milímetros Media ± D.E.
Suero 25 % MRS	0.00 ± 0.00
Suero 50 % MRS	4.75 ± 0.02
Suero 75 % MRS	4.00 ± 0.05
100 % MRS	3.50 ± 0.03

Se observó que el suero dulce suplementado, tiene mayor efecto inhibitorio cuando se suplementa con 50% de caldo MRS.

La concentración inicial de *L. monocytogenes* para todos los tratamientos en esta fase de suero suplementado fue de 4 Log₁₀ UFC/mL, no se presentó efecto inhibitorio inmediato en ninguno de los tratamientos, siendo el mismo comportamiento de la fase de suero sin suplementar; no se esperaba tener efecto bactericida inmediato de los sobrenadantes, con los recuentos en el tiempo cero.

A 12 °C luego de cuatro horas de incubación no se presentó crecimiento significativo de *L. monocytogenes* en los tratamientos; no se esperaba que por lo menos uno de los tratamientos presentara efecto bactericida. El efecto bacteriostático observado se le atribuye a la temperatura de refrigeración porque se aumenta el tiempo de generación del patógeno (Cuadro 8). En los recuentos hechos a las ocho horas en 12 °C, no se presentó diferencia significativa (P < 0.05) entre tratamientos ni a través del tiempo; mientras que a las 24 horas se observó diferencia significativa entre tratamientos habiendo una reducción de hasta 2 Log₁₀ UFC/mL en el tratamiento 1S (sobrenadante sin diluir) y hubo crecimiento significativo a través del tiempo en el tratamiento control 1U (caldo UPE); se esperaba que diera este comportamiento en crecimiento entre ocho y 24 horas.

A las 72 horas al hacer los recuentos hubo diferencia significativa entre tratamientos siendo el mejor 1S (sobrenadante sin diluir) mostrando un efecto bactericida y 1S1U (sobrenadante: caldo UPE) teniendo un efecto bacteriostático. Se esperaba que al menos uno de los tratamientos tuviese efecto bactericida o bacteriostático; en esta fase experimental si se permite observar claramente el efecto bactericida que se obtuvo por los halos generados en los preliminares.

A las cuatro horas a 35 °C, se observó diferencia significativa entre los tratamientos (P<0.01); siendo el tratamiento 1S (sobrenadante sin diluir) con efecto bactericida, el tratamiento 1S1U (sobrenadante: caldo UPE) fue bacteriostático. Se esperaba que se al menos uno mostrara efecto bactericida (cuadro 9).

A las ocho horas de inoculado *L. monocytogenes* en los tratamientos se observó que hay diferencia significativa entre los tratamientos (P<0.05) mostrándose el tratamiento 1S

(sobrenadante sin diluir) como bactericida, 1S1U (sobrenadante: caldo UPE) como bacteriostático y los otros tratamientos con crecimiento a través del tiempo. Después de 24 horas los recuentos de *L. monocytogenes* en el tratamiento 1S (sobrenadante sin diluir) se encontraron por debajo del límite de detección 1 UFC/mL), no así para el testigo utilizado 1U (caldo UPE) donde el crecimiento alcanzado fue hasta 8 Log₁₀ UFC/mL.

El sobrenadante neutralizado (1Ne) no presentó efecto antimicrobiano significativo ($P < 0.05$) contra *L. monocytogenes*; El comportamiento de *L. monocytogenes* en el sobrenadante neutralizado fue similar al testigo de caldo UPE (1U). El tratamiento de sobrenadante neutralizado (1Ne) se utilizó con el propósito de evaluar como el pH de 6.5 afecta la actividad antimicrobiana del sobrenadante. Se observó que el sobrenadante con pH de 6.5 pierde actividad antimicrobiana ante *L. monocytogenes*. El principal metabolito conocido de *L. casei* es el ácido láctico que es producido mediante la fermentación de azúcares (González Martínez *et al.* 2003); en este caso la principal fuente que puede acidificar el medio es el ácido láctico. Al neutralizar el pH se neutraliza la acción que el ácido láctico puede ocasionar sobre *L. monocytogenes*. Lo cual sugiere que la actividad antimicrobiana del sobrenadante sea producida por algún otro metabolito producido por *L. casei*

La principal ventaja de que el sobrenadante sin diluir (1S) a 35 °C presente efecto bactericida; en condiciones donde el patógeno se reproduce a mayor velocidad. Permite tener una alternativa de desinfección de frutas y vegetales durante la remoción de calor de campo (agua a temperatura ambiente) para reducir el riesgo de internalización de microorganismos presentes en el producto (Picha 2004).

Cuadro 8. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* en sobrenadante producido por *Lactobacillus casei* en suero dulce suplementado con 50% de caldo MRS a 12 °C.

TRATAMIENTO	TIEMPO (horas)				
	0	4	8	24	72
Medios de dilución	Media ± D.E. (Log ₁₀ UFC/mL)	Media ± D.E. (Log ₁₀ UFC/mL)	Media ± D.E. (Log ₁₀ UFC/mL)	Media ± D.E. (Log ₁₀ UFC/mL)	Media ± D.E. (Log ₁₀ UFC/mL)
1Ne	4.35 ± 0.13 ^{a(Z)}	4.34 ± 0.00 ^{a(Z)}	4.50 ± 0.18 ^{a(Z)}	5.22 ± 0.91 ^{a(Z)}	7.39 ± 1.54 ^{a(Y)}
1S	4.29 ± 0.09 ^{a(X)}	4.01 ± 0.41 ^{a(X)}	4.00 ± 0.05 ^{a(X)}	1.80 ± 2.97 ^{b(Y)}	-0.30 ± 0.00 ^{c(Z)¥}
1S1U	4.39 ± 0.19 ^{a(Z)}	4.25 ± 0.00 ^{a(Z)}	4.31 ± 0.07 ^{a(Z)}	4.24 ± 0.05 ^{a(Z)}	4.73 ± 0.58 ^{b(Z)}
1U	4.51 ± 0.24 ^{a(YZ)}	3.80 ± 0.76 ^{a(Z)}	4.60 ± 0.15 ^{a(YZ)}	5.86 ± 0.12 ^{a(Y)}	8.08 ± 0.27 ^{a(X)}
CV: 15.5 %	R ² : 0.96				

D.E.: Desviación estándar, UFC: Unidades Formadoras de Colonia, ^{a, b, y c}: Medias seguidas con diferente letra minúscula en cada columna son significativamente diferentes (P<0.05), ^{x-y-z}: Medias con diferente letra mayúscula son significativamente diferentes por filas para medidas repetidas en el tiempo (P<0.05), C.V.: Coeficiente de Variación, R²: Ajuste de modelo, 1Ne: sobrenadante con pH de 6.5, 1S: sobrenadante sin diluir, 1S1U: una parte de sobrenadante y una de caldo UPE, 1U: caldo UPE (testigo), [¥]: Valores de -0.30 Log₁₀ UFC/mL se encuentran por debajo del límite de detección (<1UFC/mL).

Cuadro 9. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* en sobrenadante producido por *Lactobacillus casei* en suero dulce suplementado con 50% de caldo MRS a 35°C

TRATAMIENTO	TIEMPO (horas)			
	0	4	8	24
Medios de dilución	Media ± D.E. (Log ₁₀ UFC/mL)	Media ± D.E. (Log ₁₀ UFC/mL)	Media ± D.E. (Log ₁₀ UFC/mL)	Media ± D.E. (Log ₁₀ UFC/mL)
1Ne	4.35 ± 0.13 ^{a(Y)}	5.33 ± 0.31 ^{ab(XY)}	6.50 ± 0.33 ^{a(X)}	nd
1S	4.29 ± 0.09 ^{a(Y)}	-0.30 ± 0.00 ^{c(Z)¥}	-0.30 ± 0.00 ^{c(Z)¥}	-0.30 ± 0.00 ^{b(Z)¥}
1S1U	4.39 ± 0.19 ^{a(Z)}	4.08 ± 0.07 ^{b(Z)}	3.68 ± 0.45 ^{b(Z)}	nd
1U	4.51 ± 0.24 ^{a(Z)}	5.65 ± 0.44 ^{a(YZ)}	7.00 ± 0.45 ^{a(XY)}	8.08 ± 0.33 ^{a(X)}
CV: 15.5 %	R ² : 0.96			

D.E.: Desviación estándar, UFC: Unidades Formadoras de Colonia, nd: no determinado, ^{a, b, y c}: medias seguidas con diferente letra minúscula en cada columna son significativamente diferentes (P<0.05), ^{X-Y-Z}: Medias con diferente letra mayúscula son significativamente diferentes por filas para medidas repetidas en el tiempo (P<0.05), C.V.: Coeficiente de Variación, R²: Ajuste de modelo, 1Ne: sobrenadante con pH de 6.5, 1S : sobrenadante sin diluir, 1S 1U: una parte de sobrenadante y una de caldo UPE, 1U: caldo UPE (testigo), [¥]: Valores de -0.30 Log₁₀ UFC/mL se encuentran por debajo del límite de detección (< 1UFC/mL), nd: no determinado.

4. CONCLUSIONES

- Se determinó mediante la prueba preliminar de difusión por gotas, que existe efecto inhibitorio contra la *Listeria monocytogenes* por el sobrenadante generado por *Lactobacillus casei* en un medio de suero enriquecido al 50% con caldo MRS y en suero dulce sin suplementar.
- Se comprobó que el sobrenadante generado por *L. casei* en suero enriquecido con 50% de MRS pierde el efecto antimicrobiano contra *L. monocytogenes* a un pH de 6.5.
- El sobrenadante funciona como bactericida contra *L. monocytogenes* a una temperatura de 35 °C, luego de cuatro horas de exposición al sobrenadante sin diluir. Presenta efecto bacteriostático al ser diluido en relación 1:1 (sobrenadante: caldo UPE).
- La temperatura influye en el efecto antimicrobiano del sobrenadante. Se tiene menor efecto inhibitorio contra *L. monocytogenes* a una temperatura de 12 °C que a 35 °C.
- El mejor tratamiento obtenido es el sobrenadante de *L. casei* en suero dulce suplementado con caldo MRS al 50%, a una temperatura de 35 °C.

5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar el efecto del pH en la actividad antimicrobiana generada por el sobrenadante producido por *L. casei* en suero suplementado con caldo MRS.
- Hacer análisis del sobrenadante sin diluir para poder determinar el metabolito que causa el efecto inhibitorio contra *L. monocytogenes*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria requerida de sobrenadante producido por *L. casei* en suero dulce suplementado al 50% de MRS para controlar *Listeria monocytogenes*.
- Realizar pruebas de inhibición del sobrenadante generado por *L. casei* en un suero dulce enriquecido, para el control de *L. monocytogenes* sobre superficies de frutas y vegetales a 35 °C; durante la eliminación de calor de campo en el proceso de pos cosecha.
- Evaluar el efecto antimicrobiano del sobrenadante generado por *Lactobacillus casei* en un medio enriquecido, contra otras bacterias como *E. coli* y *Salmonella*.

6. LITERATURA CITADA

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2011. Multistate outbreak of listeriosis associated with Jensen Farms Cantaloupe—United States. MMWR 60: 1357-8 p. Disponible en: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/091311/>

Cruz Terán, J., R. Paez, M. Belén Pirola y E. Schmidt. sf. Características generales sobre el uso del Suero de queso en la Provincia de Santa Fe. Instituto Nacional de Tecnología Industrial. 19 p. Disponible en: http://www.inti.gov.ar/lacteos/pdf/cuadernillo_Suero_de_Queso.pdf

FDA (Food and Drugs Administration). 1988. Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. Food and Drug Admin. 53: 11247 p.

González Martínez, B.E., M. Gomez Treviño y Z. Jiménez Salas. 2003. Bacteriocinas de Prebióticos. Facultad de salud pública y nutrición, Revista de Salud Pública y Nutrición, Vol. 4: 8 p.

Gonzales Toledo, S., Y.J. Domínguez Domínguez, B.E. García Alendarez, L.A. Prado Barragan y C. Regaldo Gonzales. 2010. Optimization of Nisin Production by *Lactococcus lactis* UQ2 Using Supplemented Whey as Alternative Culture Medium. Journal of Food Science, Vol. 75: 347-353 p.

Gutiérrez Ramírez, L.A., O.I. Montoya Campuzano y O.S. Ruiz Villadiego. 2005. Evaluación del potencial bactericida de los extractos de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento *in vitro* de *E. coli*, *Salmonella* sp.y *Listeria monocytogenes*. Revista CENIC Ciencias Biológicas. Vol. 36: 7 p.

Gutiérrez Ramírez, L.A. y E.V. Acosta Otálvaro. 2008. Determinación del potencial bactericida *In vitro* de un aislado nativo de *Lactobacillus casei* frente *E. coli*. Revista lasallista de investigación. Vol. 5 (2): 68-73 p.

Monroy Dosta, M.C., T. Castro Barrera, F.J. Fernández Perrino y L. Mayorga Reyes. 2009. Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. Tesis Ph.D., Distrito Federal, México, Universidad Autónoma Metropolitana. 73 p.

Picha, D.H. 2004. Manejo Pos cosecha y análisis de empacadora de productos frescos y mejoras para manejo de diseño de línea de empaque. Chemonics International INC. 56 p.

Piña Suárez, M.D.A., C. Uribe Díaz, C. Regalado González, S.L. Amaya Llano, E. Castaño Tostado y B.E. Garcia Almendárez. 2011. Producción de nisina por *Lactococcus lactis* uq2 usando suero lácteo suplementado y evaluación de su actividad después del Secado por aspersión. CIENCIA@UAQ. Vol. 4(2): 47-55 p.

Rodríguez Saucedo, E.N. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable. Ra Ximhai. Vol. 7 (1): 153-170 p.

Rojas-Herrera R.A. y T González-Flores. 2006. Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Revistas médicas Latinoamericanas. Vol. 31 (2): 69-76 p.

Şahingil D., H. İşleroğlu, Z. Yildirim, M. Akcelik, y M. Yildirim. 2009. Characterization of lactococcin BZ produced by *Lactococcus lactis subsp. lactis* BZ isolated from boza. Turk J Biol. Vol. 35: 21-33 p.

Scolari, G. y M. Vescovo. 2004. Microbial antagonism of *Lactobacillus casei* added to fresh vegetables. Journal of Food Scientist. Vol. 16 (4): 465-475 p.

Stella Ramirez, L. y D. Marin Castaño. 2009. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia et Technica. (42): 263 – 268 p.

Swapnali Guajarathi, S.B., A. Sandip Bankar y Laxmi Ananthanarayan. 2008. Fermentative production, purification and characterization of nisin. International Journal of Food Engineering. Vol. 4 (7): 24 p.

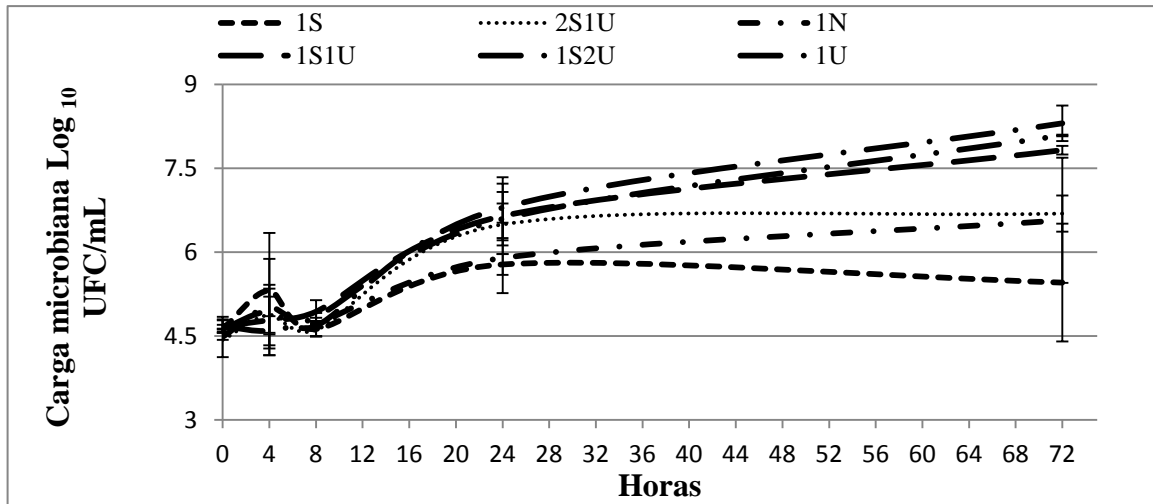
Technical briefs. 2004. *Listeria monocytogenes*-questions and answers. Journal of Environmental Health. 41-45 p.

Vicente Ramírez, E.B. y V.M. Escobar Gonzalez. 2012. Efecto antibacterial del propóleo sobre *Listeria monocytogenes in vitro* y en la superficie de melón (*Cucumis melo*). Tesis, Ing. Agroindustria Alimentaria. EAP, 21 p.

Zamudio, M.L., A. Meza, H. Bailón, J. Martinez-Urtaza y J. Campos. 2011. Experiencias en la vigilancia epidemiológica de agentes patógenos transmitidos por alimentos a través de electroforesis en campo pulsado (pfge) en el Perú. Revista peruana de medicina experimental y salud pública. Vol. 28 (1): 128-35 p.

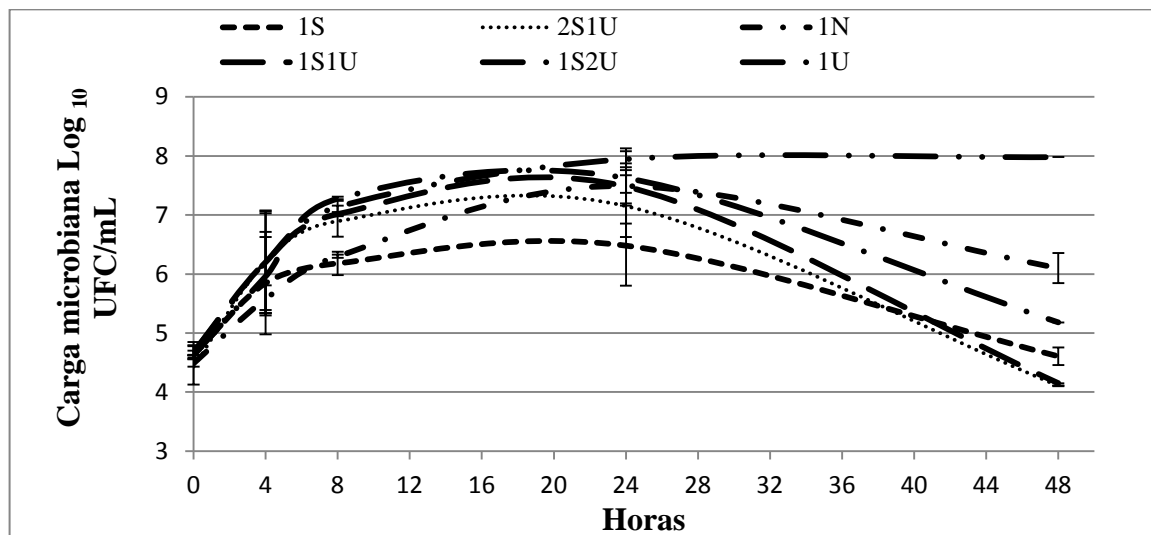
7. ANEXOS

Anexo 1. Comportamiento de *L. monocytogenes* a 12 °C en seis tratamientos de las relaciones sobrenadante y UPE, utilizando el sobrenadante generado por *L. casei* en cuatro horas en medio de suero dulce sin suplementar.



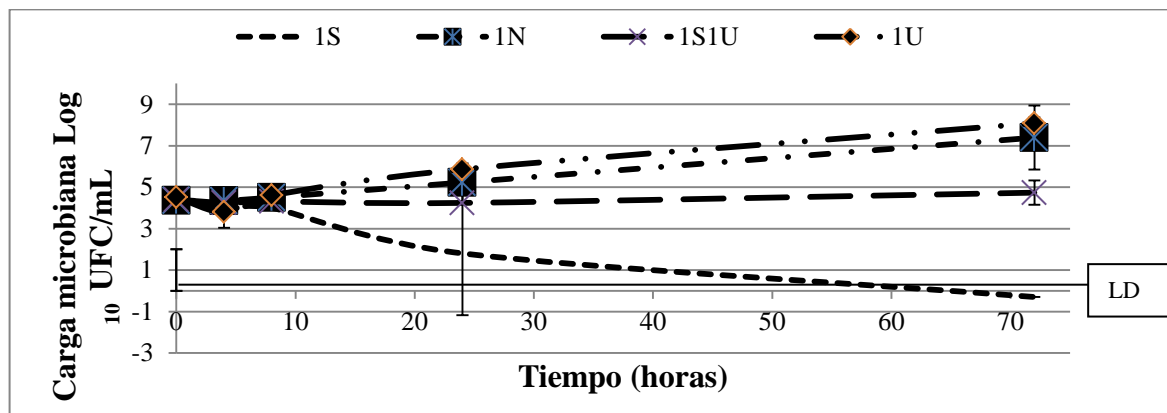
UFC: Unidades Formadoras de Colonia, 1N: sobrenadante con pH de 6.5, 1S: sobrenadante sin diluir, 2S1U: dos partes de sobrenadante y una de caldo UPE, 1S1U: una parte de sobrenadante y una de caldo UPE, 1S2U: una parte de sobrenadante y dos de caldo UPE, 1U: caldo UPE (testigo).

Anexo 2. Comportamiento de *L. monocytogenes* a 35 °C en seis tratamientos de las relaciones sobrenadante y UPE, utilizando el sobrenadante generado por *L. casei* en cuatro horas en medio de suero dulce sin suplementar.



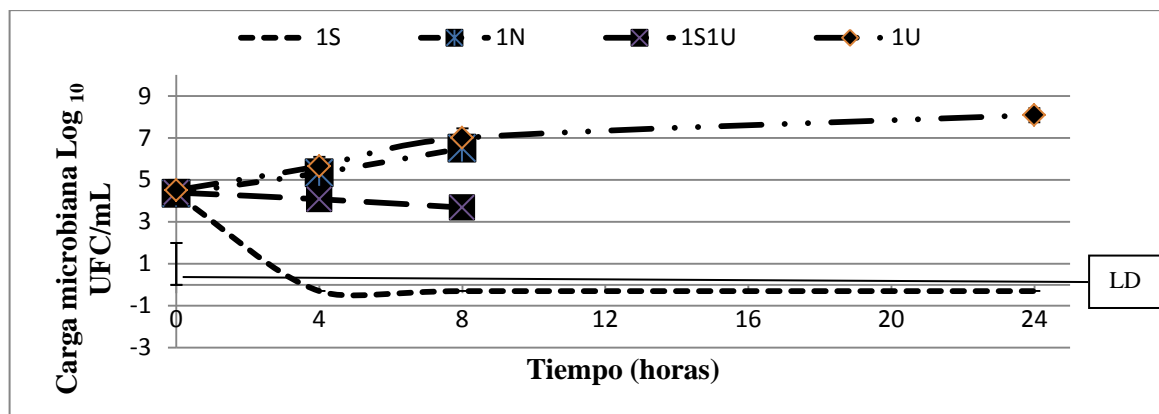
UFC: Unidades Formadoras de Colonia, 1N: sobrenadante con pH de 6.5, 1S: sobrenadante sin diluir, 2 S1 U: dos partes de sobrenadante y una de caldo UPE, 1S 1U: una parte de sobrenadante y una de caldo UPE, 1S 2U: una parte de sobrenadante y dos de caldo UPE, 1 U: caldo UPE (testigo).

Anexo 3. Comportamiento de *L. monocytogenes* a 12 °C en cuatro tratamientos de las relaciones sobrenadante y UPE utilizando el sobrenadante generado por *L. casei* en 24 horas en suero suplementado con caldo MRS.



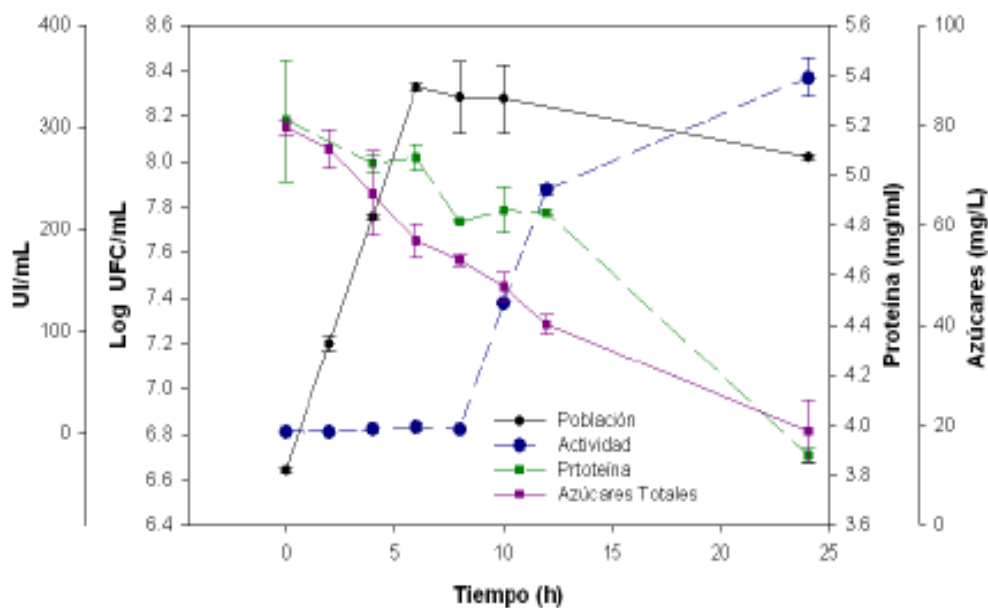
UFC: Unidades Formadoras de Colonia, 1N: sobrenadante con pH de 6.5, 1S: sobrenadante sin diluir, 1S 1U: una parte de sobrenadante y una de caldo UPE, 1 U: caldo UPE (testigo).

Anexo 4. Comportamiento de *L. monocytogenes* a 35 °C en cuatro tratamientos de las relaciones sobrenadante y UPE, utilizando el sobrenadante generado por *L. casei* en 24 horas en suero suplementado con caldo MRS.



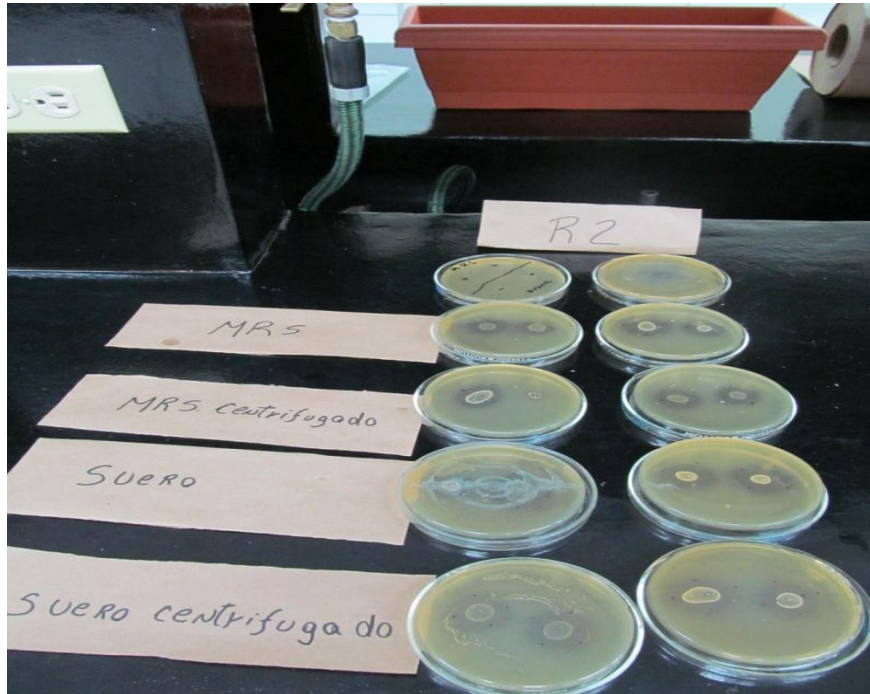
UFC: Unidades Formadoras de Colonia, 1N: sobrenadante con pH de 6.5, 1S: sobrenadante sin diluir, 1S 1U: una parte de sobrenadante y una de caldo UPE, 1 U: caldo UPE (testigo), LD: Limite de detección 0 Log₁₀ UFC/mL

Anexo 5. Consumo de proteínas y carbohidratos para la producción de metabolitos antimicrobianos (nisina).



Fuente: Piña *et al.* 2011.

Anexo 6. Halos formados por la inhibición de los sobrenadantes.



Anexo 7. Evaluación del crecimiento de *L. monocytogenes* y *L. casei* en medio agar MRS, PCA y Oxford.

