

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición y Bromatología III



**TRATAMIENTOS COMBINADOS DE BACTERIOCINAS
Y OTROS SISTEMAS INHIBITORIOS PARA LA MEJORA
DE LA SEGURIDAD DE LOS PRODUCTOS LÁCTEOS**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

Juan Luis Arqués Orobón

Bajo la dirección de las Doctoras:

Margarita Medina Fernández-Regatillo
Eva Rodríguez Mínguez

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-2161-3

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



**TRATAMIENTOS COMBINADOS DE BACTERIOCINAS Y
OTROS SISTEMAS INHIBITORIOS PARA LA MEJORA DE
LA SEGURIDAD DE LOS PRODUCTOS LÁCTEOS**

JUAN LUIS ARQUÉS OROBÓN

MADRID, 2003

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

**TRATAMIENTOS COMBINADOS DE BACTERIOCINAS Y OTROS
SISTEMAS INHIBITORIOS PARA LA MEJORA DE LA SEGURIDAD DE
LOS PRODUCTOS LÁCTEOS**

Memoria presentada por **Juan Luis Arqués Orobón** para la obtención del grado de
Doctor por la Universidad Complutense de Madrid

Directores: Dra. Margarita Medina y Dra. Eva Rodríguez

Departamento de Tecnología de Alimentos

INIA

EL DOCTORANDO

VºBº LOS DIRECTORES

Margarita Medina Fernández-Regatillo, Investigadora A2, y Eva Rodríguez Mínguez, Investigadora A4, del Departamento de Tecnología de Alimentos del INIA,

CERTIFICAN: Que la Tesis titulada "Tratamientos combinados de bacteriocinas y otros sistemas inhibitorios para la mejora de la seguridad de los productos lácteos" de la que es autor Juan Luis Arqués Orobón, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Tecnología de Alimentos del INIA, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 20 de Abril de 2003

Fdo.: Margarita Medina

Fdo.: Eva Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Contar con Margarita Medina y Eva Rodríguez como directoras de tesis ha enriquecido científica y humanamente el tiempo en el que se ha desarrollado este trabajo. Sus conocimientos, confianza, y disponibilidad permanente han hecho el trabajo más fácil desde el primer momento. Muchas gracias.

También quisiera agradecer el apoyo mostrado durante la realización de esta tesis:

A Manuel Núñez, por su profesionalidad, cercanía y buen humor. Sin duda, sus aportaciones han sido fundamentales en el desarrollo de este trabajo.

A Pilar Gaya, por su capacidad resolutive, su ayuda y disponibilidad permanente.

A Javier Fernández, por sus conocimientos y eficacia.

A Javier Tomillo, por su ayuda en la fabricaciones, sus fotografías y por hacer que todo marche bien.

A Juan Antonio Ordóñez, Lorenzo de la Hoz y Juan Miguel Rodríguez por su trato dentro del Departamento de Nutrición y Bromatología III de la Facultad de Veterinaria.

A Dolores Selga por hacer tan fáciles las cosas y por su sonrisa.

A Carmen San José y Clemente López por su apoyo en los primeros momentos.

A Sonia, por su cariño y confianza.

A Máximo, por los buenos consejos y enseñanzas.

A Ana, por las labores administrativas, su disponibilidad y cariño.

A Chiqui, Estrella, Mar, Marta, Paloma, Pilar π , Raquel, Sagrario, Victoria, Juansin, Joaquín, Jaime y Javier, por todo lo que compartimos en el departamento.

A Concepción Calderón y Julio Alcalde por su ayuda con el material de laboratorio.

A Isabel y Juani, por su buen humor y labores de mantenimiento.

A los profesores y becarios del Departamento de Nutrición y Bromatología III de la Facultad de Veterinaria por su hospitalidad.

A María Fernández-Lobato, Teresa, Mariló, Rebeca y Merche, por las enseñanzas en genética molecular y los buenos ratos que pasé en el CBM.

A Kaiipi y Kika por su ayuda con la bibliografía.

A Mirenka, Natalia, Amayita, Amayota, Carla, Cristina, Mara, Daniela, Su, Mercedes, Bea, Marta, Rafa, Pepe, Jorge, César, Quino, Txiqui, Javi, Gonzalo, Jose, Nacho y Albertos, por ser como sois. A ti también Juanillo, por ser como eras.

A mi familia, por su cariño y comprensión.

A Rocío, por su cariño y estímulo permanente.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología y al INIA por el apoyo económico y de infraestructura prestado durante este tiempo.

A Rocío y mi familia

Las toxiinfecciones asociadas al consumo de alimentos continúan suponiendo un problema sanitario y económico en los países desarrollados. La leche y los productos lácteos han sido vehículo de un importante número de estos brotes alimentarios. Por otro lado, los consumidores demandan alimentos poco procesados y con menos aditivos químicos, por lo que la industria alimentaria necesita buscar alternativas que permitan ofrecer alimentos seguros pero al mismo tiempo de alta calidad nutritiva y organoléptica. La bioconservación mediante la combinación de antimicrobianos naturales o la aplicación de tratamientos que conserven lo más posible los parámetros de calidad del producto original, como las altas presiones hidrostáticas, suponen una alternativa a los métodos convencionales de conservación de alimentos.

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la aplicación en caldo de cultivo, leche, cuajada y queso de pasta prensada, de combinaciones de antimicrobianos naturales y de tratamientos de altas presiones sobre la supervivencia de distintos patógenos de importancia en la industria láctea como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella choleraesuis*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* y *Bacillus cereus*.

Los antimicrobianos empleados fueron bacteriocinas, el sistema lactoperoxidasa (LP), reuterina obtenida en el presente trabajo y citrato. Las bacteriocinas (nisina A, nisina Z, lacticina 481, enterocina I, enterocina AS-48 y tres bacteriocinas no caracterizadas denominadas TAB 7, TAB 20 y TAB 57) se aplicaron como sobrenadantes de los cultivos o inoculando las cepas productoras, todas ellas procedentes de la colección de cultivos del Departamento de Tecnología de Alimentos del INIA. También se utilizó nisina comercial.

La reuterina se obtuvo a partir de la cepa *Lb. reuteri* PRO 137. Esta cepa fue seleccionada entre 165 aislados de heces de cerdo, de los que 28 resultaron productores. La reuterina se purificó y concentró mediante técnicas cromatográficas para su aplicación en los experimentos.

El efecto inhibitorio de las bacteriocinas añadidas individualmente frente a *L. monocytogenes* en leche a 37°C no aumentó al aplicarlas en combinación con nisina comercial, a excepción de la combinación nisina-enterocina AS-48 que dio lugar a una mayor reducción del patógeno. La nisina fue la única bacteriocina activa frente a *S. aureus*. La aplicación de las bacteriocinas individualmente o en combinación no inhibió a ninguno de los patógenos Gram-negativos estudiados.

Con los tratamientos combinados de activación del sistema LP y nisina, enterocina I, enterocina AS-48 o bacteriocina TAB 7, se observaron efectos inhibitorios sinérgicos frente a *L. monocytogenes* en leche a 37°C, mientras que frente a *S. aureus* dicho efecto se registró únicamente con la combinación sistema LP-nisina.

En leche refrigerada a 4°C y 8°C con la combinación sistema LP-nisina no se detectó *L. monocytogenes*, observándose un efecto inhibitorio sinérgico. Frente a *S. aureus* este efecto sólo se comprobó a 8°C.

Con el fin de investigar la sensibilización de las bacterias Gram-negativas a las bacteriocinas, se aplicaron tratamientos combinados de nisina y del sistema LP con citrato como agente quelante en leche refrigerada. Con la combinación nisina-citrato apenas se observó una mayor inhibición que con el citrato aplicado individualmente. Frente a *E. coli* O157:H7 y *Sal. choleraesuis* se detectó un efecto inhibitorio sinérgico de la combinación sistema LP-citrato en leche refrigerada a 4°C y 8°C. El tratamiento más eficaz para *C. jejuni* y *A. hydrophila* fue la combinación sistema LP-nisina, que inhibió totalmente a ambos microorganismos. Frente a *Y. enterocolitica* el tratamiento más activo fue el sistema LP aplicado individualmente, que actuó de forma bacteriostática durante la refrigeración a 4°C, aunque no fue capaz de controlar el crecimiento del patógeno a 8°C. Ninguna de las combinaciones empleadas incrementó el efecto inhibitorio del sistema LP frente a *Y. enterocolitica*.

La reuterina mostró un efecto bactericida en leche frente a todos los patógenos investigados, excepto frente a *L. monocytogenes* en que actuó como bacteriostático. En leche con reuterina en combinación con nisina, lacticina 481 ó enterocina AS-48, se observó un efecto inhibitorio sinérgico frente a *L. monocytogenes*, que redujo los niveles del patógeno por debajo del límite de detección. Frente a *S. aureus*, dicho efecto sinérgico se produjo únicamente con la combinación reuterina-nisina. Sin embargo, la combinación de reuterina con cualquier bacteriocina no incrementó el efecto bactericida de este antimicrobiano frente a ninguno de los patógenos Gram-negativos estudiados.

A temperaturas de refrigeración, la combinación reuterina-nisina inhibió de forma sinérgica a *L. monocytogenes*, que no se detectó a los 12 d. *S. aureus* mostró niveles ligeramente más bajos con esta combinación que con reuterina aplicada individualmente. La combinación sistema LP-reuterina redujo los niveles de todos los patógenos Gram-negativos por debajo del límite de detección, excepto en el caso de *E. coli* O157:H7 a 4°C, en que se detectaron niveles inferiores a 10 ufc/ml a los 12 d. Esta combinación actuó de forma sinérgica frente a todas las bacterias Gram-negativas estudiadas, excepto frente a *C. jejuni*.

Se investigó la población de bacterias Gram-negativas que presentaron daños subletales, comprobándose que en el caso de *E. coli* O157:H7 y *A. hydrophila* fue mayor el porcentaje de células con daños subletales después de 12 d a 4°C que a 8°C. Para *Sal. choleraesuis* aumentó este porcentaje al aumentar el tiempo de refrigeración, mientras que con *Y. enterocolitica* se observó una recuperación en el tiempo de las células dañadas por frío.

En cuajadas refrigeradas a 10°C durante 12 d, el tratamiento sistema LP-nisina se mostró como el más efectivo frente a *L. monocytogenes*, no detectándose la presencia del patógeno al final de la refrigeración. Las mayores reducciones en los niveles de *S. aureus* se observaron con la combinación sistema LP-reuterina-nisina. Con el sistema LP y reuterina (2 UR/ml) no se detectó *E. coli* O157:H7 ni *Sal. choleraesuis* durante todo el periodo de refrigeración de las cuajadas, observándose además un efecto inhibitorio sinérgico frente al primer patógeno. La combinación del sistema LP con una concentración menor de reuterina (0,5 UR/ml) también actuó de forma sinérgica frente a *A. hydrophila* y *Y. enterocolitica*, inhibiendo completamente a *A. hydrophila* mientras que *Y. enterocolitica* reanudó su crecimiento a partir de los 6 d de refrigeración.

En queso fabricado a partir de leche cruda de vaca, se ha investigado el efecto de la adición de cepas de bacterias lácticas productoras de nisina A, nisina Z, lacticina 481, enterocina I, enterocina AS-48, TAB 7 y TAB 57, como cultivos adjuntos al fermento comercial, sobre la supervivencia de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 y *B. cereus*. A los 60 d, los niveles más bajos de *L. monocytogenes* se obtuvieron en el queso con *Ec. faecalis* INIA 4 productor de enterocina AS-48. En los quesos con *Ec. faecalis* TAB 52, *Lc. lactis* TAB 57 y *Ec. faecalis* INIA 4, productores de enterocina I, bacteriocina TAB 57 y enterocina AS-48, respectivamente, se detectaron los recuentos más bajos de *S. aureus*. Con el productor de nisina Z *Lc. lactis* TAB 26 se observaron niveles ligeramente más bajos de *E. coli* O157:H7 que los del queso control al final de la maduración. *B. cereus* creció durante la elaboración del queso, pero a partir de los 2 d sus niveles disminuyeron drásticamente incluso en el queso control. El empleo de cultivos bacteriocinogénicos aumentó el efecto inhibitorio del pH del queso sobre este patógeno.

Finalmente, se ha investigado el tratamiento combinado de las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas con el empleo de altas presiones (300 MPa/10°C/10 min y 500 MPa/10°C/5 min) aplicadas a los 2 d y 50 d de maduración del queso, sobre la supervivencia de *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli* O157:H7. Al finalizar la maduración, no se detectaron ninguno de los tres patógenos en los quesos sometidos a 500 MPa tanto a los 2 d como a los 50 d. El empleo de 300 MPa a los 50 d también redujo los niveles de *L. monocytogenes* en el queso por debajo del límite de detección. En cuanto a los tratamientos combinados, la aplicación de 300 MPa a los 2 d en combinación con la inoculación de los productores de lacticina 481, nisina A, enterocina AS-48 ó bacteriocina TAB 57, presentó un efecto inhibitorio sinérgico sobre *L. monocytogenes* que dio lugar a niveles del patógeno inferiores a 100 ufc/g a los 60 d. La aplicación de 300 MPa a los 50 d en los quesos elaborados con los productores de enterocina I y enterocina AS-48, actuó de forma sinérgica reduciendo los niveles de *S. aureus* por debajo del límite de detección. La aplicación de 300 MPa a los 50 d y la combinación sinérgica de 300 MPa a los 2 d con *Lc. lactis* TAB 57, dio lugar a niveles de *E. coli* O157:H7 en el queso inferiores a 10 ufc/g al final de la maduración.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS: PATÓGENOS ASOCIADOS	3
1.1.1. <i>Salmonella</i>	4
1.1.2. <i>Escherichia coli</i> verotoxigénico.....	4
1.1.3. <i>Campylobacter jejuni</i>	5
1.1.4. <i>Aeromonas hydrophila</i>	5
1.1.5. <i>Yersinia enterocolitica</i>	6
1.1.6. <i>Staphylococcus aureus</i>	6
1.1.7. <i>Listeria monocytogenes</i>	7
1.1.8. <i>Bacillus cereus</i>	8
1.1.9. Otros patógenos.....	8
1.2. TENDENCIAS ACTUALES EN SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS ..	9
1.2.1. LAS BACTERIAS LÁCTICAS: POTENCIAL ANTIMICROBIANO	9
1.2.1.1. Ácidos orgánicos.....	10
1.2.1.2. Diacetilo y acetaldehído.....	11
1.2.1.3. Peróxido de hidrógeno	12
1.2.1.4. Reuterina	12
1.2.1.5. Bacteriocinas.....	14
1.2.1.5.1. Clasificación	15
1.2.1.5.1.1. Clase I: lantibióticos.	15
1.2.1.5.1.2. Clase II: no modificadas de pequeño tamaño y estables al calor	16
1.2.1.5.1.3. Clase III: no modificadas, de gran tamaño y sensibles al calor	18
1.2.1.5.1.4. Otras bacteriocinas.....	18
1.2.1.5.2. Mecanismo de acción.....	18
1.2.1.5.3. Aplicación de bacteriocinas en leche y productos lácteos	20
1.2.1.5.3.1. Efectividad y factores limitantes del uso de bacteriocinas.....	20
1.2.1.5.3.2. Mejora de la calidad y seguridad microbiológica de productos lácteos mediante bacteriocinas	21

2.1.2. COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN LA LECHE	22
1.2.2.1. El sistema lactoperoxidasa	22
1.2.2.2. Lactoferrina	23
1.2.2.3. Lisozima.....	24
2.1.3. NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS	24
1.2.3.1. Altas presiones	24
1.2.3.2. Irradiación	26
1.2.3.3. Pulsos eléctricos de alto voltaje	26
1.2.3.4. Microondas.....	27
1.2.3.5. Otras tecnologías.....	28
1.2.3.5.1. Ultrasonidos.	28
1.2.3.5.2. Calentamiento óhmico.	29
1.2.3.5.3. Microfiltración	29
1.3. TRATAMIENTOS COMBINADOS Y SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA..	29
1.3.1. EMPLEO DE BACTERIOCINAS EN TRATAMIENTOS COMBINADOS.	30
1.3.1.1. Combinaciones de bacteriocinas	30
1.3.1.2. Bacteriocinas con otros tratamientos o conservantes.....	31
1.3.2. OTROS TRATAMIENTOS COMBINADOS.....	33
1.4. OBJETIVOS.....	34
2. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1. MICROORGANISMOS EMPLEADOS.....	37
2.1.2. BACTERIAS PATÓGENAS.....	37
2.1.3. BACTERIAS LÁCTICAS PRODUCTORAS DE BACTERIOCINAS.....	37
2.1.4. <i>LACTOBACILLUS REUTERI</i> PRO 137 PRODUCTOR DE REUTERINA	38
2.2. TRATAMIENTOS INHIBITORIOS INVESTIGADOS.....	38
2.2.1. BACTERIOCINAS.....	38
2.2.2. SISTEMA LACTOPEROXIDASA.....	39
2.2.3. REUTERINA	40

2.2.4. CITRATO	40
2.2.5. ALTAS PRESIONES.....	40
2.3. APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS INHIBITORIOS FRENTE A BACTERIAS PATÓGENAS EN LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS.....	40
2.3.1. TRATAMIENTOS INHIBITORIOS COMBINADOS EN LECHE	40
2.3.1.1. Bacteriocinas	40
2.3.1.2. Bacteriocinas y sistema LP	41
2.3.1.3. Nisina y sistema LP en refrigeración	41
2.3.1.4. Nisina, sistema LP y citrato en refrigeración	42
2.3.1.5. Reuterina	42
2.3.1.6. Bacteriocinas y reuterina.....	43
2.3.1.6.1. Nisina y reuterina en diferido.....	43
2.3.1.7. Nisina, reuterina y sistema LP en refrigeración	44
2.3.2. TRATAMIENTOS INHIBITORIOS COMBINADOS EN CUAJADA	44
2.3.2.1. Reuterina y sistema LP.....	44
2.3.2.2. Nisina, reuterina y sistema LP	44
2.3.3. TRATAMIENTOS INHIBITORIOS COMBINADOS EN QUESO	45
2.3.3.1. Bacterias lácticas productoras de bacteriocinas	45
2.3.3.2. Bacterias lácticas productoras de bacteriocinas y altas presiones isostáticas.....	45
2.4. METODOLOGÍA	46
2.4.1. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO DE LOS MICROORGANISMOS	46
2.4.2. AISLAMIENTO, SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>LACTOBACILLUS</i> PRODUCTORES DE REUTERINA.....	48
2.4.3. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE REUTERINA	50
2.4.4. FABRICACIÓN DE CUAJADA Y QUESO.....	50
2.4.5. TOMA DE MUESTRAS Y ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	51
2.4.6. ANÁLISIS QUÍMICOS DE LECHE, CUAJADA Y QUESO	52
2.4.6.1. pH.....	52
2.4.6.2. Actividad de agua (aw).....	52
2.4.7. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD BACTERIOCINA EN CUAJADA Y QUESO.....	52

2.4.8. DETERMINACIÓN DE REUTERINA EN CUAJADA.....	53
2.4.9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	53
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1. AISLAMIENTO, SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>LACTOBACILLUS</i> PRODUCTORES DE REUTERINA	57
3.2. TRATAMIENTOS INHIBITORIOS COMBINADOS EN LECHE.....	60
3.2.1. BACTERIOCINAS.....	60
3.2.1.1. Efecto frente a <i>L. monocytogenes</i>	60
3.2.1.2. Efecto frente a <i>S. aureus</i>	62
3.2.1.3. Efecto frente a bacterias Gram-negativas.....	64
3.2.2. BACTERIOCINAS Y SISTEMA LP	64
3.2.3. NISINA Y SISTEMA LP EN REFRIGERACIÓN	67
3.2.3.1. Efecto frente a <i>L. monocytogenes</i>	68
3.2.3.2. Efecto frente a <i>S. aureus</i>	69
3.2.4. NISINA, SISTEMA LP Y CITRATO EN REFRIGERACIÓN	70
3.2.4.1. Efecto frente a <i>E. coli</i> O157:H7	71
3.2.4.2. Efecto frente a <i>Sal. choleraesuis</i>	74
3.2.4.3. Efecto frente a <i>C. jejuni</i>	78
3.2.4.4. Efecto frente a <i>A. hydrophila</i>	81
3.2.4.5. Efecto frente a <i>Y. enterocolitica</i>	83
3.2.5. REUTERINA	86
3.2.6. BACTERIOCINAS Y REUTERINA	88
3.2.6.1. Efecto frente a bacterias Gram-positivas	88
3.2.6.2. Efecto frente a bacterias Gram-negativas.....	90
3.2.6.3. Aplicación en diferido de nisina y reuterina	92
3.2.7. NISINA, REUTERINA Y SISTEMA LP EN REFRIGERACIÓN.....	93
3.2.7.1. Efecto frente a bacterias Gram-positivas	93
3.2.7.2. Efecto frente a bacterias Gram-negativas.....	96
3.3. TRATAMIENTOS INHIBITORIOS COMBINADOS EN CUAJADA.	103
3.3.1. REUTERINA Y SISTEMA LP.	103

3.3.1.1. Efecto frente a <i>E. coli</i> O157:H7.....	103
3.3.1.2. Efecto frente a <i>Sal. choleraesuis</i>	104
3.3.1.3. Efecto frente a <i>A. hydrophila</i> y <i>Y. enterocolitica</i>	106
3.3.2. NISINA, REUTERINA Y SISTEMA LP.....	108
3.3.2.1. Efecto frente a <i>L. monocytogenes</i>	108
3.3.2.2. Efecto frente a <i>S. aureus</i>	109
3.3.2.3. Actividad nisina en cuajada.....	110
3.3.2.4. Reuterina residual en cuajada.....	111
3.4. TRATAMIENTOS INHIBITORIOS COMBINADOS EN QUESO.....	112
3.4.1. BACTERIAS LÁCTICAS PRODUCTORAS DE BACTERIOCINAS.....	112
3.4.1.1. Efecto frente a <i>L. monocytogenes</i>	112
3.4.1.2. Efecto frente a <i>S. aureus</i>	113
3.4.1.3. Bacterias totales.....	115
3.4.1.4. pH y actividad de agua.....	116
3.4.1.5. Actividad bacteriocina.....	116
3.4.1.6. Efecto frente a <i>E. coli</i> O157:H7.....	117
3.4.1.7. Efecto frente a <i>B. cereus</i>	119
3.4.1.8. Bacterias totales.....	121
3.4.1.9. pH y actividad de agua.....	121
3.4.1.10. Actividad bacteriocina.....	122
3.4.1.11. Calidad organoléptica.....	122
3.4.2. BACTERIAS LÁCTICAS PRODUCTORAS DE BACTERIOCINAS Y TRATAMIENTOS DE ALTAS PRESIONES.....	123
3.4.2.1. Efecto frente a <i>L. monocytogenes</i>	123
3.4.2.2. Efecto frente a <i>S. aureus</i>	130
3.4.2.3. Efecto frente a <i>E. coli</i> O157:H7.....	136
3.4.2.4. pH.....	141
3.4.2.5. Actividad bacteriocina.....	144
4. CONCLUSIONES.....	147
5. BIBLIOGRAFÍA.....	151

Tabla 1. Producción de reuterina expresada como acroleína ($\mu\text{g/ml}$) y actividad inhibitoria frente a <i>E. coli</i> K12 (UA) de la reuterina de lactobacilos aislados de heces de cerdo	57
Tabla 2. Supervivencia de bacterias Gram-positivas (log ufc/ml) en TSB y leche con combinaciones de bacteriocinas	63
Tabla 3. Supervivencia de bacterias Gram-negativas (log ufc/ml) en TSB con combinaciones de bacteriocinas.....	65
Tabla 4. Supervivencia de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. aureus</i> (log ufc/ml) en leche con el sistema LP (LP) en combinación con bacteriocinas.....	66
Tabla 5. Supervivencia de <i>L. monocytogenes</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N) y sistema LP (LP) a 4°C.....	69
Tabla 6. Supervivencia de <i>L. monocytogenes</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N) y sistema LP (LP) a 8°C.....	69
Tabla 7. Supervivencia de <i>S. aureus</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N) y sistema LP (LP) a 4°C.....	70
Tabla 8. Supervivencia de <i>S. aureus</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N) y sistema LP (LP) a 8°C.....	70
Tabla 9. Supervivencia de <i>E. coli</i> O157:H7 (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 4°C. Recuentos en TSA.....	71
Tabla 10. Supervivencia de <i>E. coli</i> O157:H7 (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 4°C. Recuentos en VRBA	72
Tabla 11. Supervivencia de <i>E. coli</i> O157:H7 (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 8°C. Recuentos en TSA	73
Tabla 12. Supervivencia de <i>E. coli</i> O157:H7 (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 8°C. Recuentos en VRBA	74
Tabla 13. Supervivencia de <i>Sal. choleraesuis</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 4°C. Recuentos en TSA	75
Tabla 14. Supervivencia de <i>Sal. choleraesuis</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 4°C. Recuentos en XLDA	76
Tabla 15. Supervivencia de <i>Sal. choleraesuis</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 8°C. Recuentos en TSA	77
Tabla 16. Supervivencia de <i>Sal. choleraesuis</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 8°C. Recuentos en XLDA	77
Tabla 17. Supervivencia de <i>C. jejuni</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 4°C. Recuentos en BAB n° 2	78

Tabla 18. Supervivencia de <i>C. jejuni</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 4°C. Recuentos en BAB nº 2 + suplemento selectivo.....	79
Tabla 19. Supervivencia de <i>C. jejuni</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 8°C. Recuentos en BAB nº2	80
Tabla 20. Supervivencia de <i>C. jejuni</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 8°C. Recuentos en BAB nº 2 + suplemento selectivo.....	80
Tabla 21. Supervivencia de <i>A. hydrophila</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 4°C. Recuentos en TSA.....	81
Tabla 22. Supervivencia de <i>A. hydrophila</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 4°C. Recuentos en VRBA	82
Tabla 23. Supervivencia de <i>A. hydrophila</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 8°C. Recuentos en TSA.....	83
Tabla 24. Supervivencia de <i>A. hydrophila</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 8°C. Recuentos en VRBA	83
Tabla 25. Supervivencia de <i>Y. enterocolitica</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 4°C. Recuentos en TSA	84
Tabla 26. Supervivencia de <i>Y. enterocolitica</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 4°C. Recuentos en VRBA	85
Tabla 27. Supervivencia de <i>Y. enterocolitica</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 8°C. Recuentos en TSA.	86
Tabla 28. Supervivencia de <i>Y. enterocolitica</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 8°C. Recuentos en VRBA	86
Tabla 29. Supervivencia de bacterias patógenas (log ufc/ml) en leche con reuterina	87
Tabla 30. Comportamiento de <i>E. coli</i> O157:H7 frente a reuterina en leche desnatada (0,04% materia grasa) y entera (3,6% materia grasa).....	88
Tabla 31. Supervivencia de bacterias Gram-positivas (log ufc/ml) en leche con bacteriocinas y reuterina (R).....	89
Tabla 32. Supervivencia de bacterias Gram-negativas (log ufc/ml) en leche con bacteriocinas y reuterina (R).....	91
Tabla 33. Supervivencia de <i>S. aureus</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N) y reuterina (R) añadida a distintos tiempos	93

Tabla 34. Supervivencia de <i>L. monocytogenes</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 4°C	94
Tabla 35. Supervivencia de <i>L. monocytogenes</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 8°C	94
Tabla 36. Supervivencia de <i>S. aureus</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 4°C	95
Tabla 37. Supervivencia de <i>S. aureus</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 8°C	96
Tabla 38. Supervivencia de <i>E. coli</i> O157:H7 (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 4°C	96
Tabla 39. Supervivencia de <i>E. coli</i> O157:H7 (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 8°C	97
Tabla 40. Supervivencia de <i>Sal. choleraesuis</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 4°C	98
Tabla 41. Supervivencia de <i>Sal. choleraesuis</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 8°C	98
Tabla 42. Supervivencia de <i>C. jejuni</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 4°C	99
Tabla 43. Supervivencia de <i>C. jejuni</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 8°C	100
Tabla 44. Supervivencia de <i>A. hydrophila</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 4°C	100
Tabla 45. Supervivencia de <i>A. hydrophila</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 8°C	101
Tabla 46. Supervivencia de <i>Y. enterocolitica</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 4°C	102
Tabla 47. Supervivencia de <i>Y. enterocolitica</i> (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 8°C	102
Tabla 48. Supervivencia de <i>E. coli</i> O157:H7 (log ufc/ml) en cuajadas refrigeradas a 10°C elaboradas con leche con reuterina (R) y sistema LP (LP)	104
Tabla 49. Valores de pH en cuajadas con <i>E. coli</i> O157:H7 refrigeradas a 10°C y elaboradas con leche con reuterina (R) y sistema LP (LP)	104

Tabla 50. Supervivencia de <i>Sal. choleraesuis</i> (log ufc/ml) en cuajadas refrigeradas a 10°C elaboradas con leche con reuterina (R) y sistema LP (LP)	105
Tabla 51. Valores de pH en cuajadas con <i>Sal. choleraesuis</i> refrigeradas a 10°C y elaboradas con leche con reuterina (R) y sistema LP (LP).....	105
Tabla 52. Supervivencia de <i>A. hydrophila</i> (log ufc/ml) en cuajadas refrigeradas a 10°C y elaboradas con leche con reuterina (R) y sistema LP (LP)	106
Tabla 53. Supervivencia de <i>Y. enterocolitica</i> (log ufc/ml) en cuajadas refrigeradas a 10°C y elaboradas con leche con reuterina (R) y sistema LP (LP)	107
Tabla 54. Valores de pH en cuajadas con <i>A. hydrophila</i> y <i>Y. enterocolitica</i> refrigeradas a 10°C y elaboradas con leche con reuterina (R) y sistema LP (LP)	107
Tabla 55. Supervivencia de <i>L. monocytogenes</i> (log ufc/ml) en cuajadas refrigeradas a 10°C elaboradas con leche con reuterina (R), nisina (N) y sistema LP (LP).....	108
Tabla 56. Supervivencia de <i>S. aureus</i> (log ufc/ml) en cuajadas refrigeradas a 10°C elaboradas con leche con reuterina (R), nisina (N) y sistema LP (LP)	109
Tabla 57. Valores de pH en cuajadas con patógenos Gram-positivos refrigeradas a 10°C y elaboradas con leche con reuterina (R), nisina (N) y sistema LP (LP).....	110
Tabla 58. Actividad nisina en cuajadas inoculadas con patógenos Gram-positivos y elaboradas con leche con reuterina (R), nisina (N) y sistema LP (LP)	111
Tabla 59. Determinación de reuterina (valores medios de absorbancia a 490 nm) en cuajadas refrigeradas 10°C elaboradas con leche con reuterina individualmente o en combinación con otros tratamientos	111
Tabla 60. Supervivencia de <i>L. monocytogenes</i> (log ufc/g) durante la fabricación y maduración de quesos elaborados con distintos fermentos	113
Tabla 61. Supervivencia de <i>S. aureus</i> (log ufc/g) durante la fabricación y maduración de quesos elaborados con distintos fermentos	115
Tabla 62. Bacterias totales (log ufc/g) durante la fabricación y maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y <i>L. monocytogenes/S. aureus</i>	115

Tabla 63. Valores de pH durante la fabricación y maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y <i>L. monocytogenes/S. aureus</i>	116
Tabla 64. Actividad de las bacteriocinas durante la maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y <i>L. monocytogenes/S. aureus</i>	117
Tabla 65. Supervivencia de <i>E. coli</i> O157:H7 (log ufc/g) durante la fabricación y maduración de quesos elaborados con distintos fermentos	119
Tabla 66. Supervivencia de <i>B. cereus</i> (log ufc/g) durante la fabricación y maduración de quesos elaborados con distintos fermentos	120
Tabla 67. Bacterias totales (log ufc/g) durante la fabricación y maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y <i>E. coli/B. cereus</i>	121
Tabla 68. Valores de pH durante la fabricación y maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y <i>E. coli/B. cereus</i>	122
Tabla 69. Actividad de las bacteriocinas durante la maduración de queso elaborado con distintos fermentos y <i>E. coli/B. cereus</i>	123
Tabla 70. Supervivencia de <i>L. monocytogenes</i> (log ufc/g) durante la maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 2 d	124
Tabla 71. Supervivencia de <i>L. monocytogenes</i> (log ufc/g) durante la maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 50 d	127
Tabla 72. Supervivencia de <i>S. aureus</i> (log ufc/g) durante la maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 2 d.....	131
Tabla 73. Supervivencia de <i>S. aureus</i> (log ufc/g) durante la maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 50 d.....	133
Tabla 74. Supervivencia de <i>E. coli</i> O157:H7 (log ufc/g) durante la maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 2 d	137
Tabla 75. Supervivencia de <i>E. coli</i> O157:H7 (log ufc/g) durante la maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 50 d	139
Tabla 76. Valores de pH durante la maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 2 d.....	142

Tabla 77. Valores de pH durante la maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 50 d.....	143
Tabla 78. Actividad bacteriocina a lo largo de la maduración de quesos elaborados con distintos fermentos.....	146

Figura 1. La reuterina como metabolito intermedio en la ruta de degradación del glicerol.....	13
Figura 2. Amplificación mediante PCR obtenida con la pareja de cebadores específicos LOWLAC-REUT1. 1-6: PRO 108, PRO 109, PRO 133, PRO 137, PRO 149 y PRO 152; 7: <i>Lb. reuteri</i> CECT 925T; 8: <i>Lb. fermentum</i> CECT 4007T. M: marcador ADN 100 pb.	58
Figura 3. Amplificación mediante PCR de un fragmento del gen que codifica la glicerol deshidratasa. 1-6: PRO 108, PRO 109, PRO 133, PRO 137, PRO 149 y PRO 152; 7: <i>Lb. reuteri</i> CECT 925T; M: marcador ADN 100 pb.....	59
Figura 4. Absorbancia a 490 nm de diferentes concentraciones de reuterina preparadas a partir del stock purificado 240 UR/ml. a: entre 0 y 80 UR/ml; b: entre 0 y 5 UR/ml.....	59
Figura 5. Supervivencia de <i>L. monocytogenes</i> (log ufc/g) a los 60 d de maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 2 d y 50 d	129
Figura 6. Supervivencia de <i>S. aureus</i> (log ufc/g) a los 60 d de maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 2 d y 50 d.....	135
Figura 7. Supervivencia de <i>E. coli</i> O157:H7 (log ufc/g) a los 60 d de maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 2 d y 50 d.	140

1.1. LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS: PATÓGENOS ASOCIADOS

La leche es un buen medio para el crecimiento de microorganismos por su alto contenido en agua, su pH y la gran variedad de nutrientes que posee. A su paso por la ubre, por contacto con el pezón, la piel del animal y el equipo de ordeño, así como durante el almacenamiento y transporte, va adquiriendo una microbiota entre la que se incluyen microorganismos beneficiosos, saprófitos y patógenos para el hombre.

A pesar de las mejoras en los procesos tecnológicos y de la implantación de procedimientos de control como el APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico) en la industria alimentaria, el número de toxiinfecciones asociadas al consumo de alimentos continúa aumentando, incluso en los países más desarrollados (Holzapfel *et al.*, 1995; Daly y Davis, 1998). En EE.UU. estas enfermedades suponen unos 76 millones de casos anuales con unos costes asociados de 35 millones de dólares entre gastos hospitalarios y pérdidas de productividad (Mead *et al.*, 1999). Entre 1993 y 1998 se registraron en España 5.517 brotes alimentarios que afectaron a 69.553 personas y de los que sólo en un 63% se identificó al microorganismo causante (Schmidt y Tirado, 2001). La leche y los productos lácteos son responsables de un considerable porcentaje de brotes producidos por bacterias patógenas en países industrializados (De Buyser *et al.*, 2001). Helms *et al.* (2003) sugieren que las enfermedades transmitidas por alimentos debidas a *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolítica* y *Shigella* tienen una mayor influencia en el número de muertes que la considerada actualmente.

Los factores que contribuyen al desarrollo de brotes transmitidos por alimentos dependen en gran medida del microorganismo causante. Diversos estudios epidemiológicos llevados a cabo en EE.UU., concluyeron que los factores más frecuentemente relacionados con el desarrollo de enfermedades de origen alimentario fueron, en este orden, temperaturas de mantenimiento y almacenamiento inadecuadas, inapropiada higiene personal del manipulador de alimentos, tratamientos térmicos insuficientes y equipos contaminados (Bean *et al.*, 1990).

Las tres bacterias patógenas que tradicionalmente han preocupado en mayor medida a los microbiólogos de alimentos son: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y *Clostridium botulinum*. Sin embargo, en los últimos años diversos microorganismos han ganado una gran importancia como agentes causantes de toxiinfecciones alimentarias. Entre estos microorganismos denominados patógenos "emergentes" se incluyen *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolítica*, *Escherichia coli* verotoxigénico (ECVT) y *Campylobacter jejuni* (Palumbo, 1992; Heeschen, 1998; Solomon y Hoover, 1999). Así mismo, como consecuencia del abuso de antibióticos en medicina y animales de abasto, se está observando un aumento considerable en la aparición de patógenos alimentarios multirresistentes a antibióticos (Threlfall *et al.*, 2000; Barton, 2001).

Entre los microorganismos patógenos asociados a toxiinfecciones alimentarias por consumo de leche o productos lácteos podemos destacar:

1.1.1. *Salmonella*

Es un bacilo Gram-negativo, pequeño y con gran capacidad de adaptación a ambientes adversos, como altas concentraciones de sal y valores de pH de 4,5 a 9. Los alimentos de origen animal son su principal vehículo. Puede producir gastroenteritis, fiebre tifoidea y septicemia (Roberts *et al.*, 1996a). Su presencia en leche es normalmente atribuida a prácticas higiénicas incorrectas, pudiendo desarrollarse durante la elaboración del queso y sobrevivir durante la maduración, especialmente a bajas temperaturas (Leyer y Johnson, 1992, 1993; Spahr *et al.*, 1994). Este microorganismo ha causado brotes asociados al consumo de quesos Cheddar con dosis infectivas tan bajas como $10\text{-}10^2$ células (Fontaine *et al.*, 1980; D'Áoust *et al.*, 1985). En Europa y América del Norte está aumentando la incidencia de toxiinfecciones causadas por *Sal. typhimurium* resistente a agentes antimicrobianos como ampicilina, cloranfenicol, estreptomycinina o tetraciclina, y muchas son ocasionadas por consumo de queso fresco elaborado a partir de leche cruda (Cody *et al.*, 1999; Villar *et al.*, 1999; Daly *et al.*, 2000).

1.1.2. *Escherichia coli* verotoxigénico

Estos bacilos cortos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y productores de verotoxinas han recibido diferentes denominaciones en la literatura científica: verotoxigénicos (ECVT), enterohemorrágicos (ECEH) y productores de “Shiga-like toxins” (ECSLT) (Smith *et al.*, 1991; Blanco *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1995). Existen otros tres tipos de *E. coli* considerados patógenos intestinales: enteropatógenos (EPEC), enterotoxigénicos (ETEC) y enteroinvasivos (EIEC). La infección por *E. coli* verotoxigénico (ECVT) fue reconocida por primera vez en 1982 en EE.UU., en dos brotes de colitis hemorrágica (Riley *et al.*, 1982; Karmali *et al.*, 1983). La cepa causante pertenecía al serotipo O157:H7, y se diferenciaba del resto de cepas de *E. coli* en que no fermentaba el sorbitol. En EE.UU., Canadá, Japón y Reino Unido son en la actualidad la causa principal de diarrea sanguinolenta (Blanco *et al.*, 1997; Slutsker *et al.*, 1997). Las tres principales manifestaciones de enfermedad que le han sido atribuidas son colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y púrpura trombótica trombocitopénica (Padhye y Doyle, 1992). Las intoxicaciones por este microorganismo se deben principalmente a la ingestión de agua, carne poco cocinada, así como leche no pasteurizada o contaminada postpasteurización (Doyle *et al.*, 1997; Ferrer y Simón, 2002). Su baja dosis infectiva ($10\text{-}10^2$ células), su resistencia a temperaturas de refrigeración y su tolerancia al ácido, lo convierten en un patógeno de importancia en la industria láctea. Se ha comprobado su presencia y crecimiento en quesos (Kasrazadeh y Genigeorgis, 1995; Ramsaran *et al.*, 1998). *E. coli* O157: H7 inoculado a 10^3 ufc/ml

sobrevive en yogur tradicional e inoculado con bifidobacterias durante 7 d a 4°C (Massa *et al.*, 1997). En quesos gallegos de leche cruda se han detectado *E. coli* toxigénicos con una frecuencia del 1,4% (Quinto y Cepeda, 1997).

1.1.3. *Campylobacter jejuni*

Es un bacilo Gram-negativo, curvo, móvil, no formador de esporas, localizado en el tracto gastrointestinal, cavidad oral y aparato reproductor de hombres y animales. *C. jejuni* fue reconocido en 1977 como causante de toxiinfecciones alimentarias (Skirrow, 1977), y en los últimos años su incidencia ha aumentado de forma continuada y es considerado uno de los principales microorganismos causantes de gastroenteritis bacterianas. En 1996, la incidencia de *C. jejuni* en EE.UU. superó la de *Salmonella*, *S. aureus*, *E. coli* y *Clostridium perfringens* (Tran, 1998). El aumento de la incidencia de este organismo puede ser atribuida a una combinación de diferentes factores como cambios en los hábitos alimentarios, movimientos demográficos, cambios en las poblaciones microbianas, y/o a la mejora de las técnicas para aislar e identificar el microorganismo. Muchos casos de campilobacteriosis quedan sin registrar, ya que los síntomas no precisan, en la mayoría de los casos, asistencia médica u hospitalaria. La leche cruda o inadecuadamente pasteurizada y las canales de pollo son los principales vehículos de infección en el hombre (Pearson *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 1996b). *Campylobacter* ha ocasionado numerosos brotes de gastroenteritis relacionados con la ingestión de leche y productos lácteos (Potter *et al.*, 1983; Harris *et al.*, 1986; Evans *et al.*, 1996).

1.1.4. *Aeromonas hydrophila*

Es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo y psicrotrofo que está cobrando importancia, junto con otras aeromonas móviles, como agente causante de infecciones gastrointestinales. *Aeromonas* spp. secreta diversas sustancias asociadas con la adaptación al medio y la patogeneidad. Entre las más estudiadas se encuentran las β -lactamasas, lipasas, enterotoxinas, toxinas hemolíticas, proteasas, hemaglutininas, quitinasas, nucleasas y amilasas (Cahill, 1990; Mateos *et al.*, 1993; Pemberton *et al.*, 1997). La variedad de cuadros clínicos relacionados con infecciones por *Aeromonas* sugiere un mecanismo de patogeneidad complejo, donde cada cepa posee múltiples factores de virulencia en diferentes combinaciones. La aerolisina, una toxina hemolítica, aparece frecuentemente como un factor de virulencia en las infecciones por este microorganismo (Kirov, 1997; Khan *et al.*, 1998). *A. hydrophila* es la especie implicada con más frecuencia en las infecciones relacionadas con *Aeromonas* (Aguilar *et al.*, 1997). Se ha comprobado su presencia y supervivencia en gran variedad de alimentos, principalmente refrigerados y de origen animal, incluyendo leche cruda, leche pasteurizada y queso (Freitas *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1996; Melas *et al.*, 1999, 2001). La capacidad de algunas cepas de *Aeromonas* de crecer a bajas temperaturas adquiere

una gran importancia en alimentos refrigerados que no requieren un tratamiento térmico antes de ser consumidos. El aumento de temperatura, aún durante cortos periodos de tiempo, favorece un rápido crecimiento de este microorganismo (Palumbo *et al.*, 1985).

1.1.5. *Yersinia enterocolitica*

Es un bacilo, Gram-negativo, oxidasa-negativo y anaerobio facultativo localizado fundamentalmente en alimentos de origen animal y en el agua. *Y. enterocolitica* es capaz de crecer a temperaturas de 0 y 44°C (Robins-Browne, 1997) y pH entre 4 y 10 (Schiemann, 1980), además puede tolerar concentraciones de NaCl superiores al 5% (De Giusti y de Vito, 1992; Feng y Weagant, 1993). El biovar 4 y el serovar O:3 son los aislados más frecuentemente en humanos, siendo su dosis infectiva superior a 10^4 células. La infección por *Y. enterocolitica* se manifiesta de una gran variedad de formas, produciendo generalmente diarreas e inflamación de los tejidos invadidos (Cornelis *et al.*, 1987), dependiendo de la cepa así como de las características del hospedador (Larson, 1979). Aunque numerosas muestras clínicas aisladas producen una toxina termoestable (Delor *et al.*, 1990), ésta no parece jugar un papel importante en la patogénesis infectiva de *Y. enterocolitica* (Cover y Aber, 1989). Numerosos brotes de yersiniosis han sido relacionados con el consumo de leche cruda o contaminada postpasterización (Tacket *et al.*, 1984; Schiemann, 1987; Doyle, 1990). La supervivencia de *Y. enterocolitica* en diferentes tipos de queso ha sido descrita por varios autores (Little y Knochel, 1994; Erkmén, 1996).

1.1.6. *Staphylococcus aureus*

Es un microorganismo Gram-positivo, catalasa-positivo, muy resistente a condiciones adversas, siendo considerado una de las principales causas de gastroenteritis del mundo. Cabe destacar su osmotolerancia, pudiendo crecer en medios que contengan el equivalente a 3,5 M de NaCl y sobrevivir con actividad de agua inferior a 0,86 (Jablonski Bohach, 1997). *S. aureus* produce diversas enterotoxinas termoestables de peso molecular (entre 26–34 kDa) y propiedades fisicoquímicas similares. Estas enterotoxinas no se inactivan por las proteasas del tracto gastrointestinal. *S. aureus* se aísla frecuentemente de leche y productos lácteos (Little y Louvois, 1999). Donnelly *et al.* (1968) sugieren que la leche pasteurizada es incluso más susceptible de contaminación que la leche cruda. *S. aureus* es el principal causante de mastitis en vacas y puede transmitirse a la leche (Fox, 1997; Sang *et al.*, 1998). Los quesos de leche cruda pueden resultar contaminados con *S. aureus* debido a las mastitis subclínicas del ganado. *S. aureus* puede sobrevivir durante la fabricación y maduración de quesos de leche cruda (Nuñez *et al.*, 1988), detectándose en muchos casos la presencia de enterotoxinas (Meyrand *et al.*, 1998; Vernozy-Rozand *et al.*, 1998). La presencia de fagos o antibióticos que alteren el desarrollo de los fermentos lácticos pueden permitir la proliferación de este microorganismo y el riesgo de producción de enterotoxinas

(Zehren y Zehren, 1968). Algunos datos en leches españolas revelan una incidencia media de 4,3 log ufc/ml en leche de oveja (Bautista *et al.*, 1986), y de 2,7 log ufc/ml en leche de cabra (Zapico, 1993). Normalmente se requieren 10^6 - 10^8 ufc/g para que se produzcan niveles de toxina suficientes para ocasionar una intoxicación, aunque se han descrito intoxicaciones producidas por niveles inferiores de *Staphylococcus*. Muy recientemente en Japón, se produjo una intoxicación masiva por consumo de leche y productos lácteos contaminados con toxina estafilocócica que afectó a unas 13.000 personas (Food Safety Network, 2000).

1.1.7. *Listeria monocytogenes*

Es un bacilo corto, Gram-positivo, catalasa-positivo, anaerobio facultativo, móvil y no formador de esporas. La producción de hemolisina es una de las propiedades más frecuentemente asociada a la patogenicidad de *L. monocytogenes* (Roberts *et al.*, 1996c), aunque existen otros factores como la producción de internalina, proteína p60, proteína ActA o determinadas fosfolipasas (Rocourt y Cossart, 1997). Está ampliamente distribuida, encontrándose en agua, lodo, vegetales y heces de animales y hombres. Es resistente a diversas condiciones medioambientales, pudiendo crecer a temperaturas de entre 1°C y 45°C (Walker *et al.*, 1990), con más del 10% de NaCl (Farber y Peterkin, 1991) o iniciar el crecimiento a pH 4,4 (George *et al.*, 1988). Su supervivencia en alimentos y en plantas procesadoras durante largos periodos de tiempo ha hecho de este microorganismo el principal problema de la industria agroalimentaria durante los últimos años (Rocourt y Cossart, 1997). Existen 13 serotipos que pueden causar enfermedad; sin embargo, los aislamientos de muestras clínicas pertenecen mayoritariamente a los serotipos 4b y 1/2a (McLauchlin *et al.*, 1988), siendo el serotipo 4b el responsable de la mayoría de los brotes asociados a alimentos. La dosis infectiva depende de varios factores, incluyendo el estado inmunológico del hospedador. La listeriosis puede producir abortos espontáneos, septicemia neonatal y meningitis. En adultos frecuentemente aparecen casos de meningitis. La listeriosis se ha asociado al consumo de leche y productos lácteos, siendo este grupo de alimentos uno de los más estudiados (Fleming *et al.*, 1985; Goulet *et al.*, 1995; Boggs *et al.*, 2001). La contaminación de la leche puede originarse a partir de la presencia de *L. monocytogenes* en heces, alimento, cama o superficie de las ubres (Fedio y Jackson, 1992), por mamitis asintomáticas en las vacas (Hird y Genigeorgis, 1990) o por contaminación postpasterización (Rudolf y Schered, 2001). La incidencia de este microorganismo en España es del 3,6% en leche cruda de vaca (Gaya *et al.*, 1998), del 2,2% en leche cruda de oveja (Rodríguez *et al.*, 1994) y del 2,6% en leche cruda de cabra (Gaya *et al.*, 1996). *L. monocytogenes* sobrevive durante la elaboración y la maduración de la mayoría de las variedades de queso (Núñez *et al.*, 1997; Delgado da Silva *et al.*, 1998; Ramsaran *et al.*, 1998; Morgan *et al.*, 2001).

1.1.8. *Bacillus cereus*

Es un microorganismo Gram-positivo, móvil, formador de esporas y aerobio, aunque pueden crecer anaeróbicamente a expensas de azúcares. Las esporas y las formas vegetativas de *B. cereus* se pueden encontrar en el suelo, polvo, agua y sedimentos, así como en diversos tipos de alimentos como cereales y derivados, leche y productos lácteos, alimentos desecados, especias, productos cárnicos y vegetales (Kramer y Gilbert, 1989). En leche y productos lácteos el problema radica en la contaminación de las ubres de la vaca con bacterias procedentes del suelo y hierba. Por otro lado, las esporas de *B. cereus* pueden sobrevivir al tratamiento de pasterización o UHT, pudiendo aparecer como contaminante de los productos lácteos en plantas de procesado (Roberts *et al.*, 1996d; Eneroth *et al.*, 2001; Faille *et al.*, 2001). Normalmente aparece en concentraciones inferiores a 10^3 ufc/g, a las que se considera inocuo (Hobbs y Gilbert, 1974). La dosis infectiva puede variar entre 10^5 y 10^8 células viables o esporas por gramo, dependiendo de la cantidad de toxina que produzca la cepa (Granum, 1994). Algunas cepas son psicotrofas y producen fosfolipasa C (lecitinasa), que degrada la membrana del glóbulo graso produciendo agregación de la grasa (Meer *et al.*, 1991). Puede producir una proteínasa que proporciona sabores desagradables y que limita el consumo de los productos altamente contaminados (Granum, 1997). Existen dos tipos de síndromes provocados por sus toxinas. La toxina involucrada en el síndrome emético es producida durante el crecimiento del microorganismo en el alimento (Kramer y Gilbert, 1989), provoca vómitos, y ha sido aislada y caracterizada (Agata *et al.*, 1994). En el síndrome diarreico pueden estar involucradas más de una enterotoxina, producidas durante el crecimiento de *B. cereus* en el intestino delgado (Turnbull, 1986; Beecher y Wong, 1994; Granum, 1994). La mayoría de los casos quedan sin registrar, ya que suelen ser leves y duran menos de 24 horas.

1.1.9. Otros patógenos

Pese al continuado descenso de los casos, la brucelosis es la zoonosis de mayor incidencia en España. La mayoría de casos de brucelosis humana están relacionados con el contacto directo con animales infectados, pero un importante número de casos son contraídos por el consumo de leche y productos lácteos (Stiles, 1989). La especie más frecuente, y considerada más patógena, es *Brucella melitensis*, seguida de *B. suis* y *B. abortus* (Matyas y Fujikura, 1984).

Mycobacterium tuberculosis, *M. bovis* y *M. africanum* son las micobacterias causantes de tuberculosis en el hombre. *M. tuberculosis* es el principal agente de tuberculosis humana, mientras que *M. bovis* es el más relacionado con la transmisión por consumo de leche contaminada (Bonsu *et al.*, 2000). En los países desarrollados se han incrementado los casos de tuberculosis, actuando *Mycobacterium* como patógeno oportunista en pacientes con SIDA (Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida),

apareciendo casos producidos por microorganismos multirresistentes a antibióticos (O'Reilly y Daborn, 1995; Ribero *et al.*, 2001).

M. paratuberculosis es el responsable de la enfermedad de Johne en ganado vacuno (Falkinham, 1996). La posible resistencia de este microorganismo a la pasteurización gracias a la formación de agregados celulares y la supervivencia y multiplicación en macrófagos, así como su posible relación con la transmisión de la enfermedad de Crohn a humanos a través de leche contaminada, está siendo discutida actualmente (Hammer, 1999; Stabel, 2000; Stabel *et al.*, 2001).

1.2. TENDENCIAS ACTUALES EN SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS

En los países desarrollados han aparecido nuevos problemas en la conservación de los alimentos como consecuencia de cambios en la estructura demográfica y socioeconómica, la incorporación de la mujer al mercado laboral, el aumento de los viajes, la influencia de los medios de comunicación, las innovaciones tecnológicas y la gran competencia entre las industrias alimentarias, entre otros. Por otro lado, cada vez son más los consumidores que demandan alimentos más naturales, frescos, nutricionalmente sanos y seguros, así como menos procesados y con menos aditivos químicos (Gould, 1996).

1.2.1. LAS BACTERIAS LÁCTICAS: POTENCIAL ANTIMICROBIANO

El consumo de alimentos fermentados parece tener su origen hace más de 7.000 años, en la civilización Sumeria (Fox, 1993). Las bacterias lácticas son los principales componentes en la elaboración y maduración de productos lácteos fermentados (Prentice y Neaves, 1986), aunque también podemos encontrar otras bacterias como *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium*, levaduras como *Debaryomyces* y *Kluyveromyces* o mohos como *Penicillium* y *Geotrichum*.

Dentro de las bacterias lácticas se incluye un amplio número de géneros que se definen como bacterias Gram-positivas, generalmente catalasa-negativas, microaerófilas o anaerobias facultativas, no formadoras de esporas y con un contenido de G + C en el ADN inferior a 50–55 mol % (Schleifer y Ludwig, 1995; Stiles y Holzapfel, 1997). Se encuentran divididas en 11 géneros: *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus* (Cogan, 1996).

El desarrollo de determinados patógenos en alimentos refrigerados mínimamente procesados ha despertado el interés por la bioconservación, en la que las bacterias lácticas juegan un papel fundamental. El objetivo de la bioconservación es extender la vida útil y aumentar la seguridad de los alimentos utilizando una microbiota natural o

controlada y/o sus productos (Stiles, 1996). Puede abordarse inoculando las cepas bacterianas que crecerán y producirán sustancias antagonistas, o bien añadiendo el producto de la fermentación de un microorganismo o dichas sustancias concentradas y/o purificadas. Estos sistemas de bioconservación no pueden sustituir las buenas prácticas de elaboración, pero ofrecen un parámetro adicional de procesado para mejorar la seguridad y asegurar la calidad de los alimentos.

En la actualidad se considera a las bacterias lácticas microorganismos GRAS (Generally Recognized As Safe) por lo que su utilización y/o la de sus metabolitos como bioconservantes está recibiendo una gran atención (Gould, 1996; Stiles, 1996). Los principales mecanismos de antagonismo microbiano de las bacterias lácticas son la competencia por nutrientes y la formación de ácido láctico y acético, con el consiguiente descenso del pH (Kandler, 1983; Daeschel, 1989; Lindgren y Dobrogosz, 1990). Además, pueden producir otras sustancias antimicrobianas como etanol, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrógeno, ácido benzoico, isómeros D de aminoácidos, reuterina y bacteriocinas (Piard y Desmazeaud, 1991; Requena y Peláez, 1995).

Por otro lado, cada vez es mayor el interés de las bacterias lácticas como probióticos, protegiendo de infecciones gastrointestinales, modulando la respuesta inmune, aumentando el valor nutritivo de los alimentos, favoreciendo la tolerancia a lactosa, reduciendo la acumulación de compuestos tóxicos o cancerígenos en el alimento, reduciendo los niveles de colesterol en sangre o controlando algunos tipos de cáncer, así como su empleo como vehículos en la administración de vacunas (Bacus y Brown, 1981; Sisson, 1989; Fernández y Shahani, 1990; Gilliland, 1990; Hosoda *et al.* 1992; Daly y Davis, 1998).

1.2.1.1. Ácidos orgánicos

Las bacterias lácticas fermentan los carbohidratos obteniendo durante el proceso ácidos orgánicos, principalmente láctico y acético, que no son utilizados por las células y se excretan al exterior (Kandler, 1983). Estos ácidos contribuyen al desarrollo del sabor, aroma y textura de los productos fermentados. El ácido acético tiene mayor capacidad antimicrobiana que el láctico, pudiendo inhibir levaduras, mohos y bacterias (Blom y Mortvedt, 1991). El mecanismo de inhibición se basa en la disminución del pH del medio, provocando un bombeo de protones hacia el interior de las células y una posible desestabilización de la membrana (Konings, 1983; De Vuyst y Vandame, 1994). Por otro lado, a medida que disminuye el pH del medio, aumenta la proporción de ácidos orgánicos en su forma no disociada. Estos ácidos, debido a su naturaleza lipofílica, atraviesan la membrana celular por difusión pasiva, disociándose en el citoplasma. Estas moléculas ejercen su efecto inhibitorio interfiriendo en funciones celulares como la translocación de sustrato y la fosforilación oxidativa (Baird-Parker, 1980), así como

incrementando el nivel de protones en el interior celular. Cuando esta concentración de protones excede la capacidad tamponadora del citoplasma, comienza a actuar la bomba de protones hasta agotar las reservas energéticas de la célula. El pH interno desciende, causando desnaturalización de proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de la célula (Piard y Desmazeaud, 1991; Requena y Peláez, 1995). Las bacterias lácticas pueden sobrevivir y desarrollarse a valores de pH relativamente bajos, ya que poseen un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y protones al exterior celular, que además de contribuir a la homeostasis del pH interno, genera energía (Tseng, 1993).

El citrato y el lactato, así como otros agentes quelantes utilizados en la industria alimentaria, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el hexametáfosfato de sodio (HMP), secuestran cationes divalentes de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, permeabilizando la membrana externa a la acción de ciertos agentes antibacterianos (Vaara, 1992; Cutter y Siragusa, 1995a; Carneiro de Melo *et al.*, 1998). La acción de los quelantes se ve considerablemente disminuida cuando se adiciona Ca^{2+} o Mg^{2+} y en alimentos con iones divalentes (Delves-Broughton, 1993; Schved *et al.*, 1994; Cutter y Siragusa, 1995b).

1.2.1.2. Diacetilo y acetaldehido

El diacetilo o 2,3-butanodiona es un producto final de la fermentación del citrato presente en la leche (~8,3 mmol/l) por bacterias lácticas, principalmente por *Leuconostoc* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis (Hugenholtz, 1993; Vandenberg, 1993). Su acción antimicrobiana es debida al grupo α,α -dicarbonil de la molécula, que reacciona con la porción guanido del aminoácido arginina de las enzimas microbianas, desactivándolas por bloqueo o modificación de la zona catalítica (Lindgren y Dobrogosz, 1990; De Vuyst y Vandame, 1994). El diacetilo inhibe totalmente a concentraciones de 258-344 $\mu\text{g/ml}$ a bacterias Gram-negativas, levaduras y mohos, mientras que las bacterias lácticas son resistentes a dosis superiores a 350 $\mu\text{g/ml}$ (Jay, 1982; Requena y Peláez, 1995). Su actividad es bactericida para las bacterias Gram-negativas y bacteriostática para las Gram-positivas. El diacetilo se produce en cantidades de 4 $\mu\text{g/ml}$ en cultivo puro (Cogan, 1980), por lo que no se le puede atribuir una actividad inhibitoria en productos lácteos fermentados, aunque podría actuar de forma sinérgica con otros factores (Gilliland, 1985). Se considera sustancia GRAS pero su utilidad es limitada debido a que se requieren cantidades demasiado elevadas para que ejerza un efecto inhibitorio, y posee además un aroma intenso (Requena y Peláez, 1995). Es el principal componente del aroma de la mantequilla y otros productos lácteos fermentados (Piard y Desmazeaud, 1991; Cogan y Hill, 1993).

El acetaldehido aparece en muchos productos lácteos, pero fundamentalmente en el yogur, donde es el principal responsable del aroma. Su producción se atribuye al

metabolismo del piruvato y la reacción de la treonina aldolasa que transforma la treonina en acetaldehído y glicina (Accolas *et al.*, 1980). Posee actividad inhibitoria frente a *S. aureus*, *Sal. typhimurium* y *E. coli* a concentraciones de 10-100 ppm (Piard y Desmazeaud, 1991). En el yogur alcanza concentraciones de aproximadamente 25 ppm, por lo que podría ejercer un efecto antimicrobiano, aunque los niveles presentes en otros productos fermentados son insuficientes para dicha actividad (Caplice Fitzgerald, 1999).

1.2.1.3. Peróxido de hidrógeno

Las bacterias lácticas producen peróxido de hidrógeno como mecanismo de protección frente al oxígeno, mediante la acción de oxidasas o NADH peroxidasas (Condon, 1987). Las bacterias lácticas carecen de una catalasa que elimine el H₂O₂ generado en presencia de oxígeno, por lo que se acumula en el medio. La acción inhibitoria se atribuye a su efecto altamente oxidante, produciendo la peroxidación de los lípidos de la membrana y la destrucción de la estructura básica molecular de proteínas celulares (Dahl *et al.*, 1989). Por otro lado, tanto el H₂O₂ como los radicales libres, pueden dañar los ácidos nucleicos bacterianos (Ananthaswamy *et al.*, 1977; Imlay y Linn, 1988) y fúngicos (Frankenberg *et al.*, 1993), produciendo modificaciones del ADN. El H₂O₂ posee actividad frente a esporas bacterianas (Block, 1991). Las bacterias Gram-negativas están mejor protegidas de los efectos tóxicos de los metabolitos del oxígeno debido a la presencia de una capa externa de lipopolisacáridos. La acción bactericida del peróxido de hidrógeno depende de la concentración aplicada y de otros factores ambientales como el pH y la temperatura (Cords y Dychdala, 1993; Juven y Pierson, 1996).

1.2.1.4. Reuterina

La reuterina es una sustancia neutra, soluble en agua, no proteica y de bajo peso molecular producida por *Lactobacillus reuteri* durante la metabolización del glicerol en anaerobiosis (Axelsson *et al.*, 1989). Está descrita como un equilibrio entre las formas monomérica, monomérica hidratada y dimérica cíclica del β-hidroxiacetaldehído (β-HPA) (Talarico y Dobrogosz, 1989). Es efectiva en un amplio intervalo de pH (de 2 a 8), mostrándose más estable a pH ácido, mientras que a pH 11 se degrada inmediata e irreversiblemente (Talarico *et al.*, 1988; El-Ziney y Debevere, 1998).

Lb. reuteri se aísla frecuentemente del intestino de humanos y de animales como cerdos y pollos, así como de diferentes alimentos, como embutidos, leche y queso. El-Ziney *et al.* (1996) han aislado de intestino de cerdo *Lb. fermentum* productores de reuterina.

El β-HPA es un metabolito intermedio en la ruta de reducción del glicerol descrito en *Klebsiella*, *Citrobacter* (Toraya *et al.*, 1980), *Clostridium* (Heyndricks *et al.*, 1991) y *Lactobacillus* (Schutz y Radler, 1984). Esta ruta permite a algunos lactobacilos, como *Lb. reuteri*, utilizar el glicerol como aceptor de electrones en presencia de carbohidratos

asimilables, pero no como fuente de carbono (Figura 1) (Talarico *et al.*, 1990). El glicerol se transforma en β -HPA gracias a la glicerol deshidratasa coenzima B₁₂-dependiente y actúa como aceptor externo de electrones mediante su reducción a 1,3 propanediol por la 1,3 propanediol deshidrogenasa (oxidoreductasa NAD⁺ dependiente) (Talarico *et al.*, 1990). La glicerol deshidratasa de *Lb. reuteri* ha sido purificada y caracterizada (Talarico y Dobrogosz, 1990). Esta ruta está controlada genéticamente por el *dha* regulón en *Klebsiella* (Tong y Cameron, 1992) o *Citrobacter* (Daniel y Gottschalk, 1992), e incluye una rama oxidativa que lleva al glicerol hasta el ciclo glicolítico (Claisse y Lonvaud-Funel, 2001). Cuando el suministro de NADH procedente de la glucólisis se agota, es decir en la fase estacionaria de crecimiento, *Lb. reuteri* a diferencia de otros microorganismos, continúa produciendo β -HPA a pesar de no ser necesario desde un punto de vista bioenergético. Este β -HPA es acumulado y excretado en condiciones de anaerobiosis (Talarico *et al.*, 1990).

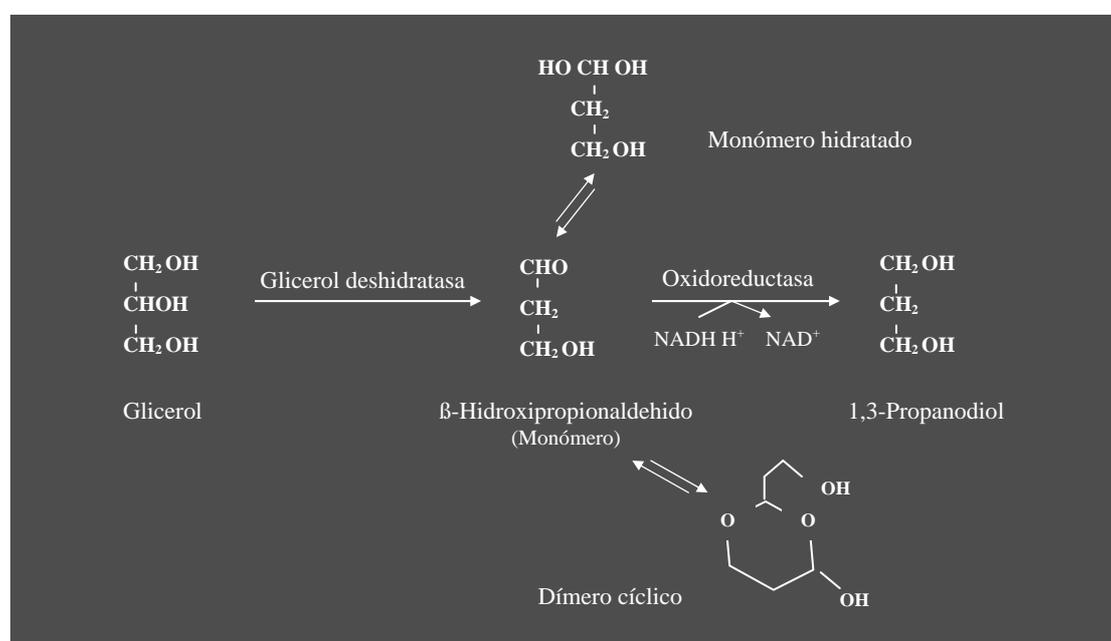


Figura 1. La reuterina como metabolito intermedio en la ruta de degradación del glicerol

La reuterina parece actuar sobre la síntesis de ADN inhibiendo enzimas sulfhidrilo implicadas en la actividad ribonucleótido-reductasa (Talarico y Dobrogosz, 1989), siendo capaz de inhibir a patógenos y alterantes Gram-positivos como *Staphylococcus*, *Listeria*, *Clostridium* o *Bacillus*, y Gram-negativos como *E. coli*, *Yersinia*, *Shigella*, *Pseudomonas* o *Salmonella*. Las bacterias lácticas se muestran más resistentes a la acción de la reuterina, siendo necesarias concentraciones de 3 a 5 veces mayores (Axelsson *et al.*, 1989; El-Ziney *et al.*, 1996). El aumento de la temperatura (10-30°C) incrementa el efecto de la reuterina, mientras que el pH (4,5-6,5) y la concentración de sal (0,5-3%) no interaccionan con el efecto de la reuterina en caldo BHI (Brain Heart Infusion) suplementado con glucosa y extracto de levadura (Rasch, 2002).

La adición de reuterina liofilizada en leche y queso Cottage almacenado a 7°C ha producido efectos inhibitorios frente a *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*. En queso la inhibición fue mayor al aumentar la concentración de reuterina. En leche se comprobó que la grasa (0,5-3%) no afecta a la actividad de la reuterina y que la adición de sal (3%) incrementa su efecto (El-Ziney y Debevere, 1998). El efecto bactericida de la reuterina frente a estos dos microorganismos ha sido también estudiado en carne de cerdo sin detectarse alteraciones en pH, color o textura en el alimento (El-Ziney *et al.*, 1999).

La hidrólisis de los triglicéridos de la dieta pueden aportar el glicerol necesario a *Lb. reuteri* para la producción de reuterina en el intestino. Dicha reuterina podría inhibir el crecimiento de patógenos, favoreciendo el equilibrio de la microbiota del tracto gastrointestinal (Dobrogosz *et al.*, 1989).

Lb. reuteri es utilizado como probiótico en leches fermentadas, quesos y también se presenta en comprimidos (Delespaul *et al.*, 1994; Casas-Perez, 1996; www.biogaia.com). Existen diversos trabajos sobre los efectos beneficiosos de este microorganismo, su capacidad de implantación en humanos y su empleo como suplemento alimentario (Speck *et al.*, 1993; De Boever *et al.*, 2001).

1.2.1.5. Bacteriocinas

La aplicación en seguridad microbiológica alimentaria de péptidos antimicrobianos producidos por bacterias ha experimentado un extraordinario avance en los últimos años. Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente por las bacterias productoras (Sahl y Bierbaum, 1998). Las colicinas de *E. coli* fueron las primeras bacteriocinas descritas (Gratia, 1925). Las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas fueron inicialmente descritas por Rogers (1928) al observar la actividad antimicrobiana de *Lc. lactis* frente a *Lb. bulgaricus* debida a un compuesto proteico y termoestable. Posteriormente, Hirsch (1951) sugirió el empleo de cultivos iniciadores productores de nisina para prevenir la formación de gas por *Clostridium* en queso. Las bacteriocinas de bacterias lácticas presentan un gran interés para la industria alimentaria por su potencialidad para inhibir a microorganismos patógenos y alterantes de alimentos (Yang y Ray, 1994a).

Las bacteriocinas pueden estar codificadas en el cromosoma (Holck *et al.*, 1994; Aymerich *et al.*, 1996; Altena *et al.*, 2000) o en plásmidos (Klaenhammer, 1993; Quadri *et al.*, 1994; Kanatani *et al.*, 1995). Incluso en algunos casos los genes pueden estar repartidos entre el cromosoma y plásmidos (Quadri *et al.*, 1994; Venema *et al.*, 1996a,b). Una misma bacteriocina puede ser producida por cepas pertenecientes a géneros distintos, como la pediocina AcH o PA 1.0 producida por *P. acidilactici* H y PAC-1.0 y por *Lb. plantarum* WHE 92 (Ennahar *et al.*, 1996). Una misma cepa puede contener varios plásmidos que codifiquen distintas bacteriocinas (Quadri *et al.*, 1994) y

un único microorganismo puede producir más de una bacteriocina, como se ha observado en *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 9B4 (Van Belkum *et al.*, 1991; 1992). La función de las bacteriocinas (Nes *et al.*, 1996) sería la de capacitar a las bacterias productoras para sobrevivir frente a sus competidores. Se ha observado que algunas actúan como péptidos señal o feromonas para la expresión de genes.

Los determinantes genéticos asociados a la producción de bacteriocinas biológicamente activas se suelen encontrar en operones que incluyen el gen estructural que codifica la prebacteriocina, el gen de inmunidad, los de procesado y transporte, y, en algunos casos, los necesarios para las modificaciones post-traduccionales (Cintas *et al.*, 2001). Estos genes pueden estar organizados en uno (pediocina A) o más operones (lactococina A).

1.2.1.5.1. Clasificación

Las bacteriocinas de bacterias lácticas son un grupo heterogéneo constituido mayoritariamente por péptidos de pequeño tamaño, generalmente catiónicos o anfipáticos, y derivados de propéptidos con un extremo N-terminal cargado negativamente.

Las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas han sido sometidas a diversas clasificaciones atendiendo a su estructura, tamaño molecular, presencia de aminoácidos modificados, modo de acción, estabilidad térmica, etc. (Klaenhammer, 1993; Nes *et al.*, 1996; Nissen-Meyer y Nes, 1997; Moll *et al.*, 1999). Actualmente se aceptan tres clases bien definidas:

1.2.1.5.1.1. Clase I: lantibióticos

Las bacteriocinas modificadas se denominan lantibióticos debido a que contienen aminoácidos modificados como lantionina y/o β -metil-lantionina (Jung, 1991). Son de pequeño tamaño molecular (< 5 kDa) y estables al calor. Los principales lantibióticos de bacterias lácticas son la nisina producida por *Lc. lactis* (Hurst, 1981a,b), la lacticina 481 producida por *Lc. lactis* (Piard *et al.*, 1992), la lactocina S producida por *Lb. sake* (Mortvedt *et al.*, 1995) y la carnocina U149 producida por *Carnobacterium piscicola* (Stoffels *et al.*, 1994).

Los lantibióticos se forman a partir de péptidos precursores o prepéptidos codificados en genes estructurales y sintetizados en el ribosoma de las bacterias. Estos prepéptidos tienen un extremo N-terminal denominado péptido líder, que se elimina por proteólisis después de las reacciones de modificación, antes, durante o después del transporte al exterior de la célula, y un segmento C-terminal en el cual se modifican los residuos Ser, Thr y Cys, que se conoce como propéptido (De Vos *et al.*, 1991). La lantionina y la β -metil-lantionina se forman en el prepéptido por un proceso de modificación post-traducciona l en dos pasos (Ingram, 1970). La formación de la lantionina comienza con

la deshidratación específica de residuos de serina para formar la 2,3-dideshidroalanina, que forma un enlace tioéter por unión de su doble enlace con el grupo tiol de una cisteína. La metil-lantionina deriva de un residuo de treonina en vez de serina. La función de estos residuos de aminoácidos sería facilitar una conformación estable al péptido, consiguiendo simultáneamente una elevada termoestabilidad.

Los lantibióticos se dividen en dos tipos, A y B (Ia y Ib), según la propuesta de Jung *et al.* (1991). Sahl *et al.* (1998) propusieron un tercer tipo que englobaría los lantibióticos de estructura no definida.

Los lantibióticos Ia son alargados, flexibles, con forma de sacacorchos, anfipáticos, poseen carga neta positiva y un peso molecular comprendido entre 2 y 5 kDa. En solventes que imitan membranas como el trifluoroetanol o dimetilsulfóxido, los péptidos adoptan estructuras anfifílicas en forma alargada (Van de Ven *et al.*, 1991), con residuos cargados y cadenas con la parte hidrofílica alineada en el lado opuesto de la molécula. Esta conformación se considera un requisito para que tenga lugar la despolarización de la membrana (Van den Hooven *et al.*, 1996a,b). Los lantibióticos del tipo A se subdividen en tres grupos: el grupo de los de tipo nisina, el grupo formado por Pep5, epicidina 280 y epilancina K7, y el grupo formado por estreptococina A-FF22, lacticina 481, salivaricina A y variacina.

Los lantibióticos tipo Ib tienen forma globular y peso molecular de aproximadamente 2 kDa. Son también fuertemente anfipáticos, pero a diferencia de los péptidos de tipo Ia carecen de carga neta o la poseen negativa (Altena *et al.*, 2000) y tienen mucha menor libertad conformacional, lo que les confiere estabilidad frente a la acción de proteasas (Sahl y Bierbaum, 1998). Actúan inhibiendo funciones enzimáticas al bloquear los sustratos de las reacciones. No se han descrito en este grupo bacteriocinas producidas por bacterias lácticas.

El tercer tipo de lantibióticos incluye aquellos para los que no existe una información completa de su estructura, aunque los genes estructurales y los implicados en la biosíntesis hayan sido secuenciados, de manera que no pueden establecerse comparaciones con las diferentes bacteriocinas ya descritas.

1.2.1.5.1.2. Clase II: no modificadas de pequeño tamaño y estables al calor

Este grupo es el más numeroso y comprende las bacteriocinas de tamaño inferior a 10 kDa, termoestables y sin aminoácidos modificados en su estructura. Poseen una señal de procesamiento del péptido líder común Gly-Gly, comparten un alto contenido en aminoácidos pequeños tipo Gly y son generalmente catiónicas.

Se subdividen en IIa o tipo pediocina, IIb o bacteriocinas de dos péptidos, IIc o secretadas por un sistema *sec*-dependiente y IId.

La clase IIa comprende a las bacteriocinas tipo pediocina PA-1, que se caracterizan por presentar una fuerte actividad antilisteria. La caracterización molecular de las pediocinas PA-1 y AcH, junto con la obtención de sus secuencias aminoacídicas, permitió establecer que ambas son la misma bacteriocina (Henderson *et al.*, 1992; Marugg *et al.*, 1992; Motlagh *et al.*, 1992a). El término más extendido en la actualidad, que es el de pediocina PA-1. Este grupo de bacteriocinas son muy comunes en bacterias lácticas. Sus secuencias aminoacídicas muestran un elevado grado de homología (38-60% de identidad) siendo más pronunciada en el extremo N-terminal (Aymerich *et al.*, 1996). Esta región presenta dos cisteínas unidas por un enlace disulfuro en la llamada “caja pediocina”: -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-X₁-Cys-X₂-K/Asn-X₃-X₄-Cys- donde X₁₋₄ representa residuos variables (Nissen-Meyer y Nes, 1997; Ennahar *et al.*, 2000). Análisis recientes parecen ampliar la presencia de posiciones conservadas (Casaus, 1998). Se ha demostrado que la región C-terminal es un determinante importante para la especificidad de las bacteriocinas. La región C-terminal es hidrofóbica o anfipática e interacciona con la membrana originando poros (Chikindas *et al.*, 1993). Se incluyen en este grupo: pediocina PA-1 (Henderson *et al.*, 1992), sakacina P (Tichaezek *et al.*, 1992), leucocina A (Hastings *et al.*, 1991), leucocina UAL 187 (Hastings *et al.*, 1991), curvacina A (Holck *et al.*, 1992) y enterocina A (Aymerich *et al.*, 1996).

Las bacteriocinas de la clase IIb requieren la acción complementaria de dos péptidos catiónicos diferentes para ser activas. La primera bacteriocina de este grupo caracterizada fue la lactococina G (Nissen-Meyer *et al.*, 1992). También pertenecen a este grupo la lactococina M y N (Van Belkum *et al.*, 1991), la plantaricina A (Nissen-Meyer *et al.*, 1993), las plantaricinas EF y JK (Diep *et al.*, 1996), la lactacina F (Allison *et al.*, 1995) y las enterocinas L50A y L50B (Cintas *et al.*, 1998a), entre otras. La purificación y caracterización de la enterocina L50 producida por *Ec. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 1998a) y la enterocina I producida por *Ec. faecium* 6T1a (Floriano *et al.*, 1998) demostraron un alto grado de identidad, por lo que se pueden ser consideradas como la misma bacteriocina.

Las bacteriocinas de la clase IIc fueron propuestas como clase por Nes *et al.* (1996) debido a que las bacteriocinas acidicina B (Leer *et al.*, 1995), divergicina A y carnobacteriocina A (Worobo *et al.*, 1994) eran secretadas por un sistema *sec*-dependiente. Estas bacteriocinas no poseen la secuencia péptido líder Gly-Gly sino que están sintetizadas con una secuencia líder N terminal típica del tipo *sec*. Posteriormente se ha observado que bacteriocinas de la clase IIa pueden usar este sistema de secreción y como consecuencia la subclase IIc podría eliminarse (Cintas *et al.*, 2001; Cleveland *et al.*, 2001).

Moll *et al.* (1999) sugieren incluir la clase IId, englobando las bacteriocinas de la clase II que no se pueden clasificar en ninguno de los subgrupos anteriores. Entre ellas se

encuentra la lactococina A (Holo *et al.*, 1991; Martínez *et al.*, 2000), la lactococina B (Van Belkum *et al.*, 1991) y la enterocina B (Casaus, 1998).

Las bacteriocinas tiol-activadas fueron propuestas como clase por Venema *et al.* (1994) para incluir las bacteriocinas cuya actividad biológica depende del estado reducido de un residuo de cisteína. De momento sólo incluye la lactococina B (Venema *et al.*, 1993). Se ha sugerido, posteriormente, que este grupo debe ser eliminado (Nes *et al.*, 1996), al haberse observado que la oxidación del grupo sulfhidrilo de las bacteriocinas con diversos reactivos químicos no modifica la actividad bacteriocina.

1.2.1.5.1.3. Clase III: no modificadas, de gran tamaño y sensibles al calor

Esta clase está formada por proteínas de más de 30 kDa, termolábiles (se desactivan con tratamientos térmicos de 60-100°C durante 10-15 min), siendo las que menor interés industrial despiertan. Las bacteriocinas de este grupo están producidas por especies del género *Lactobacillus*, aunque recientemente se han identificado también en *Enterococcus* (Cintas *et al.*, 2001).

1.2.1.5.1.4. Otras bacteriocinas

Klaenhammer (1993) sugirió una cuarta clase que incluyera bacteriocinas que requieren un componente glucídico o lipídico para su actividad biológica. Nes *et al.* (1996) propusieron la eliminación de esta categoría debido a que la atribuyen a una caracterización bioquímica incorrecta. Estos datos se apoyan en los resultados de Jiménez-Díaz *et al.* (1995) al demostrar la naturaleza exclusivamente peptídica de la plantaricina S.

Finalmente, existen algunas bacteriocinas que no pueden clasificarse en ninguna de las clases citadas, como la enterocina AS-48 producida por *Enterococcus faecalis* y *Ec. faecium*. La enterocina AS-48 madura tiene cerca de 70 residuos y un tamaño de 7,5 kDa. No contiene aminoácidos modificados como lantionina o β -metil lantionina. Es el primer ejemplo de bacteriocina con una modificación post-traducciona de circularización por una unión cabeza-cola y no por unión de sus cadenas polipeptídicas (Samyn *et al.*, 1994). La enterocina AS-48 se encuentra ampliamente extendida en la naturaleza (Joosten *et al.*, 1997).

1.2.1.5.2. Mecanismo de acción

La formación de poros en la membrana citoplasmática de las células sensibles parece ser un mecanismo de acción común de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas (Klaenhammer, 1993). Este proceso induce la disipación de la fuerza proton-motriz (PMF) (Montville y Bruno, 1994). La PMF es un gradiente electroquímico, compuesto de un potencial de membrana y un gradiente de pH, necesario en distintos

procesos metabólicos celulares dependientes de energía. La formación de poros y la eliminación de esta fuente de energía celular promueven la salida rápida de metabolitos de pequeño tamaño, como aminoácidos y nucleótidos, interrumpiendo los procesos de biosíntesis de la célula (Sahl *et al.*, 1985; Brötz *et al.*, 1998a; b).

La mayoría de las bacteriocinas de las bacterias lácticas interaccionan con la membrana citoplasmática de la célula sensible mediante uniones electrostáticas entre el extremo C-terminal de la bacteriocina cargado positivamente y los lípidos de la membrana cargados negativamente (Moll *et al.*, 1999). Algunas bacteriocinas como la nisina y otros lantibióticos relacionados necesitan un potencial mínimo de membrana para poder insertarse en la membrana y ejercer su acción (Ruhr y Sahl, 1985). En cambio otras bacteriocinas, como la pediocina PA-1, no requieren un determinado estado energético celular para su inserción en la membrana y posterior formación del poro (Chikindas *et al.*, 1993; Cenatiempo *et al.*, 1996). Algunas bacteriocinas, como las lactococinas A y B, son sólo activas frente a células enteras o vesículas derivadas de ellas, por lo que se cree que requieren un receptor localizado en la membrana o en la pared celular (Van Belkum *et al.*, 1991; Venema *et al.*, 1993). La enterocina AS-48 ejerce su función inhibitoria formando poros que permiten la permeabilización de la membrana y la salida de K^+ , Na^+ y compuestos de bajo peso molecular, disipando el potencial de membrana y haciendo a la célula no viable (Gálvez *et al.*, 1989a).

El mecanismo de formación del poro ha sido estudiado por diversos autores usando sistemas de membrana artificiales (Benz *et al.*, 1991; Moll *et al.*, 1996). Se han propuesto distintos modelos. Los lantibióticos tipo A seguirían el modelo de cuña y las bacteriocinas no modificadas de pequeño tamaño y termoestables seguirían el modelo de duela de barril o mecanismo de tapiz (Moll *et al.*, 1999). En el modelo en cuña, el extremo C-terminal de la nisina cargado positivamente y los lípidos unidos penetran en la membrana empujados por los componentes de la fuerza protón-motriz que estimulan la permeabilización de la membrana. La nisina adopta una conformación de tipo alargada anfipática de modo que el lado de la cadena que contiene los aminoácidos hidrofóbicos se sitúa en el lado hidrofóbico de la membrana, mientras que los grupos hidrofílicos interaccionan con la cabeza polar de los fosfolípidos (Van den Hooven *et al.*, 1996b). Este modelo se apoya en las investigaciones de Moll *et al.* (1998), quienes observaron que la nisina inducía en los fosfolípidos movimientos de transmembrana. Brötz *et al.* (1998b) han demostrado que nisina y epidermina interactúan con el lípido II, que actúa como sustrato de la reacción de transglicosilación necesaria para la formación de los peptidoglicanos de la pared celular. El lípido II actuaría como una “molécula estibadora” facilitando la inserción de la bacteriocina en la membrana y, por tanto, la formación de poros (Breukink *et al.*, 1999). En el modelo de duela de barril, los péptidos adoptan una conformación en α -hélice anfipática, de modo que la cara hidrofóbica de la hélice interacciona con las cadenas de ácidos grasos de los lípidos de la membrana, mientras que los grupos hidrofílicos se sitúan hacia el interior formando la

pared interna del poro. El mecanismo en tapiz consistiría en el recubrimiento de la superficie de la membrana por péptidos individuales colocados paralelamente a la misma. Éstos interferirían con la bicapa lipídica, ocasionando una permeabilidad transitoria y local de la membrana por una movilización muy activa de los fosfolípidos (Bechinger, 1997). La concentración mínima inhibitoria (MIC) de las bacteriocinas se ve afectada por la composición fosfolipídica de la cepa diana, así como por el pH del medio (Chen *et al.*, 1997a,b).

Los lantibióticos tipo B actúan inhibiendo funciones enzimáticas al bloquear los sustratos de las reacciones. Para ello se unen a lípidos de membrana específicos, como fosfatidiletanolamina en el caso de cinnamicina (Hosoda *et al.*, 1996) o al lípido II en el caso de mersacidina (Brötz *et al.*, 1998a), inhibiendo la síntesis de fosfolipasa y peptidoglicano.

Además de la formación de poros, para ciertas bacteriocinas se ha descrito la lisis celular como modo de acción secundario. Las bacteriocinas nisina y pep 5 indujeron la lisis de *Staphylococcus simulans* por activación del sistema autolítico del microorganismo (Bierbaum y Sahl, 1987). La enterocina AS-48 exhibió un efecto lítico sobre *Ec. faecalis* S-47 asociado con una activación de las autolisinas (Gálvez *et al.*, 1990).

1.2.1.5.3. Aplicación de bacteriocinas en leche y productos lácteos

Debido a su naturaleza peptídica, las bacteriocinas pueden ser degradadas por enzimas digestivas, resultando de esta manera inocuas para el hombre y su microbiota intestinal. Además, sus propiedades físico-químicas les confieren resistencia a tratamientos térmicos y gracias a su pequeño tamaño pueden difundir con relativa facilidad en los alimentos.

1.2.1.5.3.1. Efectividad y factores limitantes del uso de bacteriocinas

Los factores limitantes de la eficacia de las bacteriocinas en los productos lácteos son diversos. El principal es su reducido espectro inhibitorio, que en muchos casos está restringido a cepas o especies muy relacionadas con la cepa productora, careciendo de efectividad frente a microorganismos patógenos o alterantes Gram-negativos.

La composición química y las condiciones físicas del alimento influyen significativamente en la actividad de la bacteriocina. Su naturaleza proteica les hace susceptibles de interactuar con enzimas proteolíticas o con otras proteínas (Degnan *et al.*, 1993). Debido a su carácter generalmente hidrofóbico, las bacteriocinas pueden interactuar con la grasa de los productos lácteos, lo que disminuye su eficacia. Se ha observado la reducción de la actividad de la nisina frente a *L. monocytogenes* a medida que aumenta la concentración de grasa (Jung *et al.* 1992). Para paliar estos

inconvenientes, se han realizado intentos de encapsular la pediocina en liposomas (Degnan y Luchansky, 1992, Degnan *et al.*, 1993) o incorporar la nisina a micropartículas de alginato cálcico (Cutter y Siragusa, 1996; Wan *et al.*, 1997a), obteniéndose mejores resultados con la segunda estrategia.

La solubilidad y difusión de las bacteriocinas en los alimentos pueden resultar afectadas por factores como el pH (Liu y Hansen, 1990). Algunos aditivos alimentarios como el agente antioxidante metabisulfito sódico o el blanqueante dióxido de titanio, en el caso de la nisina, pueden inhibir la actividad de las bacteriocinas (Delves-Broughton, 1990).

1.2.1.5.3.2. Mejora de la calidad y seguridad microbiológica de productos lácteos mediante bacteriocinas

El uso de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas como cultivos iniciadores o fermentos lácticos ha despertado un interés considerable tanto por parte de los investigadores como de la industria. La nisina es la bacteriocina más estudiada y ha sido reconocida como sustancia segura (GRAS) por la FDA (Ronk, 1988). Se emplea como conservante en más de 50 países, en quesos fundidos, conservas vegetales, huevo pasteurizado, productos de pastelería y bebidas alcohólicas.

La nisina se utiliza como alternativa al nitrato en la prevención de la germinación y desarrollo de esporas de *Clostridium*, añadiéndose con frecuencia en la elaboración de quesos fundidos (Rodríguez, 1996). Resulta eficaz a concentraciones de 250-500 UI/g para quesos contaminados con clostridios no patógenos que producen defectos de sabor y apariencia, y de 500-1.000 UI/g para el control de clostridios patógenos (Sommers y Taylor, 1987). La elaboración de queso Cheddar con lactococos productores de nisina redujo significativamente el deterioro ocasionado por *C. sporogenes* (Zottola *et al.*, 1994).

La adición de 2.000 UI/g de nisina a un queso Cottage inoculado con 10^4 ufc/ml de *L. monocytogenes* dio lugar a un descenso de 3 unidades logarítmicas en los niveles del patógeno después de 7 días a 20°C, mientras que en el control aumentó una unidad logarítmica (Ferreira y Lund, 1996). McAuliffe *et al.* (1999) observaron reducciones de *L. monocytogenes* Scott A en este mismo tipo de queso, utilizando un cultivo productor de lacticina 3147 como iniciador.

El empleo de *Lc. lactis* productores de nisina en la elaboración de queso Camembert dio lugar a reducciones de 2,4 unidades logarítmicas en los niveles de *L. monocytogenes* frente a los de quesos elaborados con *Lactococcus* no productores de bacteriocina (Maisnier-Patin *et al.* 1992). La adición del preparado comercial Nisaplin® (2,5 mg/l) en queso Ricotta inhibió el crecimiento de este mismo patógeno durante al menos 8 semanas (Davies *et al.*, 1997).

En la elaboración de queso Cheddar para untar, el empleo de cultivos productores de nisina resultó efectivo en el control de *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Zottola *et al.*, 1994). Rodríguez *et al.* (2000) comprobaron que la adición de una cepa de *Lc. lactis* productor de nisina junto al fermento comercial en la fabricación de queso tipo Hispánico proporcionaba una mayor protección frente a una eventual contaminación de la leche o la cuajada por *S. aureus*.

En queso elaborado con *Ec. faecalis* INIA 4 productor de enterocina AS-48 como adjunto al fermento comercial, los recuentos de *L. monocytogenes* Ohio descendieron 3 unidades logarítmicas después de 8 h y 6 unidades logarítmicas después de 7 d (Nuñez *et al.*, 1997). En queso tipo Hispánico fabricado con *Lc. lactis* TAB 24 productor de lacticina 481 se obtuvieron reducciones de 2,8 unidades logarítmicas de *L. monocytogenes* después de 60 d, mientras que no se detectó la presencia del patógeno desde las 8 h y hasta el final de la maduración cuando se utilizó *Ec. faecalis* TAB 28 productor de enterocina AS-48 (Rodríguez *et al.*, 2001).

La pediocina PA-1 también se ha empleado con éxito en el control de *L. monocytogenes* en productos lácteos (Motlagh *et al.*, 1992b; Pucci *et al.*, 1988). No se detectó la presencia de *L. monocytogenes* pulverizando *Lb. plantarum* WHE 92 productor de pediocina PA-1 sobre la superficie de queso Munster después de 21 d de maduración (Ennahar *et al.*, 1998).

1.2.2. COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN LA LECHE

1.2.2.1. El sistema lactoperoxidasa

El sistema lactoperoxidasa (LP) está constituido por la enzima lactoperoxidasa, el tiocianato y el peróxido de hidrógeno. La lactoperoxidasa es una glicoproteína con un grupo hemo (De Wit y Van Hooydonk, 1996) que aparece en diversas secreciones biológicas como leche, saliva y lágrimas (Wolfson y Summer, 1993), y que protege a las células del metabolismo tóxico del oxígeno al igual que otras peroxidasa (Reiter y Härnultv, 1984). Es resistente hasta pH 3 y a la acción proteolítica del jugo gástrico (Reiter y Härnultv, 1984), mostrándose más activa a pH ácido (Wever *et al.*, 1982). La cantidad de tiocianato presente en leche depende de la dieta, siendo la hidrólisis de glucosinolatos y la detoxificación de cianuros su principal fuente (Wood 1975). Las especies del género *Brassica* (familia *Cruciferae*) como coliflor, berza y nabo son ricas en glucosinolatos, mientras que los glucósidos cianogénicos se encuentran en maíz, caña de azúcar, guisantes y habas. Las fuentes naturales de peróxido de hidrógeno son los leucocitos polimorfonucleares y el metabolismo de algunas bacterias lácticas catalasa negativas, que en condiciones aerobias producen suficiente cantidad para activar el sistema (Carlsson *et al.*, 1983). Normalmente necesita ser añadido exógenamente de forma química o mediante el empleo de enzimas como la glucosa oxidasa o la xantina oxidasa (Klebanoff *et al.*, 1966).

La lactoperoxidasa cataliza la oxidación del tiocianato por el peróxido de hidrógeno. Esta oxidación da lugar a compuestos intermedios inestables como el ión hipotiocianito (OSCN) y oxiácidos, como el ácido cianosulfuroso (HO₂SCN) y el ácido cianosulfúrico (HO₃SCN) (Pruitt *et al.*, 1982; Wolfson y Summer, 1993) que poseen actividad antimicrobiana. Estos compuestos ejercen su efecto antimicrobiano oxidando los grupos sulfhidrilo de enzimas y proteínas (Aune y Thomas, 1978; Thomas y Aune, 1978). También se ha relacionado la acción del sistema LP con daños en la membrana celular, ocasionando pérdidas de K⁺, aminoácidos y péptidos (Marshall, 1978; Marshall y Reiter, 1980; Reiter y Härnolv, 1984). Posteriormente se inhibe la toma de glucosa, bases nitrogenadas y aminoácidos, así como la síntesis de proteínas, ADN y ARN (Reiter y Härnolv, 1984).

Se ha comprobado un efecto bactericida del sistema LP frente a microorganismos Gram-negativos como *E. coli* y *Sal. typhimurium* (Earnshaw *et al.*, 1990; Farrag *et al.*, 1992a; Wolfson y Summer, 1994). También se ha detectado un efecto bactericida del sistema LP sobre *Y. enterocolitica* en leche cruda, dependiente de los niveles de patógeno y de la temperatura de incubación (Farrag *et al.*, 1992b). Frente a *C. jejuni* se ha observado un efecto bactericida en leche cruda, esterilizada y UHT (Beumer *et al.*, 1985; Borch *et al.*, 1989).

Sobre microorganismos Gram-positivos como *L. monocytogenes* ha sido descrito como bacteriostático (Kamau *et al.*, 1990a) y bactericida (El-Shenawy *et al.*, 1990; Gaya *et al.*, 1991; Zapico *et al.*, 1993; Rodríguez *et al.*, 1997). Frente a *S. aureus* se observó, tanto a 37°C como a 10°C, un efecto bactericida después de activar el sistema en la leche (Kamau *et al.*, 1990a). El sistema LP aumenta la destrucción térmica de *L. monocytogenes* y *S. aureus* en leche (Kamau *et al.*, 1990b).

La activación del sistema LP permite prolongar la vida útil y mejorar la calidad de la leche cruda y pasterizada (Zajac *et al.*, 1983; Kamau *et al.*, 1984, 1991; Martínez *et al.*, 1988; Marks *et al.*, 2001) y ha sido ensayado con éxito, como método alternativo a la refrigeración, en varios países. También ha sido aplicado en la mejora de la calidad microbiológica del queso (Denis y Ramet, 1989; Earnshaw *et al.*, 1989; Santos *et al.*, 1995; Atamer *et al.*, 1999).

1.2.2.2. Lactoferrina

La lactoferrina forma parte del sistema de inmunodefensa natural de la leche. Es una glicoproteína secuestradora de hierro que se encuentra en leche, otros fluidos fisiológicos y leucocitos polimorfonucleares (Masson *et al.*, 1969). Es estable al calor (90°C durante 60 min) (Reiter y Oram, 1967). Diversos autores han descrito su capacidad inhibitoria frente a microorganismos como *L. monocytogenes*, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *S. aureus*, *Klebsiella* o *E. coli* (Nagasawa *et al.*, 1972; Reiter, 1978; Mandel y Ellison, 1985; Payne *et al.*, 1990). Su actividad es dependiente de la

concentración, el grado de saturación de hierro (Weinberg, 1978) y de la interacción con otros componentes de la leche (Lonnerdal, 1985). También se ha descrito un péptido antimicrobiano derivado de la hidrólisis ácida con pepsina de la lactoferrina humana y bovina denominado lactoferricina. Este péptido es bactericida frente a un amplio espectro de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como levaduras (Jones *et al.*, 1994).

1.2.2.3. Liozima

La liozima está presente en diversos sistemas naturales como plantas, leche, lágrimas o huevos (Conner, 1993). Es una N-acetilhexosaminidasa, clasificada como una muramidasa (Board, 1969). En huevo de gallina puede suponer un 3,5% del peso seco (Banwart, 1979). La liozima lisa la pared celular de las bacterias por hidrólisis de los enlaces $\beta(1-4)$ de la barrera de peptidoglicano (Powrie y Nakai, 1986; Van Demark y Batzing, 1987), siendo las bacterias Gram-positivas más susceptibles a la acción de esta enzima que las Gram-negativas. La adición de liozima es utilizada para impedir el desarrollo de las esporas de *Clostridium* en quesos (Scott *et al.*, 1987).

1.2.3. NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS

La industria láctea busca continuamente el desarrollo de nuevos métodos que sirvan para mejorar la calidad de los alimentos producidos. Frente a los métodos térmicos de conservación, aparecen nuevas tecnologías dirigidas a satisfacer las características organolépticas y nutricionales de los consumidores, manteniendo o mejorando la seguridad de los productos.

1.2.3.1. Altas presiones

Se entiende por altas presiones la tecnología que utiliza presiones de trabajo comprendidas entre 100 y 1.000 MPa. En las aplicaciones a temperaturas inferiores a 50°C se consigue la inactivación de las células vegetativas microbianas alterando mínimamente el aroma, sabor o color de los alimentos (Cheftel, 1995), aunque esto depende en gran medida del tratamiento empleado y de las características del producto inicial. Paralelamente al objetivo de reducir la carga microbiana del producto, las materias primas también pueden ser tratadas con el fin de conservar o mejorar su funcionalidad para la posterior elaboración de derivados.

La resistencia de los microorganismos a la presión es muy variable, siendo las bacterias Gram-positivas más resistentes que las Gram-negativas (Cheftel, 1995; Tewari *et al.*, 1999), aunque estudios más recientes sugieren que la morfología juega un papel importante, mostrándose más sensibles las células con forma bacilar y más resistentes las esféricas (Ludwig y Schreck, 1997). Las esporas bacterianas muestran una

resistencia muy superior a la de las formas vegetativas y pueden sobrevivir a presiones de 1.000 MPa (Guamis, 2000).

La utilidad de la alta presión para retrasar la acidificación de la leche fue señalada por Hite *et al.* en 1897 (Johnston, 1995). Actualmente se ha conseguido alargar la vida útil de la leche cruda almacenada a 10°C hasta 10 días aplicando tratamientos de 400 MPa/30 min o 500 MPa/8 min (Rademacher y Kessler, 1997). López-Fandiño *et al.* (1996) observaron reducciones de las bacterias psicrotrofas de leche cruda hasta el nivel de detección (10 ufc/ml) con un tratamiento de 300 MPa/25°C/30 min o 400 MPa/25°C/10 min. Se ha desarrollado un equipo piloto capaz de tratar 200 l/h de leche a una presión de 380 MPa y que proporciona reducciones de la microbiota aerobia de la leche de 3 unidades logarítmicas (Sionneau *et al.*, 1997).

Diversos estudios frente a *L. innocua*, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *S. aureus* y *Lb. helveticus* inoculados en leche de oveja mostraron a *P. fluorescens* como el más sensible y a *S. aureus* y *Lb. helveticus* como los más resistentes a la inactivación por alta presión (Gervilla *et al.*, 1997a,b; 1999a,b).

Styles *et al.* (1991) observaron una reducción de *L. monocytogenes* de 6 unidades logarítmicas en leche cruda y de 5 unidades logarítmicas en leche UHT con un tratamiento de 340 MPa/23°C/1 h. En nata líquida UHT (35% grasa) se obtuvieron reducciones de 4 unidades logarítmicas frente a este mismo microorganismo con 450 MPa/25°C/30 min (Rafalli *et al.*, 1994).

Reps *et al.* (1997) han estudiado el efecto de la aplicación de presiones entre 50 y 1.000 MPa sobre los microorganismos de quesos en distintos periodos de la maduración, concluyendo que la inactivación de los microorganismos aumenta con la presión, excepto en el caso de las esporas, que los tratamientos cíclicos aumentan la reducción de las poblaciones microbianas y que la alta presión mejora la propiedades organolépticas del queso, sobre todo su consistencia.

E. coli y *S. aureus* se eliminaron completamente en un sistema modelo de queso Cheddar inoculado con 10^7 ufc/ml de cada uno de los patógenos mediante un tratamiento de 500 MPa/30°C/20 min y 700 MPa/20°C/20 min respectivamente (O'Reilly *et al.*, 1999a,b). Utilizando presiones de 400, 450 y 500 MPa a temperaturas de 2, 10 y 25°C durante tiempos de entre 5 y 15 min, *E. coli* fue eliminado totalmente en queso fresco de cabra (Capellas *et al.*, 1996).

Las altas presiones también han sido utilizadas para acelerar la maduración de quesos, existiendo una patente para reducir el tiempo de maduración de seis meses a tres días utilizando presiones continuas de entre 10 y 250 MPa (Yokoyama *et al.*, 1993).

1.2.3.2. Irradiación

El proceso de irradiación consiste en exponer los alimentos, envasados o a granel, a una fuente de radiación ionizante durante un tiempo controlado para reducir o eliminar los patógenos asociados y/o aumentar la vida útil del producto. Las fuentes de radiación que pueden emplearse en alimentos son: rayos gamma de Co^{60} y Cs^{137} , rayos X y electrones acelerados. Numerosos estudios han concluido que los alimentos irradiados con dosis inferiores a 10 kGy se consideran seguros (WHO, 1981; WHO, 1994).

La efectividad de las radiaciones ionizantes frente a microorganismos patógenos como *L. monocytogenes*, *A. hydrophila*, *Y. enterocolítica*, *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* ha sido descrita por diversos autores (Radomyski *et al.*, 1994; Tauxe, 2001).

En quesos tipo Camembert y tipo Limburger se han obtenido reducciones de *L. monocytogenes* de entre 10^4 y 10^6 ufc/g utilizando radiaciones de hasta 3 kGy, sin modificar las propiedades sensoriales del queso (Bougle y Stahl, 1994; Ennahar *et al.*, 1994; Cecchi *et al.*, 1995).

Se ha aplicado irradiación frente a diversas bacterias patógenas como *E. coli*, *Sal. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* o *B. cereus* en quesos italianos, observándose una disminución de sus niveles sin afectar significativamente a organismos beneficiosos como bacterias lácticas, levaduras y mohos (Cecchi *et al.*, 1996; Vosniakos y Hatzioannou, 1997).

La aplicación de radiaciones gamma de 1 kGy fueron suficientes para eliminar *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* y *E. coli* O157:H19 en helados, sin alterar sus propiedades sensoriales (Kamat *et al.*, 2000).

1.2.3.3. Pulsos eléctricos de alto voltaje

Los tratamientos mediante pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF) consisten en la aplicación de campos eléctricos de alta intensidad (10-50 kV/cm) de forma intermitente, durante periodos de tiempo del orden de microsegundos (1-100 μs). Estos tratamientos provocan la inactivación de los microorganismos por el fenómeno denominado electroporación, que consiste en la formación de poros en las membranas celulares (Zimmerman, 1986). Sobre la inactivación microbiana influyen las condiciones del tratamiento (fuerza del campo eléctrico, forma del pulso, anchura del pulso, energía del pulso, frecuencia, tiempo de tratamiento y temperatura) así como las características de los microorganismos y del medio (Alvarez *et al.*, 2000). Las levaduras son los microorganismos más sensibles, mientras que las bacterias Gram-negativas son más sensibles que las Gram-positivas (Hülshager *et al.*, 1983). Durante el tratamiento se produce un pequeño aumento de la temperatura que no afecta a las propiedades del

alimento. Además, el efecto bactericida de estos tratamientos aumenta con la temperatura.

La inactivación de microorganismos como *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* o *S. aureus* en leche mediante el empleo de campos eléctricos pulsantes ha sido estudiada por diversos autores (Pothakamury *et al.*, 1995; Martín *et al.*, 1997; Sensoy *et al.*, 1997; Reina *et al.*, 1998; Dutreux *et al.*, 2000). Se ha demostrando su potencial como método alternativo a la pasteurización térmica de alimentos. Actualmente existen prototipos para la pasteurización en continuo de líquidos mediante esta técnica (Qin *et al.*, 1995).

La aplicación de PEF y temperaturas de 105 y 112°C en leche con cacao aumentó la vida útil del producto durante su almacenamiento a 4, 22 y 37°C (Evrendilek *et al.*, 2001). Rowan *et al.* (2001) obtuvieron reducciones de *M. paratuberculosis* de 5,9 unidades logarítmicas al tratar la leche con PEF a 50°C, mientras que con una pasteurización alta (72°C/25 s) se obtienen reducciones de 2,4 unidades logarítmicas.

Sepúlveda-Ahumada *et al.* (2000) proponen mejorar la calidad del queso Cheddar mediante el uso de leche tratada con PEF como alternativa a la pasteurización térmica.

1.2.3.4. Microondas

Las microondas son una forma de energía que se manifiesta como calor cuando interactúan con moléculas polares (agua, proteínas y carbohidratos, fundamentalmente) o iones cargados del alimento. Este calentamiento es provocado por el movimiento y fricción de moléculas e iones. Se ha demostrado que la inactivación de los microorganismos se debe al calor que se origina dentro del alimento (Díaz-Cinco y Martinelli, 1991). Los tratamientos térmicos con microondas pueden presentar ventajas en tiempo y energía sin reducir la calidad del producto. Las microondas pueden utilizarse en distintos procesos tales como descongelación, escaldado, secado, cocción, pasteurización y esterilización. Tanto las características del equipo (potencia, frecuencia y distribución del campo electromagnético, movimiento del producto, etc.) como la naturaleza del alimento son parámetros fundamentales en el calentamiento por microondas.

La pasteurización de la leche por microondas fue aplicada por primera vez por Hamid *et al.* (1969), y posteriormente por otros autores (Chiu, *et al.*, 1984; Kudra *et al.*, 1991). La falta de uniformidad en los tratamientos es uno de los problemas más descritos, y da lugar a “puntos fríos” donde los microorganismos no se encuentran sometidos a las condiciones que provocan su letalidad. La inactivación por microondas de patógenos como *Clostridium perfringens*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Salmonella* aparece reflejada en la literatura (Rosenberg y Bögl, 1987; Heddleson y Doores, 1994; Heddleson *et al.*, 1996). La resistencia al tratamiento depende del propio

microorganismo así como de las características del alimento donde se encuentre (Choi *et al.*, 1993; Heddleson *et al.*, 1996).

Las modificaciones de las características sensoriales (Valero *et al.*, 1999; 2000) y nutricionales (Merin y Rosenthal, 1984; Sierra y Vidal-Valverde, 2000a,b) de la leche tratada con microondas han sido motivo de estudio en los últimos años.

1.2.3.5. Otras tecnologías

1.2.3.5.1. Ultrasonidos

Los ultrasonidos son ondas sonoras con una frecuencia superior a la perceptible por el oído humano (>16 kHz). Cuando los ultrasonidos de alta intensidad (20-100 kHz) se transmiten a un medio líquido, provocan el fenómeno de la cavitación, que consiste en la formación, crecimiento y súbita implosión de burbujas. Esta implosión libera gran cantidad de energía, alcanzándose, en el seno del líquido, elevadas temperaturas (5.000°C) y presiones (1.000 atm) (Suslick, 1990) que provocan la aparición de intensas fuerzas de cizalla y la formación de radicales libres, aunque esto no supone un aumento importante en la temperatura del medio.

El efecto bactericida de los ultrasonidos fue descrito en 1929 por Harvey y Loomis. En 1972, Burgos *et al.* observaron que la aplicación de un tratamiento ultrasónico previo sensibilizaba a determinados microorganismos esporulados a un tratamiento térmico. La termoultrasonificación (aplicación de un tratamiento térmico y ultrasonidos simultáneamente) mejoró el efecto bactericida (Ordóñez *et al.*, 1987; García *et al.*, 1989). También existen trabajos de inactivación de microorganismos mediante tratamientos de manosonificación (aplicación de ultrasonidos bajo presión) y manotermoultrasonificación (tratamientos combinados de ultrasonidos bajo presión y calor) (Raso, 2000). Los microorganismos muestran diferente resistencia a la ultrasonificación, mostrándose los cocos más resistentes que los bacilos (Jacobs y Thornley, 1954), las esporas bacterianas mucho más que las células vegetativas y las bacterias Gram-positivas más que las Gram-negativas (Pagán *et al.*, 1999a).

La aplicación de ultrasonidos en agua peptonada provocó reducciones de cuatro unidades logarítmicas en *Sal. eastbourne*, mientras que en leche con cacao la reducción fue de menos de una unidad logarítmica (Lee *et al.*, 1989). Por otro lado, la resistencia de *L. monocytogenes* a un tratamiento de manosonificación fue la misma en leche desnatada que en tampón McIlvaine de pH 7 (Pagán *et al.*, 1999b). La imposibilidad de obtener a escala industrial las intensidades ultrasónicas que se obtienen en el laboratorio limitan, por el momento, su aplicación.

1.2.3.5.2. Calentamiento óhmico

Este tratamiento se basa en la generación de calor que se produce en un alimento al ser atravesado por una corriente eléctrica debido a la resistencia eléctrica del mismo (Skudder, 1989). Existen tres mecanismos por los cuales el calentamiento óhmico provoca la muerte microbiana: daños mecánicos en la membrana celular, formación de radicales libres y efectos térmicos (Palaniappa *et al.*, 1990). El calentamiento óhmico resulta afectado por el tamaño, forma, densidad, sustrato y conductividad de la formulación alimentaria (Zoltai y Swearinger, 1996). Entre las primeras aplicaciones se propuso la pasterización de la leche (Anderson y Finkelstein, 1919), pero la tecnología desaparecería unos años más tarde debido a que el material del electrodo no era adecuado. En los últimos años se han desarrollado nuevos materiales y plantas de procesado para el tratamiento de salsas, vegetales, pastas, zumo de frutas y leche (Bhat y Joshi, 1998).

1.2.3.5.3. Microfiltración

La microfiltración (MF) es un proceso de filtración por presión basado en el principio de permeabilidad selectiva. El objetivo de este procedimiento es la depuración bacteriana de la leche o el lactosuero alterando lo menos posible la composición química de estos productos. Uno de los principales problemas cuando se utilizan sistemas de filtración de membrana es la formación de un depósito de colmatado en la membrana que provoca un descenso del caudal de permeación. Actualmente se utilizan membranas cerámicas (Pedersen, 1991) y la aplicación de una presión transmembrana uniforme (Sandblom, 1974; Kessler, 1997). El diámetro de las bacterias es similar al de los glóbulos grasos de la leche, por lo que es necesario desnatar la leche antes del proceso de MF. Normalmente se elige un tamaño de poro de 1,4 μ , que retiene gran cantidad de bacterias, esporas y células somáticas y permite el paso de la máxima cantidad de micelas de caseína (Jensen *et al.*, 1992; Kessler, 1997). El proceso "Bactocatch" es el sistema más utilizado y consta de una planta de MF para la leche desnatada y una sección para el calentamiento a alta temperatura de la mezcla de nata y el concentrado procedente de la MF. Se utiliza en leche de consumo, así como para controlar la flora butírica presente en leche destinada a la fabricación de quesos.

1.3. TRATAMIENTOS COMBINADOS Y SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA

La estabilidad y seguridad microbiológica de los alimentos está basada en la combinación de diferentes factores o barreras que no son superados por los microorganismos presentes. La aplicación adecuada de esta tecnología de barreras u obstáculos ha demostrado tener ventajas en la calidad y seguridad del alimento, así como económicas.

Las bacterias que sufren daños subletales como consecuencia de un tratamiento físico o químico pueden hacerse sensibles a inhibidores a los que normalmente eran resistentes (Ray, 1993). Esta premisa puede ser aplicada en la tecnología de barreras tanto para ampliar o intensificar el efecto antimicrobiano frente a patógenos, como para evitar la aparición de patógenos dañados no detectables por los métodos normalizados y que posteriormente pueden desarrollarse en condiciones favorables y producir enfermedad.

El uso de distintos tratamientos inhibitorios con efecto sinérgico puede dar lugar a alimentos menos procesados pero más eficientemente conservados. En la práctica, es preferible el uso de diferentes conservantes en pequeñas cantidades que usar uno sólo en mayor cantidad (Leistner, 1995).

1.3.1. EMPLEO DE BACTERIOCINAS EN TRATAMIENTOS COMBINADOS

El uso de bacteriocinas de bacterias lácticas en alimentos presenta una serie de limitaciones relativas a su reducido espectro de inhibición y su falta de eficacia frente a bacterias Gram-negativas, así como la posible aparición de resistentes en las cepas sensibles a las bacteriocinas.

La aparición de bacterias resistentes a bacteriocinas es frecuente (Jarvis, 1967; Harris *et al.*, 1991; Ming y Daeschel, 1993; Rekhif *et al.*, 1994). Se han identificado mecanismos de resistencia a nisina en plásmidos diferentes al del operón de la nisina (Froseth y McKay, 1991), así como proteinasas como la nisinasa (Muriana, 1996). En *L. monocytogenes* este mecanismo de resistencia se adquiere incrementando la proporción de ácidos grasos saturados y mediante una reducción de los fosfolípidos de la membrana celular, lo que requiere la presencia de cationes divalentes. Además, se produce una reducción de la hidrofobicidad de la membrana (Ming y Daeschel, 1993; Mazzotta y Montville, 1997). En esporas y células vegetativas de *Clostridium botulinum* resistentes a nisina, también se han observado cambios similares en los ácidos grasos de la membrana celular (Mazzotta y Montville, 1999). En *L. innocua* se produce un engrosamiento de la pared celular (Maisnier-Patin y Richard, 1996).

Entre las soluciones planteadas para paliar las limitaciones del empleo de bacteriocinas en alimentos se encuentra la aplicación de tratamientos combinados con otros sistemas inhibitorios.

1.3.1.1. Combinaciones de bacteriocinas

Se ha sugerido que las bacterias Gram-positivas pueden tener varios receptores específicos para distintas bacteriocinas, por lo que el empleo de más de una bacteriocina podría ser efectivo frente a un mayor número de células y evitaría la aparición de resistencias (Hanlin *et al.*, 1993)

La combinación de pediocina PA-1 y nisina aumentó la capacidad inhibitoria frente a *L. monocytogenes*, *Clostridium* y diversas bacterias lácticas respecto de los tratamientos individuales (Hanlin *et al.* 1993). El uso de curvaticina 13 y nisina mostró un efecto sinérgico al inhibir totalmente un inóculo de $1,5 \times 10^4$ ufc/ml de *L. monocytogenes* en caldo TSBYE (Bouttefroy y Millière, 2000). También se observó un mayor efecto bactericida frente a este microorganismo al combinar nisina y leucocina F10 respecto al de las bacteriocinas adicionadas individualmente en caldo de cultivo TSBYE (Parente *et al.*, 1998).

La combinación de nisina con *Lb. sake* productor de sakacina A o *Ec. faecium* productor de enterocina B evitó el crecimiento de *L. monocytogenes* resistentes a nisina en caldo nutritivo (Schillinger *et al.*, 1998). En tofu se obtuvieron resultados similares al aplicar estos tratamientos (Schillinger *et al.*, 2001).

Mulet-Powell *et al.* (1998) estudiaron el efecto de la combinación de pares de bacteriocinas (nisina, pediocina PA-1, lacticina 481, lactacina F y lactacina B) frente a diez indicadores en medio líquido y sólido. La pediocina dio lugar a numerosos efectos sinérgicos, a diferencia de la lacticina 481 que produjo efectos antagónicos.

1.3.1.2. Bacteriocinas con otros tratamientos o conservantes

La resistencia de los microorganismos Gram-negativos a muchos agentes antimicrobianos se debe en gran medida a la estabilidad que proporciona la cubierta externa de lipopolisacáridos (Abee *et al.*, 1995; Abriouel *et al.*, 1998). La permeabilización de esta capa externa permitiría la actuación de las bacteriocinas en la membrana citoplasmática de los microorganismos. Ray (1993) sugirió la aplicación de bacteriocinas en combinación con otros tratamientos o conservantes para aumentar su efectividad en el control de bacterias Gram-negativas.

Se ha observado que el uso de agentes quelantes como EDTA, HTM, oxietilenonitrilo, ácido tetraacético, citrato, lactato y determinados fosfatos incrementan la eficacia de la nisina frente a patógenos como *E. coli* O157:H7 y *Salmonella*, así como frente a otras bacterias Gram-negativas (Stevens *et al.*, 1991, 1992; Delves-Broughton, 1993; Bridgeman y Zottola, 1994; Cutter y Siragusa, 1995a y b; Carneiro de Melo *et al.*, 1998).

La conservación de alimentos mediante películas plásticas impregnadas con bacteriocinas y agentes quelantes ha sido ensayada con éxito por diferentes autores (Wilhoit, 1996; Natrajan y Sheldon, 2000; Cutter *et al.*, 2001).

La adición de nisina a la leche junto con la activación del sistema LP mostró un efecto inhibitorio sinérgico sobre *L. monocytogenes*, siendo más pronunciado cuando ambos

antimicrobianos se añadieron a diferentes tiempos (Zapico *et al.*, 1998; Boussouel *et al.*, 2000).

También se detectó un efecto sinérgico con el tratamiento simultáneo de nisina (10-50 UI/ml) y etanol (2-7% v/v) frente a *L. monocytogenes* en caldo TSB, en un intervalo de temperaturas de 5 a 37°C (Brewer *et al.*, 2002).

Diversas bacterias patógenas Gram-negativas resistentes a pediocina y nisina se convirtieron en sensibles después de tratarlas con ácido o someterlas a un proceso de calentamiento suave, altas presiones hidrostáticas, electroporación o congelación (Kalchayanand *et al.*, 1992, 1994).

La sensibilidad de *L. monocytogenes* a los tratamientos térmicos moderados en leche desnatada aumentó en presencia de nisina (Maisnier-Patin *et al.*, 1995). Por otra parte, el calentamiento a 55°C produjo daños subletales en *Sal. enteritidis* y sensibilizó a este microorganismo a la acción de la nisina (Boziaris *et al.*, 1998).

La inhibición de *B. cereus* mediante nisina resultó más eficaz a bajas temperaturas y pH ácido (Jaquette y Beuchat, 1998). La adición de nisina en leche aumenta la sensibilidad de las esporas de *B. cereus* y *B. stearothermophilus* al calor y puede evitar la germinación de las supervivientes al tratamiento térmico (Wandling *et al.*, 1999; Beard *et al.*, 1999).

Las altas presiones en combinación con bacteriocinas han recibido mucho interés como tratamiento combinado. La acción conjunta de altas presiones (345 MPa/25°C/5 min) y pediocina PA-1 produjeron una disminución en los niveles de *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 de 1,7, 2,1 y 0,6 log ufc/ml respectivamente, en comparación con el mismo tratamiento sin bacteriocina (Kalchayanand *et al.*, 1998). La adición de nisina en huevo batido tratado con altas presiones hidrostáticas (450 MPa/20°C/10 min) aumentó la muerte de *L. innocua* y *E. coli* (Ponce *et al.*, 1998). Hugas *et al.* (2001) obtuvieron mayores reducciones de *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *Salmonella* al presurizar (600 MPa/17°C/6 min) jamón cocido y jamón curado loncheado junto a enterocinas A y B, sakacina K, pediocina PA-1 ó nisina. Estos mismos autores también observaron, en un homogeneizado de jamón cocido, un mayor efecto inhibitorio de la alta presión (400 MPa/17°C/10 min) así como una menor recuperación de *E. coli*, *Salmonella* y *L. monocytogenes*, cuando las bacteriocinas mencionadas anteriormente fueron adicionadas al producto.

La combinación de lacticina 3147 con altas presiones (150-275 MPa/25°C/30min) tuvo un efecto inhibitorio sinérgico frente a *S. aureus* y *L. innocua* en leche desnatada reconstituida y suero lácteo, respectivamente (Morgan *et al.*, 2000). La combinación de altas presiones (200 MPa/10°C/10 min) y nisina produjo reducciones de *E. coli* superiores a 6 unidades logarítmicas en caldo BHI (Ter Steeg *et al.*, 1999). El empleo de

ciclos de altas presiones (550 MPa/20°C/10 min) en leche aumentó el efecto antimicrobiano de la nisina y/o la lisozima frente a *E. coli* (García-Graells *et al.*, 1999).

La eficacia de los tratamientos con PEF frente a *B. cereus*, *E. coli* y *L. innocua* aumentó al ser combinados con nisina (Calderón-Miranda *et al.*, 1999; Terebiznik *et al.*, 2000; Pol *et al.*, 2001).

También, la actividad antibacteriana de la combinación de NaCl y bacteriocinas ha sido estudiada por distintos autores, observándose resultados variables dependiendo de la bacteriocina utilizada, el microorganismo diana y las condiciones del experimento.

La disminución de la temperatura, el aumento de la concentración de NaCl y la adición de nisina actuaron de forma sinérgica en la reducción de *S. aureus*. El efecto de la nisina frente a *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 se vio favorecido a altas concentraciones de NaCl (Thomas y Wimpenny, 1996; Gänzle *et al.*, 1999; Pawar *et al.*, 2000).

Boutterfroy *et al.* (2001) observaron un incremento de la acción bactericida de la curvaticina 13 frente a *L. monocytogenes* a valores de pH bajos, mientras que la adición de NaCl disminuyó la acción de la bacteriocina en las primeras 12 h de incubación, pero posteriormente retrasó el crecimiento del microorganismo.

El NaCl actuó de forma antagónica frente a la acción inhibidora de la pediocina PA-1 y la nisina sobre *Lb. sakei* (Budde y Rasch, 2001), así como en el desarrollo de las esporas de *B. licheniformis* (Bell y De Lacy, 1985). Por otra parte, Nuñez *et al.* (1998) observaron que la exposición de *E. coli* a una preparación comercial de nisina aumentaba la halotolerancia de este microorganismo, atribuyéndose el efecto al NaCl presente en la preparación.

1.3.2. OTROS TRATAMIENTOS COMBINADOS

La aplicación simultánea del péptido antimicrobiano magainina II amida y un calentamiento a 55°C tuvo un efecto inhibitorio sinérgico frente a *L. monocytogenes* y *E. coli* (Ueckert *et al.*, 1998).

El ácido láctico sensibiliza bacterias Gram-negativas como *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica* y *Pseudomonas aeruginosa* a la acción de detergentes o lisozima mediante la permeabilización de la membrana externa (Alakomi *et al.*, 2000).

Los tratamientos de altas presiones también se han ensayado con otros sistemas inhibitorios. La aplicación de 400 MPa/20°C/15 min en leche con el sistema LP activado dio lugar a un efecto inhibitorio sinérgico frente a *L. innocua*, mientras que no se incrementó la reducción producida por las altas presiones aplicadas individualmente frente a *E. coli* (García-Graells *et al.*, 2000).

Masschalck *et al.* (2001a) estudiaron la inactivación de *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *P. fluorescens* y *S. aureus* al combinar lactoferrina, lactoferrina hidrolizada con pepsina y lactoferricina con altas presiones (155-400 MPa/20°C/15 min) en tampón fosfato. Los resultados con lactoferrina hidrolizada y lactoferricina resultaron muy similares y superiores a los de la lactoferrina frente a microorganismos Gram-negativos.

El empleo de lisozima incrementó el efecto bactericida de las altas presiones (155-300 MPa/20°C/15 min) sobre *E. coli*, *P. fluorescens* y *Shigella* en tampón fosfato (Masschalck *et al.*, 2001b).

1.4. OBJETIVOS

Las toxiinfecciones asociadas al consumo de alimentos continúan siendo un problema sanitario y económico en los países desarrollados. Por otro lado, los consumidores demandan alimentos poco procesados y con menos aditivos, por lo que la industria está interesada en tratamientos alternativos a los métodos convencionales de conservación de alimentos.

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es la búsqueda de tratamientos combinados de bacteriocinas y otros sistemas inhibitorios que mejoren la seguridad microbiológica de la leche y los productos lácteos.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Aislar lactobacilos productores de reuterina y aplicar este compuesto purificado como antimicrobiano frente a distintos microorganismos patógenos.
- Investigar distintas combinaciones de bacteriocinas, sistema LP, citrato y reuterina en la inhibición de microorganismos patógenos en leche y cuajada.
- Investigar la aplicación de tratamientos combinados de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas y altas presiones hidrostáticas en la inhibición de microorganismos patógenos en queso.

2.1. MICROORGANISMOS EMPLEADOS

2.1.1. BACTERIAS PATÓGENAS

Las bacterias patógenas empleadas en las distintas experiencias proceden de las siguientes colecciones e instituciones: Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España), American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.), Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM-LMG, Gent, Bélgica), Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, Jouy-en-Josas, Francia) y Food and Drug Administration (FDA, Cincinnati, OH, EE.UU.).

Se utilizaron las siguientes cepas:

- *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* serovar typhi CECT 409
- *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894
- *Campylobacter jejuni* LMG 6629
- *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* CECT 398
- *Yersinia enterocolitica* CECT 559
- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CECT 4013 y CECT 976
- *Listeria monocytogenes* Ohio y Scott A
- *Bacillus cereus* CECT 5144

2.1.2. BACTERIAS LÁCTICAS PRODUCTORAS DE BACTERIOCINAS

Las cepas empleadas en este trabajo y citadas a continuación pertenecen a las colecciones de cultivos del Departamento de Tecnología de Alimentos del INIA.

- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* TAB 24, productor de lacticina 481
- *Lc. lactis* subsp. *lactis* TAB 26, productor de nisina Z
- *Lc. lactis* subsp. *lactis* TAB 50, productor de nisina A
- *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetyllactis TAB 57, productor de la bacteriocina no caracterizada TAB 57
- *Enterococcus faecium* TAB 7, productor de la bacteriocina no caracterizada TAB 7
- *Ec. faecalis* TAB 52, productor de enterocina I
- *Ec. faecalis* TAB 70, productor de enterocina AS-48
- *Ec. faecalis* INIA 4, productor de enterocina AS-48

Como indicador en las pruebas de determinación de actividad bacteriocina en queso y cuajada se utilizó la cepa *Clostridium tyrobutyricum* NZ 8.

2.1.3. LACTOBACILLUS REUTERI PRO 137 PRODUCTOR DE REUTERINA

El aislado *Lb. reuteri* PRO 137 fue identificado y seleccionado según se indica en el apartado 2.4.2., para la producción de reuterina.

Se utilizaron además las cepas *Lb. reuteri* CECT 925T y *Lb. fermentum* CECT 4007T.

Para cuantificar la actividad inhibitoria de la reuterina se utilizó la cepa *E. coli* K12 CECT 433.

2.2. TRATAMIENTOS INHIBITORIOS INVESTIGADOS

2.2.1. BACTERIOCINAS

Las bacteriocinas utilizadas en el presente trabajo fueron nisina comercial y bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas indicadas en 2.1.2.

La nisina se añadió en todos los casos a una concentración final de 100 UI/ml a partir de una solución de 10.000 UI/ml obtenida disolviendo Nisaplin (Aplin & Barrett LTD, Reino Unido) en HCl 0,02 N (pH 2). La solución se conservó en alícuotas a -40°C hasta su uso en los experimentos.

Las demás bacteriocinas se añadieron como sobrenadantes neutralizados y filtrados de los cultivos bacteriocinogénicos. Las bacterias lácticas productoras de bacteriocina se cultivaron en caldo MRS durante 18 h a 30°C y se centrifugaron a 10.000 x g durante 15 min a 4°C en una centrífuga Sorvall Superspeed RC2-B (Sorvall Products, Wilmington, DE, EE.UU.). El pH de los sobrenadantes se ajustó a 6,5 con NaOH 1 N, se filtró utilizando un filtro de 0,22 µm de baja retención de proteínas (Millipore Corporation, Bedford, MA, EE.UU.) y se congeló en alícuotas a -40°C hasta su uso.

La actividad bacteriocinogénica de los sobrenadantes se determinó por duplicado después de cada extracción por el método de la dilución crítica. Para ello, se depositaron 50 µl de diferentes diluciones dobles seriadas del sobrenadante en pocillos realizados sobre placas de agar MRS inoculado con *L. monocytogenes* Ohio al 0,02%. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. Una unidad arbitraria (UA) se define como el recíproco de la dilución mayor en la que se puede observar halo de inhibición. La actividad se expresa en UA/ml.

La actividad de cada una de las bacteriocinas presente en los sobrenadantes de los cultivos bacteriocinogénicos se resume en la siguiente tabla.

Cepa bacteriocinogénica	Bacteriocina	UA/ml
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> TAB 24	Lacticina 481	1.280
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar diacetyllactis TAB 57	TAB 57	1.280
<i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	5.120
<i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	2.560
<i>Ec. faecalis</i> TAB 70	Enterocina AS-48	5.120
<i>Ec. faecalis</i> TAB 20	TAB 20	1.280

2.2.2. SISTEMA LACTOPEROXIDASA

El sistema LP se activó mediante la adición de 0,2 U/ml de LP bovina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), 1 mM de NaSCN (Merck, Darmstadt, Alemania) y 1 mM de H₂O₂ (Fluka, Buchs, Suiza). Los reactivos se añadieron siempre siguiendo este orden.

Se preparó una solución de LP de 5 mg/ml en agua desionizada y se filtró mediante un filtro de 0,22 µm de baja retención de proteínas. Esta solución se repartió en alícuotas y se guardó protegida de la luz a -40°C durante un periodo máximo de 6 meses. El NaSCN se añadió a partir de una solución 100 mM esterilizada a 121°C durante 15 min y el H₂O₂ se preparó justo antes de su empleo a una concentración 100 mM, y se mantuvo en hielo y protegido de la luz hasta su uso.

La actividad LP se determinó por duplicado según el método de Marshall *et al.* (1986), siguiendo la oxidación del ácido 2,2'-azinodi-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) (Sigma) a 412 nm. Para ello, se preparó el blanco de la reacción añadiendo a una cubeta de vidrio 2,95 ml de una solución de ABTS 1 mM en tampón acetato 0,1 M pH 4,5 y 30 µl de una solución de LP 15 µg/ml. A continuación, se añadieron 30 µl de una solución de H₂O₂ 10 mM en tampón acetato. La oxidación del ABTS se siguió mediante la determinación de los valores de absorbancia durante 5 min, a 10 lecturas por minuto, utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 650 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, EE.UU.).

Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de un micromol de sustrato (ABTS) por minuto, a 20°C en tampón acetato 0,1 M a una concentración de ABTS 1 mM y H₂O₂ 0,1 mM, y es equivalente a un cambio en la absorbancia a 412 nm de 32,4 por minuto (Shindler *et al.*, 1976). La pendiente de la recta de regresión obtenida proporciona la absorbancia por minuto a partir de la cual se obtiene la actividad lactoperoxidasa en U/ml, siendo el coeficiente de extinción molar del producto de oxidación del ABTS de 32.400 M⁻¹ cm⁻¹ (Shindler *et al.*, 1976).

2.2.3. REUTERINA

La reuterina se adicionó a partir de una solución acuosa de reuterina purificada que se conservó en alícuotas a -40°C hasta su uso. La producción y purificación de reuterina se realizó según se indica en el apartado 2.4.3.

La actividad inhibitoria se determinó mediante una variante del ensayo descrito por Chung *et al.* (1989), empleando placas microtiter y *E. coli* K12 como cepa indicadora. Para ello, se distribuyeron en cada pocillo 150 µl de las diluciones dobles seriadas de la solución de reuterina purificada y a continuación se añadieron 150 µl de un cultivo de *E. coli* K12 con 10⁴ ufc/ml en TSB a doble fuerza. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 h y se determinó visualmente la ausencia de crecimiento del microorganismo indicador. Una unidad de reuterina (UR) se define como el recíproco de la dilución mayor que no permite ver crecimiento (turbidez) de *E. coli* K12.

Se estableció una correlación entre intensidad de color en el ensayo de Circle *et al.* (1945) y UR/ml mediante un análisis de regresión.

2.2.4. CITRATO

El citrato se añadió a una concentración final de 100 mM a partir de una dilución 1 M de pH 6,5 preparada con citrato disódico y trisódico.

2.2.5. ALTAS PRESIONES

La presurización de los quesos se llevó a cabo en un equipo discontinuo de alta presión hidrostática (ALSTON, Nantes, Francia) en el Centre Especial de Recerca (CER) “Planta de Tecnologia dels Aliments”, Universidad Autónoma de Barcelona. Las condiciones de presurización se describen en el apartado 2.3.3.2.

2.3. APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS INHIBITORIOS FRENTE A BACTERIAS PATÓGENAS EN LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS

2.3.1. TRATAMIENTOS INHIBITORIOS COMBINADOS EN LECHE

2.3.1.1. Bacteriocinas

Se ha investigado la actividad inhibitoria de las bacteriocinas lacticina 481, enterocina I, enterocina AS-48, así como de las bacteriocinas no caracterizadas TAB 7 y TAB 57, tanto de forma individual como en combinación con nisina, frente a *L. monocytogenes* Ohio, *S. aureus* CECT 976, *E. coli* O157:H7, *Sal. choleraesuis*, *Y. enterocolitica*, *A. hydrophila* y *C. jejuni*.

Para ello, se inocularon tubos con 10 ml de Tryptic Soy Broth (TSB) (Biolife), o con 10 ml de medio basal con un 5% de sangre de caballo (Oxoid Limited, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) en el caso de *C. jejuni*, con cada microorganismo patógeno. A cada tubo se le añadió aproximadamente 10^4 ufc/ml del patógeno, 100 UI/ml de nisina y 1 ml de los sobrenadantes neutralizados de cada una de las bacteriocinas en estudio. Se emplearon como controles tubos inoculados con los patógenos sin bacteriocinas y se prepararon caldos que contenían los patógenos y las bacteriocinas adicionadas de forma independiente.

Los caldos se incubaron a las temperaturas óptimas de crecimiento de cada microorganismo indicador (y en microaerofilia en el caso de *C. jejuni*) y se realizaron recuentos de los microorganismos patógenos en placas de medio no selectivo a las 4 y 24 h. Se llevaron a cabo dos ensayos por cepa.

Posteriormente se estudió, en aquellos microorganismos patógenos que resultaron más sensibles a las combinaciones de bacteriocinas en caldo de cultivo, la actividad inhibitoria de estas combinaciones en leche desnatada UHT (0,04% materia grasa). El experimento se realizó siguiendo el mismo protocolo y condiciones especificadas anteriormente, excepto que se añadió 1 ml de caldo MRS estéril tanto a la leche control como a la leche con nisina en lugar del sobrenadante del cultivo bacteriocinogénico adicionado al resto de las muestras. Se llevaron a cabo dos ensayos por cepa.

2.3.1.2. Bacteriocinas y sistema LP

Se ha estudiado el efecto de las bacteriocinas: lacticina 481, enterocina I, enterocina AS-48 y las bacteriocinas no caracterizadas TAB 7, TAB 20 y TAB 57 combinadas con el sistema LP sobre la supervivencia de *L. monocytogenes* Ohio y *S. aureus* CECT 976 en leche desnatada UHT. La leche se inoculó con aproximadamente 10^4 ufc/ml del patógeno a estudiar y se aplicaron los siguientes tratamientos: 100 UI/ml de nisina, 1 ml de sobrenadante del cultivo bacteriocinogénico, y las combinaciones de cada una de las bacteriocinas junto con la activación del sistema LP. Como control se empleó leche inoculada con cada patógeno y sin inhibidores. En los tratamientos que carecían de sobrenadante se añadió 1 ml de MRS estéril. El volumen final se ajustó a 10 ml en todos los tratamientos.

Los microorganismos patógenos se mantuvieron a 37°C y se realizaron recuentos en placas de medio no selectivo a las 4 y 24 h. Se realizaron dos repeticiones por cepa.

2.3.1.3. Nisina y sistema LP en refrigeración

Se ha estudiado el efecto combinado de la nisina y el sistema LP sobre la supervivencia de *L. monocytogenes* Ohio y *S. aureus* CECT 976 en leche refrigerada. Para realizar

este ensayo se inoculó leche desnatada UHT con aproximadamente 10^4 ufc/ml del patógeno a estudiar y se aplicaron los tratamientos inhibitorios individualmente y en combinación. El volumen final fue de 15 ml y como control se utilizó leche inoculada con el patógeno sin inhibidores.

La leche se mantuvo a 4°C y 8°C durante 12 d, realizándose recuentos de los microorganismos patógenos en placas de TSA a las 8 h, 1 d, 3 d, 5 d, 7 d y 12 d. Cada experiencia se realizó por duplicado.

2.3.1.4. Nisina, sistema LP y citrato en refrigeración

Se ha investigado el efecto de la combinación de nisina, sistema LP y citrato sobre la supervivencia de las bacterias Gram-negativas *E. coli* O157:H7, *Sal. choleraesuis*, *Y. enterocolitica*, *A. hydrophila* y *C. jejuni* en leche desnatada UHT mantenida a 4°C y 8°C durante 12 d. Para ello, se inocularon individualmente tubos de leche con aproximadamente 10^4 ufc/ml del patógeno y se aplicaron los distintos tratamientos de forma individual y en sus combinaciones doble y triple. El volumen final fue de 15 ml y se empleó como control un tubo de leche inoculado con el patógeno correspondiente sin inhibidores.

La leche se mantuvo a 4°C y 8°C durante 12 d y se realizaron recuentos a las 8 h, 1 d, 3 d, 5 d, 7 d y 12 d en placas de medio no selectivo y selectivo con el fin de diferenciar las bacterias dañadas de las bacterias no afectadas por el tratamiento. Las células con daños subletales se calcularon como la diferencia entre los recuentos obtenidos en TSA y los obtenidos con el medio selectivo utilizado para cada cepa (Ray, 1993). Se llevaron a cabo dos ensayos por cepa.

2.3.1.5. Reuterina

Se ha estudiado la capacidad inhibitoria de la reuterina frente a *L. monocytogenes* Ohio, *S. aureus* CECT 4013, *E. coli* O157:H7, *Sal. choleraesuis*, *Y. enterocolitica*, *A. hydrophila* y *C. jejuni* en leche reconstituida al 10% y esterilizada a 121°C durante 5 min. La leche se inoculó con aproximadamente 10^3 ufc/ml del microorganismo patógeno y se añadió reuterina a una concentración final de 8 UR/ml, excepto en la leche control. El volumen final fue de 10 ml.

La leche se incubó en las condiciones óptimas de crecimiento de cada microorganismo indicador durante 24 h, realizándose recuentos en placas de medio no selectivo a las 2, 4, 6, 8 y 24 h, excepto en el caso de *C. jejuni* que se realizaron a las 2, 8 y 24 h. Se llevaron a cabo dos ensayos por cepa.

En una segunda experiencia, se estudió el efecto de la grasa en la actividad inhibitoria de la reuterina. Se inoculó leche entera (3,6% materia grasa) y leche desnatada (0,04%

materia grasa) UHT con aproximadamente 10^4 ufc/ml de *E. coli* O157:H7 y se añadió reuterina (8 UR/ml). Como control se empleó leche inoculada sin reuterina. La leche se incubó a 37°C y se realizaron recuentos del patógeno en TSA a las 4 y 24 h. El ensayo se realizó por duplicado.

2.3.1.6. Bacteriocinas y reuterina

Se ha investigado la actividad inhibitoria de distintas bacteriocinas en combinación con reuterina frente a *L. monocytogenes* Ohio, *S. aureus* CECT 4013, *E. coli* O157:H7, *Sal. choleraesuis*, *Y. enterocolitica*, *A. hydrophila* y *C. jejuni* en leche desnatada UHT.

Las bacteriocinas empleadas fueron lacticina 481, enterocina I, enterocina AS-48 así como las bacteriocinas no caracterizadas TAB 7, TAB 20 y TAB 57.

Se inocularon tubos de leche desnatada UHT con aproximadamente 10^4 ufc/ml del patógeno correspondiente y se aplicaron los siguientes tratamientos: 8 UR/ml de reuterina, 100 UI/ml de nisina o 1 ml de los sobrenadantes neutralizados de los cultivos bacteriocinogénicos, así como las combinaciones de reuterina con cada una de las bacteriocinas. Como control se empleó leche inoculada con el patógeno correspondiente y sin inhibidores. En los tratamientos que carecían de sobrenadante se añadió 1 ml de caldo MRS estéril. El volumen final en todos los casos fue de 10 ml.

La leche se mantuvo en las condiciones óptimas de crecimiento de cada microorganismo indicador y se realizaron recuentos de las bacterias patógenas en placas de medio no selectivo a las 4 y 24 h. Se llevaron a cabo dos ensayos por cepa.

2.3.1.6.1. Nisina y reuterina en diferido

Se ha estudiado el efecto de la aplicación en diferido de reuterina en combinación con nisina frente a *S. aureus* CECT 4013 en leche desnatada estéril. La leche se inoculó con aproximadamente 10^4 ufc/ml de *S. aureus* al mismo tiempo que se añadió nisina. La reuterina se aplicó a la leche con un retraso de 2, 4, 6 y 8 h respecto de la adición de nisina.

Se emplearon tubos de leche inoculada con el patógeno en ausencia de inhibidores, leche con los compuestos inhibitorios adicionados de forma individual y leche adicionada simultáneamente con nisina y reuterina como control.

La leche se incubó a 37°C durante 24 h y se realizaron recuentos del patógeno en placas de TSA a las 4, 6, 8 y 24 h de incubación. La experiencia se realizó por duplicado.

2.3.1.7. Nisina, reuterina y sistema LP en refrigeración

Se ha estudiado el efecto combinado de nisina, reuterina (8 UR/ml) y la activación del sistema LP frente a *L. monocytogenes* Ohio, *S. aureus* CECT 4013, *E. coli* O157:H7, *Sal. choleraesuis*, *Y. enterocolitica*, *A. hydrophila* y *C. jejuni* en leche desnatada UHT a temperaturas de refrigeración. Para ello, la leche se inoculó con aproximadamente 10^4 ufc/ml del patógeno a estudiar y se añadieron los distintos inhibidores de forma individual o combinada. El volumen final fue de 15 ml y se empleó como control un tubo de leche inoculado con el patógeno correspondiente sin inhibidores.

La leche se mantuvo a 4°C y 8°C durante 12 d, y se realizaron recuentos de los patógenos ensayados en placas de medio no selectivo a las 8 h, 1 d, 3 d, 5 d, 7 d y 12 d. Se llevaron a cabo dos ensayos por cepa.

2.3.2. TRATAMIENTOS INHIBITORIOS COMBINADOS EN CUAJADA

Se elaboraron cuatro cuajadas por cepa, tratamiento y fabricación a partir de leche desnatada UHT según se indica en el apartado 2.4.4. Se llevaron a cabo dos fabricaciones por cepa.

La toma de muestras se realizó a los 3 d, 6 d, 9 d y 12 d utilizándose una cuajada para cada toma de muestra. Se realizaron análisis microbiológicos y se determinó el pH, la a_w y la nisina y la reuterina residual en las cuajadas.

2.3.2.1. Reuterina y sistema LP

Se ha investigado el efecto combinado de reuterina y el sistema LP sobre la supervivencia de las bacterias Gram-negativas *E. coli* O157:H7, *Sal. choleraesuis*, *Y. enterocolitica* y *A. hydrophila* en cuajada refrigerada a 10°C. La reuterina fue añadida a diferentes concentraciones. Para *E. coli* O157:H7 y *Sal. choleraesuis* se emplearon 2 UR/ml, y para *Y. enterocolitica* y *A. hydrophila*, 0,5 UR/ml. Los compuestos inhibitorios se añadieron a la leche de forma individual y combinada. Se prepararon cuajadas control elaboradas con los patógenos en ausencia inhibidores.

2.3.2.2. Nisina, reuterina y sistema LP

Se ha investigado el efecto combinado de nisina, reuterina y la activación del sistema LP sobre las bacterias patógenas Gram-positivas *L. monocytogenes* Scott A y *S. aureus* CECT 976 en cuajada refrigerada a 10°C. Se emplearon 100 UI/ml de nisina y 2 UR/ml de reuterina. Los compuestos inhibitorios se añadieron a la leche de forma individual, en combinaciones dobles y en su combinación triple. También se preparó una cuajada control inoculada con los patógenos en ausencia de inhibidores.

2.3.3. TRATAMIENTOS INHIBITORIOS COMBINADOS EN QUESO

2.3.3.1. Bacterias lácticas productoras de bacteriocinas

Se ha investigado la supervivencia de diferentes microorganismos patógenos a lo largo de la maduración de quesos de tipo Hispánico elaborados con bacterias lácticas productoras de bacteriocinas como cultivos protectores.

Los cultivos bacteriocinogénicos empleados fueron *Lc. lactis* subsp. *cremoris* TAB 24, productor de lacticina 481; *Lc. lactis* subsp. *lactis* TAB 26, productor de nisina Z; *Lc. lactis* subsp. *lactis* TAB 50, productor de nisina A; *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis TAB 57, productor de TAB 57; *Ec. faecium* TAB 7, productor de TAB 7; *Ec. faecalis* TAB 52, productor de enterocina I y *Ec. faecalis* INIA 4, productor de enterocina AS-48.

Las bacterias patógenas ensayadas fueron *E. coli* O157:H7, *B. cereus*, *L. monocytogenes* Scott A y *S. aureus* CECT 976.

La elaboración de los quesos se realizó según se indica en el apartado 2.4.4.

Se realizaron dos fabricaciones con dos repeticiones por fabricación con el siguiente reparto:

- Quesos con los patógenos *L. monocytogenes* y *S. aureus*
- Quesos con los patógenos *E. coli* O157:H7 y *B. cereus*.

Por otra parte, se llevó a cabo una fabricación sin patógenos para estudiar las características organolépticas de los quesos elaborados con las cepas bacteriocinogénicas. Esta fabricación nos permitió obtener información sobre la influencia de nuestras cepas en el olor, aroma, sabor y textura del queso.

Se realizaron análisis microbiológicos de los quesos a las 6 h, 2 d, 15 d, 30 d y 60 d, y se determinó el pH, la a_w y la actividad bacteriocina residual en el queso. Cada una de las fabricaciones se realizó por duplicado.

2.3.3.2. Bacterias lácticas productoras de bacteriocinas y altas presiones hidrostáticas

Se ha investigado la supervivencia de diferentes patógenos a lo largo de la maduración en quesos de tipo Hispánico elaborados con bacterias lácticas productoras de bacteriocinas y sometidos a diferentes tratamientos de altas presiones.

Los cultivos bacteriocinogénicos empleados fueron los indicados en el apartado anterior.

Los microorganismos patógenos utilizados fueron *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* Scott A y *S. aureus* CECT 976.

Las 2 fabricaciones de queso se llevaron a cabo según se indica en el apartado 2.4.4.

Los quesos se presurizaron con un equipo discontinuo de alta presión hidrostática con 300 MPa/10°C/10 min ó 500 MPa/10°C/5 min a los 2 d ó 50 d de maduración.

Se realizaron análisis microbiológicos a los 3 d, 20 d, 51 d y 60 d. Se determinó el pH y la actividad de bacteriocina residual en los quesos.

2.4. METODOLOGÍA

2.4.1. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO DE LOS MICROORGANISMOS

Las cepas se conservaron a -80°C y -40°C en el caldo de cultivo adecuado para cada microorganismo suplementado con un 30% de glicerol.

Todas las cepas patógenas se resembraron en TSB excepto *C. jejuni*, que se multiplicó en medio basal con un 5% de sangre de caballo lacada. Los microorganismos se incubaron a 37°C durante 18 h, excepto *A. hydrophila* que se incubó a 30°C. En el caso de *C. jejuni* se emplearon condiciones de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂) generadas mediante Gas Generating Kits (Oxoid).

Las cepas se resembraron dos veces en caldo de cultivo antes de su empleo en los experimentos. En los ensayos en leche, cuajada o queso, la última resiembra se realizó en leche desnatada reconstituida al 10%, con un 0,3% de extracto de levadura, y esterilizada a 121°C durante 5 min.

Las diluciones decimales de los cultivos y las muestras se realizaron en agua peptonada (0,1%) estéril, excepto cuando se empleaban para inocular leche, en cuyo caso se realizaron en leche estéril.

Los recuentos en medio no selectivo se realizaron en placas de Tryptic Soy Agar (TSA) (Biolife) que se incubaron a 37°C durante 24 h, excepto para *A. hydrophila* que se incubó a 30°C, y para *C. jejuni*, cuyos recuentos se realizaron en Blood Agar Base n°2 (Oxoid) con un 5% de sangre de caballo lacada y Campylobacter Suplemento de Crecimiento (Oxoid). Estas placas se incubaron a 37°C durante 48 h en microaerofilia.

Los medios selectivos y condiciones de cultivo fueron los siguientes:

- Los recuentos de *Sal. choleraesuis* se realizaron en placas de Xilose Lysine Desoxycholate Agar (XLDA) (Biolife) incubadas a 37°C durante 48 h en las experiencias con leche, mientras que en las experiencias con cuajada se emplearon placas de SS Agar (Biolife) incubadas a 37°C durante 24 h.

Los enriquecimientos de la cuajada se realizaron previo pre-enriquecimiento de 25 g de muestra en 225 ml de agua peptonada estéril a 37°C durante 16-20 h. Posteriormente, se añadieron 100 µl de este pre-enriquecimiento a 10 ml de caldo de enriquecimiento de Rappaport-Vassiliadis (Oxoid) que se incubó a 37°C. A las 24 y 48 h se realizaron estrías en placas de SS Agar que se incubaron a 37°C durante 24 h.

- Los recuentos de *E. coli* O157:H7 se realizaron Violet Red Bile Agar (VRBA) (Oxoid) en las experiencias con leche, y Mc Conkey Sorbitol Agar (Scharlau Chemie, Barcelona) con suplemento selectivo Cefixime-Telurito (Oxoid) en las experiencias con queso y cuajada. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h.

El enriquecimiento de *E. coli* O157:H7 en queso se realizó homogeneizando 1 g en 9 ml de TSB con suplemento selectivo Cefixime-Telurito que se incubó a 42°C durante 6 h y posteriormente durante 24-48 h a 37°C. Este caldo se sembró en placas de Mc Conkey Sorbitol Agar con suplemento selectivo Cefixime-Telurito que se incubaron a 37°C, observándose tanto a las 24 h como a las 48 h de incubación la presencia de colonias características.

- Los recuentos de *C. jejuni* se realizaron en Blood Agar Base nº2 (Oxoid) con un 5% de sangre de caballo lacada, Campylobacter Suplemento de Crecimiento y Campylobacter Suplemento Selectivo Butzler (Oxoid). Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h en microaerofilia.
- Los recuentos de *A. hydrophila* se realizaron en VRBA en las experiencias con leche, y SS Agar suplementado con Aeromonas Selective Supplement (Biolife) y almidón soluble (Sigma) al 1% en las experiencias con cuajada. Las placas se incubaron a 30°C durante 24 h.
- Los recuentos de *Y. enterocolitica* en las experiencias con leche, se realizaron en placas de VRBA incubadas a 37°C durante 24 h, mientras que en las experiencias con cuajada se emplearon placas de CIN Agar Base (Biolife) suplementadas con Yersinia Selective Supplement (Biolife) que se incubaron a 37°C durante 24-48 h.
- Los recuentos de *S. aureus* se realizaron en Baird-Parker (Oxoid) con yema de huevo-telurito (Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.) en las experiencias en leche o cuajada, y Baird-Parker con RPF Supplement II (Biolife) en las experiencias en queso. En todos los casos las placas se incubaron a 37°C durante 24-48 h.

El enriquecimiento de *S. aureus* en queso se realizó inoculando 1 g de muestra en 19 ml de caldo Gioliti-Cantoni (Oxoid) suplementado con 0,3 ml de una solución de telurito potásico al 3,5% (Oxoid). Se incubó a 37°C durante 48 h y se sembró en placas de agar Baird-Parker con RPF Supplement II. Se observó la presencia de colonias características a las 24-48 h de incubación a 37°C.

- Los recuentos de *L. monocytogenes* se realizaron en PALCAM Listeria Agar (Merck) con Suplemento Selectivo para Listeria PALCAM (Merck) según Van Netten *et al.* (1989). Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h.

Los enriquecimientos de *L. monocytogenes* en queso se efectuaron homogeneizando 1 g de muestra en 9 ml de Listeria Enrichment Broth Base (Oxoid) con el Suplemento Selectivo para Listeria PALCAM. Los caldos se incubaron a 37°C durante 24-48 h y se sembraron sobre placas de agar PALCAM. Las placas se incubaron a 37°C durante 24-48 h y se observó la presencia de colonias características.

- Los recuentos de *B. cereus* se realizaron en placas de Agar Selectivo Bacillus cereus (Scharlau) con yema de huevo (Scharlau) y suplementadas con Bacillus cereus Antimicrobial Supplement (Biolife). Se incubaron a 30°C durante 24-48 h.

Las **cepas bacteriocinogénicas** se cultivaron en caldo MRS a 30°C durante 18 h y fueron resembradas dos veces antes de su empleo en los experimentos. En las fabricaciones de queso, los microorganismos se sembraron en leche desnatada reconstituída al 10% suplementada con un 0,3% de extracto de levadura y esterilizada a 121°C durante 5 min. Los recuentos se realizaron en TSA incubado a 30°C durante 24 h.

2.4.2. AISLAMIENTO, SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LACTOBACILLUS PRODUCTORES DE REUTERINA

El aislamiento de lactobacilos se realizó a partir de muestras de heces de cerdo procedentes de distintas granjas de La Coruña. Se sembraron diluciones decimales de las muestras sobre placas de Agar Rogosa (Biolife) que se incubaron a 37°C durante 48 h en anaerobiosis (sistema AnaeroGen™, Oxoid). Se aislaron aproximadamente 5 colonias por muestra que se cultivaron en anaerobiosis en caldo MRS a 37°C durante 24 h. Los aislados productores de gas se sembraron en MRS suplementado con 250 mM de glicerol y se incubaron a 37°C durante 24 h en anaerobiosis. La presencia de reuterina se detectó en los sobrenadantes de los cultivos mediante el ensayo colorimétrico de Circle *et al.* (1945) según Smiley y Sobolov (1962) utilizando como control positivo la cepa productora *Lb. reuteri* CETC 925T (DSM 20016). Para ello, se centrifugó 1 ml de los cultivos a 12.000 g durante 5 min en una centrífuga Sorvall MC 12V. A continuación, se añadieron a 300 µl de cada sobrenadante 150 µl de solución de triptófano 3g/l en HCl 0,1 N y 600 µl de HCl al 35% y se calentó la mezcla a 60°C durante 5 min. La acroleína

formada en la reacción por deshidratación del β -hidroxipropionaldehído, origina un cambio en la coloración del medio que evidencia la presencia de reuterina (β -hidroxipropionaldehído) en el sobrenadante de partida.

Posteriormente se examinó su morfología, se realizó la tinción de Gram y se determinó la producción de catalasa de los aislados que dieron positivo en la prueba colorimétrica.

La cuantificación de la reuterina se realizó tras cultivar los aislados en caldo MRS a 37°C durante 18 h en anaerobiosis. Se centrifugó 1 ml del cultivo a 4.500 g durante 5 min. Las células obtenidas se lavaron y resuspendieron en 0,5 ml de una solución acuosa de glicerol 250 mM, incubándose a 37°C durante 3 h en anaerobiosis. Las suspensiones celulares se centrifugaron en las mismas condiciones descritas anteriormente y se cuantificó la reuterina presente en los sobrenadantes. Para ello, se mezclaron 100 μ l de sobrenadante con 200 μ l de agua y se añadieron 150 μ l de solución de triptófano 3 g/l en HCl 0,1 N y 600 μ l de HCl al 35%. Los tubos se calentaron a 60°C durante 5 min y finalmente se midió la intensidad de color a 490 nm con un espectrofotómetro Beckman DU 650. La mayor intensidad de color, como consecuencia de una mayor cantidad de acroleína en el medio, se relacionó con una mayor producción de reuterina por parte de los aislados mediante una recta patrón de acroleína.

La actividad inhibitoria de la reuterina presente en los sobrenadantes de los aislados se estudió mediante el ensayo de la MIC según Chung *et al.* (1989) con las modificaciones descritas en el apartado 2.2.3.

Para la identificación bioquímica de los aislados seleccionados se emplearon galerías comerciales API 50 CHL (Biomérieux, Lyon, Francia).

Se utilizó también un método de identificación basado en la amplificación mediante PCR de secuencias especie-específicas que codifican el ARN 16S de *Lb. reuteri* y *Lb. fermentum* (Chagnaud *et al.* 2001). Para ello, se emplearon las parejas de cebadores específicos LOWLAC-REUT1 y LOWLAC-FERM, según las condiciones de PCR recomendadas por los autores. Como controles se utilizaron *Lb. reuteri* CECT 925T y *Lb. fermentum* CECT 4007T. El ADN genómico se obtuvo según el método descrito por Ausubel *et al.* (1994).

Con el fin de detectar la presencia del gen codificador de la glicerol deshidratasa involucrado en la producción de reuterina se realizó una segunda PCR con el ADN genómico de estos aislados. Para ello se usaron los cebadores GD1 y GD2 y las condiciones descritas por Claisse y Lonvaud-Funel (2001). El ADN de *Lb. reuteri* CECT 925T se utilizó como control positivo.

2.4.3. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE REUTERINA

La producción de reuterina se realizó a partir de la cepa *Lb. reuteri* PRO 137 en dos fases: obtención de biomasa y producción de reuterina a partir de esta biomasa.

Para la obtención de la biomasa, se inocularon 4 l de caldo MRS al 1% con la cepa productora de reuterina en un fermentador de sobremesa Bioflo III fermentor (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, NJ, EE.UU.). El fermentador se mantuvo a una temperatura constante de 37°C durante 16-18 h sin agitación, y empleando un flujo de nitrógeno constante de 60 ml/min para mantener condiciones de anaerobiosis. Posteriormente, se separaron las células del medio de cultivo mediante centrifugación a 6000 x g durante 5 min con Sorvall Superspeed RC2-B.

Para obtener la reuterina, el precipitado celular se resuspendió en 1 l de una solución 100 mM de glicerol y se incubó en anaerobiosis a 37°C durante 3 h. Las células de la solución se eliminaron mediante centrifugación.

La purificación de la reuterina producida se realizó a partir de la solución anterior mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC, Pharmacia, Uppsala, Suecia) utilizando una columna XK 26/40 (Pharmacia) rellena con Dowex 50WX8, 200-400 mesh, H form (Supelco, Bellefonte, PA, EE.UU.). La columna se equilibró empleando una disolución de acetonitrilo/agua (70:30 v/v) con un flujo de 4 ml/min y la elución de reuterina se realizó con el mismo solvente. Se recogieron fracciones de 4 ml en las que se determinó la presencia de reuterina mediante el ensayo colorimétrico de Circle *et al.* (1945).

La pureza en reuterina de las fracciones con resultado positivo en el ensayo colorimétrico fue determinada mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, Beckman Instruments, Madrid, España) con una columna analítica Recex RHM Monosaccharide (Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.) 300 x 7,8 mm, empleando una mezcla de acetonitrilo/agua (65:35 v/v) con 0,01 N de H₂SO₄ y un flujo de 0,4 ml/min, así como un detector de índice de refracción (Knaumer, Berlin, Alemania). Las fracciones con reuterina y libres de glicerol se reunieron y se sometieron a evaporación a temperatura ambiente con un rotavapor Büchi R-124 (Büchi Laboratoriuns-Technik AG, Flawil, Suiza) para eliminar el acetonitrilo y concentrar la muestra.

2.4.4. FABRICACIÓN DE CUAJADA Y QUESO

Para la fabricación de las cuajadas se emplearon frascos con 200 ml de leche desnatada UHT a 30°C a la que se añadió leche desnatada en polvo al 5% y CaCl₂ al 0,02%. La leche se inoculó con aproximadamente 10⁴ ufc/ml del patógeno correspondiente y se aplicaron los distintos tratamientos. Posteriormente, se añadió cuajo Maxiren 150 (Gist-brocades, Delf, Holanda) y se distribuyó la leche en 4 envases estériles de

aproximadamente 50 ml que se mantuvieron a 30°C durante 40 min. Una vez producida la coagulación, los frascos se refrigeraron a 10°C durante 12 d.

Para cada una de las fabricaciones de queso se partió de leche cruda de vaca que se distribuyó en 8 cubas de 10 litros cada una. La leche se calentó a 32°C y a continuación se añadió CaCl₂ al 0,02%.

La leche se inoculó con aproximadamente 10⁵ ufc/ml de cada cepa patógena. En la cuba 1, que actuó como control, se añadió el fermento comercial MA O16 (Texel, Groupe Rhône-Poulenc, Dangé Saint-Romain, Francia) al 0,04%. Las restantes cubas se inocularon con el fermento comercial al 0,1% y con los diferentes productores de bacteriocina al 0,1%. A los 20 min de la inoculación del fermento se añadió cuajo animal Maxiren 150 (Gist-brocades) a cada una de las cubas y se mantuvo la leche a 30°C durante 40 min. Después de cortar la cuajada, se calentó a 37°C durante 25 min, se desueró y se moldearon los quesos.

En las fabricaciones con los productores de bacteriocinas se obtuvieron cuatro quesos por cuba que se prensaron durante 4 h a temperatura ambiente. A la salida de prensa, los quesos se introdujeron en salmuera al 20% durante 30 min, y seguidamente se pasaron a una cámara a 20°C durante 16 h. Finalmente, los quesos fueron envasados a vacío mediante una envasadora ETV-7 (Tecnotrip, Barcelona, España) y se llevaron a una cámara de maduración a 12°C durante 60 d.

En las fabricaciones en que se aplicó el tratamiento combinado bacteriocinas-altas presiones hidrostáticas se obtuvieron cinco quesos de cada cuba. El primero de ellos se maduró durante 60 d y no fue sometido a tratamiento de altas presiones. Los quesos 2 y 3 se sometieron a los 2 d a un tratamiento de alta presión de 300 MPa/10°C/10 min y 500 MPa/10°C/5 min, respectivamente. Los quesos 4 y 5 se presurizaron a los 50 días de maduración con 300 MPa/10°C/10 min y 500 MPa/10°C/5 min, respectivamente. Tras aplicar el tratamiento de alta presión los quesos continuaron su maduración hasta los 60 d.

2.4.5. TOMA DE MUESTRAS Y ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Se realizaron diluciones decimales en agua peptonada estéril al 0,1%, excepto en los ensayos realizados con *Salmonella* y citrato en los que se empleó agua peptonada tamponada (peptona 0,1%, NaCl 50 mM y tampón fosfato 50 mM pH 7,2).

En leche cruda, los recuentos de microorganismos totales se realizaron en placas de TSA incubadas a 30°C durante 48 h. Los recuentos de microorganismos patógenos se realizaron en los medios y condiciones indicados en el apartado 2.4.1.

Las muestras de cuajada se homogeneizaron en un Stomacher Colworth 400 (A.J. Seward Ltd., London, Reino Unido) y se sembraron directamente o después de realizar las correspondientes diluciones decimales.

Las muestras de queso se homogeneizaron con citrato sódico estéril al 2% en Stomacher.

Las siembras en placa se realizaron mediante un sistema de siembra en espiral (Interscience, Saint Nom-La Bretèche, France) o mediante siembra en superficie con asa de vidrio. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

El límite de detección fue de 1 ufc/ml en todo los casos, excepto en las muestras de queso que fue de 10 ufc/g. En algunos casos se realizaron enriquecimientos de cuajada y queso.

2.4.6. ANÁLISIS QUÍMICOS DE LECHE, CUAJADA Y QUESO

2.4.6.1. pH

El pH se determinó por duplicado con un pHmetro Crison GPL 22 (Crison Instruments S.A., Barcelona, España), utilizando un electrodo de penetración en las muestras de cuajada y queso.

2.4.6.2. Actividad de agua (a_w)

La a_w en cuajada y queso se determinó por duplicado mediante el Aqua Lab Water Activity Meter Serie 3 (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, EE.UU.).

2.4.7. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD BACTERIOCINA EN CUAJADA Y QUESO

La presencia de bacteriocina activa en cuajada se determinó añadiendo 2 ml de HCl 0,02 N a 2 ml de cuajada y centrifugando a 12.000 g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se neutralizó a pH 6 con NaOH 1 N y se congeló a -40°C.

La presencia de bacteriocina activa en queso se determinó a partir de 5 g de queso homogeneizados con 10 ml de HCl 0,02 N estéril a 50°C. El homogeneizado se centrifugó a 12.000 g durante 20 min a 4°C. Seguidamente, se neutralizó el sobrenadante hasta pH 6 con NaOH 1 N y se congeló a -40°C.

En ambos casos se tomaron 25 µl del sobrenadante neutralizado de cada una de las muestras y se depositaron por duplicado en pocillos realizados sobre placas de agar RCM inoculadas con *C. tyrobutyricum* NZ 8 al 0,1% como indicador.

2.4.8. DETERMINACIÓN DE REUTERINA EN CUAJADA

La determinación de la reuterina residual se realizó mediante el ensayo colorimétrico de Circle *et al.* (1945). Para ello, se añadieron a 200 µl de cuajada 100 µl de solución de triptófano 3 g/l en HCl 0.1 N y 400 µl de HCl al 35%. Posteriormente, los tubos se calentaron a 60°C durante 5 min y se centrifugaron 5 min a 12.000 g. Finalmente, se midió la intensidad de color en el sobrenadante a 490 nm.

2.4.9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los análisis de varianza de los datos obtenidos se realizaron con el programa BMDP 8V (BMDP Statistical Software, Los Angeles, CA, EE.UU.).

La comparación de medias se efectuó mediante la prueba de la mínima diferencia significativa según el test de Tukey (Steel y Torrie, 1980).

3.1. AISLAMIENTO, SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *LACTOBACILLUS* PRODUCTORES DE REUTERINA

Se ha investigado la producción de reuterina a partir de 165 aislados obtenidos de 33 muestras de heces de cerdo. De los 165 se seleccionaron 109 que producían gas en caldo MRS y se incubaron en anaerobiosis en caldo MRS con glicerol con el fin de evaluar su capacidad para producir reuterina. La producción de reuterina se detectó visualmente en 28 de los aislados mediante un cambio de color en los sobrenadantes de los cultivos como consecuencia de la deshidratación equimolar de la reuterina a acroleína en presencia de HCl, triptófano y calor (Smiley y Sobolov, 1962). Posteriormente, se evaluaron las diferencias en la producción de reuterina entre los 28 aislados en una solución de agua-glicerol cuantificándose espectrofotométricamente la cantidad de acroleína formada según Circle *et al.*, (1945). Los 28 aislados procedían de 10 muestras diferentes de heces de cerdo y se identificaron preliminarmente como lactobacilos por estar aislados de placas de Agar Rogosa y ser bacilos Gram-positivos, catalasa-negativos.

La cepa de referencia *Lb. reuteri* CECT 925T presentó valores de acroleína de 0,64 $\mu\text{g/ml}$, mientras que las cepas seleccionadas presentaron valores comprendidos entre 0,87 y 58,83 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 1).

Tabla 1. Producción de reuterina expresada como acroleína ($\mu\text{g/ml}$) y actividad inhibitoria frente a *E. coli* K12 (UA) de la reuterina de lactobacilos aislados de heces de cerdo

Aislado	Acroleína	UA	Aislado	Acroleína	UA
PRO 105	13,88	8	PRO 134	56,23	64
PRO 107	34,32	16	PRO 135	47,94	32
PRO 108	34,58	16	PRO 136	1,98	4
PRO 109	46,42	32	PRO 137	37,94	16
PRO 110	22,59	4	PRO 146	4,81	4
PRO 111	44,93	32	PRO 147	20,83	16
PRO 112	44,27	32	PRO 148	34,76	32
PRO 113	43,05	32	PRO 149	38,62	32
PRO 114	5,16	4	PRO 150	11,04	4
PRO 116	53,43	16	PRO 151	0,87	4
PRO 117	47,27	32	PRO 152	17,72	8
PRO 118	49,94	32	PRO 153	12,24	4
PRO 132	51,78	32	PRO 154	7,42	4
PRO 133	58,83	64	PRO 155	4,04	4

Así mismo, se evaluó la actividad inhibitoria de la reuterina presente en los sobrenadantes. El sobrenadante de la cepa de referencia *Lb. reuteri* CECT 925T presentó una actividad de 4 UA, mientras que 20 de los 28 aislados seleccionados mostraron una actividad inhibitoria superior a la de la cepa de referencia (Tabla 1).

Se seleccionaron los aislados PRO 108, PRO 109, PRO 133, PRO 137, PRO 149 y PRO 152 procedentes de muestras diferentes para posteriores estudios.

Los aislados seleccionados se identificaron como *Lb. fermentum* / *reuteri* según el perfil de fermentación de azúcares observado con las galerías API 50 CHL. Debido a que dicho test no distingue entre *Lb. fermentum* y *Lb. reuteri*, se realizó una PCR a partir del ADN genómico de los aislados con los cebadores especie-específicos de *Lb. fermentum* (LOWLAC-FERM) y de *Lb. reuteri* (LOWLAC-REUT1). La amplificación del fragmento esperado de ADN de ~1000 pb con el par LOWLAC-REUT1 identificó todos los aislados estudiados como *Lb. reuteri* (Fig. 2).

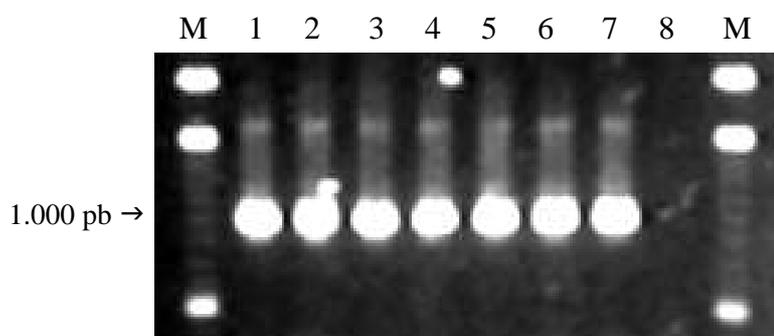


Figura 2. Amplificación mediante PCR obtenida con la pareja de cebadores específicos LOWLAC-REUT1. 1-6: PRO 108, PRO 109, PRO 133, PRO 137, PRO 149 y PRO 152; 7: *Lb. reuteri* CECT 925T; 8: *Lb. fermentum* CECT 4007T; M: marcador ADN 100 pb

En los 6 aislados estudiados se detectó mediante PCR con los cebadores GD1 y GD2 un fragmento de ~279 pb, el cual se corresponde con un fragmento del gen que codifica la glicerol deshidratasa. Claisse y Lonvaud-Funel (2001) solamente detectaron este gen en los lactobacilos con actividad glicerol deshidratasa, por lo que su detección en nuestros aislados de *Lb. reuteri* indicaría su potencialidad para producir reuterina (Fig. 3).

La producción y purificación de reuterina se realizó a partir del aislado *Lb. reuteri* PRO 137.

Las fracciones obtenidas mediante FPLC a través de la cromatografía de intercambio iónico y que dieron positivo en el ensayo colorimétrico, se analizaron posteriormente mediante HPLC. Talarico *et al.* (1988) identificaron los productos de la fermentación de *Lb. reuteri* 1063 mediante HPLC y FTIR como ácido β -hidroxipropiónico, reuterina, glicerol y 1,3 propanediol. Los dos picos mayoritarios fueron los correspondientes a la

reuterina formada y al glicerol residual. Los perfiles de elución obtenidos en el presente trabajo con *Lb. reuteri* PRO 137, fueron similares a los obtenidos por estos autores.

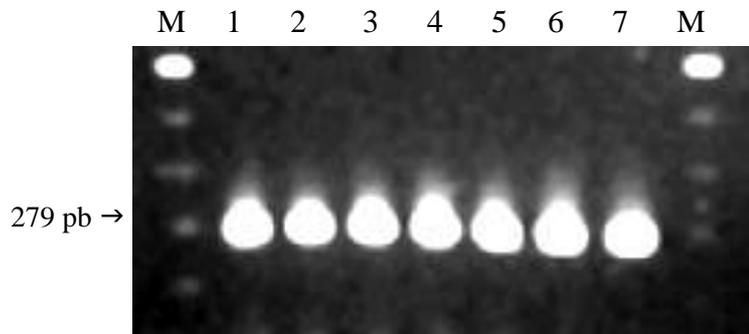


Figura 3. Amplificación mediante PCR de un fragmento del gen que codifica la glicerol deshidratasa. 1-6: PRO 108, PRO 109, PRO 133, PRO 137, PRO 149 y PRO 152; 7: *Lb. reuteri* CECT 925T; M: marcador ADN 100 pb

Después de producir, purificar y concentrar la reuterina se obtuvo una solución stock de reuterina de 240 UR/ml de actividad, que se mantuvo a -40°C hasta su empleo en los experimentos.

Se realizó un banco de diluciones a partir de la solución stock de reuterina con concentraciones comprendidas entre 0 y 80 UR/ml, y se analizaron según Circle *et al.* (1945). Los valores de absorbancia fueron superiores en las diluciones más concentradas respecto de las más diluidas hasta una concentración de reuterina de 20 UR/ml. A partir de este punto la absorbancia disminuyó con la concentración (Fig 3 a). Se observó una correlación lineal positiva ($r = 0,999$) entre absorbancia y actividad, en concentraciones de reuterina comprendidas entre 0,078 y 5 UR/ml (Fig. 3 b).

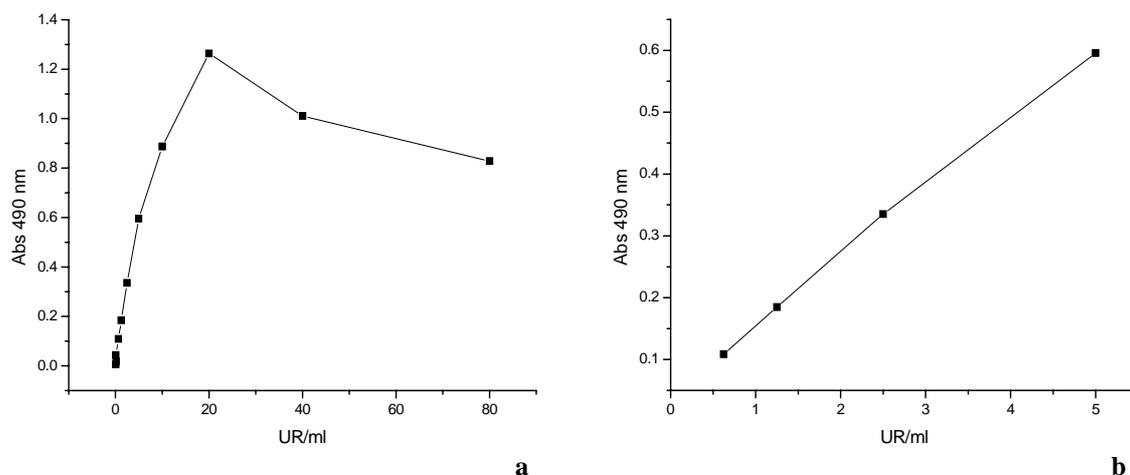


Figura 4. Absorbancia a 490 nm de diferentes concentraciones de reuterina preparadas a partir del stock purificado 240 UR/ml. **a:** entre 0 y 80 UR/ml; **b:** entre 0 y 5 UR/ml

3.2. TRATAMIENTOS INHIBITORIOS COMBINADOS EN LECHE

3.2.1. BACTERIOCINAS

Se ha investigado el efecto combinado de diferentes bacteriocinas con nisina comercial, en caldo de cultivo y leche UHT, sobre la supervivencia de bacterias patógenas Gram-positivas y Gram-negativas de importancia en alimentos.

3.2.1.1. Efecto frente a *L. monocytogenes*

Los niveles de *L. monocytogenes* en el caldo de cultivo resultaron significativamente ($P < 0,001$) influidos por la adición de bacteriocinas y el tiempo de incubación (Tabla 2).

L. monocytogenes alcanzó en el caldo control niveles de 5,72 y 8,89 log ufc/ml a las 4 h y 24 h, respectivamente. A las 4 h, se observaron, en el caldo con nisina, reducciones de 3,31 unidades logarítmicas respecto a los niveles iniciales de *L. monocytogenes* y no se detectó su presencia en las muestras que contenían enterocina I o enterocina AS-48, de forma individual o con nisina, ni en las combinaciones nisina-bacteriocina TAB 7 y nisina-lacticina 481.

A las 24 h, *L. monocytogenes* alcanzó niveles de 7,94 log ufc/ml en el caldo con nisina. Los valores más bajos se detectaron con bacteriocina TAB 57 y enterocina AS-48 con 3,31 y 0,61 log ufc/ml respectivamente, y con enterocina I, por debajo del límite de detección. Todas las combinaciones de bacteriocinas, excepto la combinación nisina-lacticina 481, dieron lugar a niveles del patógeno inferiores o próximos al límite de detección, observándose un efecto inhibitorio sinérgico en las combinaciones nisina-bacteriocina TAB 7 y nisina-bacteriocina TAB 57, y aditivo en las combinaciones nisina-enterocina AS-48.

En la leche, los niveles de *L. monocytogenes*, también resultaron significativamente ($P < 0,001$) influidos por la adición de bacteriocinas y el tiempo de incubación (Tabla 2).

L. monocytogenes presentó un recuento en leche de 4,86 log ufc/ml y a las 24 h de incubación alcanzó niveles de 9,06 log ufc/ml. En la leche con lacticina 481 o enterocina I se detectó un efecto bacteriostático durante las primeras 4 h, mientras que la adición de nisina, bacteriocina TAB 7 o enterocina AS-48 produjo un efecto bactericida sobre el patógeno en las primeras horas que dieron lugar a reducciones respecto al valor inicial de 4,43, 1,85 y 2,35 unidades logarítmicas, respectivamente. Posteriormente, el patógeno reanudó el crecimiento en todos los casos. No obstante, a las 24 h, se observaron unos niveles de *L. monocytogenes* de 4,19 y 4,08 unidades logarítmicas inferiores a los de la leche control en presencia de nisina y enterocina AS-48, respectivamente. En la leche con el resto de bacteriocinas la recuperación de *L. monocytogenes* dio lugar a resultados similares a los de la leche control.

Por tanto, las combinaciones de bacteriocinas con nisina no incrementaron el efecto inhibitorio de la nisina en leche frente a *L. monocytogenes*, excepto en el caso de la combinación nisina-enterocina AS-48 donde se observaron niveles de patógeno 1,46 unidades logarítmicas inferiores a los de la leche con nisina.

La actividad antilisteria de nisina (Bruno *et al.*, 1992), lacticina 481 (Rodríguez *et al.*, 2000), enterocina I (Floriano *et al.*, 1998) y enterocina AS-48 (Joosten *et al.*, 1996) ya ha sido descrita con anterioridad. Sin embargo, el efecto bactericida de las bacteriocinas puede ser transitorio debido a la aparición de mutantes resistentes (Davies y Adams, 1994; Rekhif *et al.*, 1994; Okereke y Thompson, 1996). La frecuencia con que aparecen estas células resistentes depende de la bacteriocina, la cepa diana y del medio de crecimiento (De Martinis *et al.*, 1997; Song y Richard, 1997; Bouttefroy y Millière, 2000). Se ha descrito la aparición de células resistentes de *L. monocytogenes* a nisina (Harris *et al.*, 1991; Ming y Daeschel, 1993; Davies *et al.*, 1997; Mazzotta y Montville, 1997) y frente a bacteriocinas tipo pediocina (Rekhif *et al.*, 1994; Dykes y Hastings, 1998). Por otra parte, la resistencia cruzada entre bacteriocinas de la clase IIa ha sido descrita entre la curvaticina 13 y mesenterocina 52 (Rekhif *et al.*, 1994), la pediocina PA-1 y la bavaricina A (Rasch y Knochel, 1998), la pediocina PA-1 y la piscicolina 126 (Wan *et al.*, 1997), así como entre las leucocinas A, B, E y la sakacina A (Dykes y Hastings, 1998).

El efecto de la combinación de bacteriocinas frente a *L. monocytogenes* ha sido estudiado en medios de cultivo de laboratorio, obteniéndose un efecto bactericida superior al mostrado por las bacteriocinas adicionadas individualmente cuando se combinó nisina con pediocina PA-1 (Hanlin *et al.*, 1993), leucocina F10 (Parente *et al.*, 1998), sakacina A, enterocina B (Schillinger *et al.*, 1998) o curvaticina 13 (Bouttefroy y Millière, 2000), así como las combinaciones de pediocina PA-1 con lacticina 481, lactacina B o lactacina F (Mullet-Powell *et al.*, 1998).

En el presente trabajo se han observado nuevas combinaciones de bacteriocinas que incrementan el efecto individual de estos péptidos frente a *L. monocytogenes*. Es el caso de la combinación nisina-enterocina AS-48 tanto en caldo como en leche, mientras que se han constatado diferencias considerables en el comportamiento del microorganismo patógeno con las combinaciones sinérgicas nisina-TAB 7 y nisina-TAB 57 observadas en caldo TSB y que no se repitieron en leche. Las diferencias en la capacidad inhibitoria de las bacteriocinas existentes entre ambos medios podrían atribuirse al efecto protector de la grasa y las proteínas de la leche frente a la acción de las bacteriocinas (Jung *et al.*, 1992; Degnan *et al.*, 1993; Zapico *et al.*, 1999).

3.2.1.2. Efecto frente a *S. aureus*

Los niveles de *S. aureus* resultaron significativamente ($P < 0,001$) influidos por la adición de bacteriocinas, tanto al caldo de cultivo como a la leche, y por el tiempo de incubación (Tabla 2).

A las 24 h, *S. aureus* alcanzó niveles de 8,61 log ufc/ml en el caldo control. Desde las 4 h y hasta el final del periodo de incubación, no se pudo detectar la presencia del microorganismo patógeno en el caldo con nisina. El resto de las bacteriocinas aplicadas individualmente no mostraron efecto inhibitorio sobre *S. aureus* ni modificaron la acción de la nisina al ser aplicadas en combinación, obteniéndose en todos los casos ausencia de *S. aureus* a las 24 h.

S. aureus alcanzó 8,98 log ufc/ml en la leche control a las 24 h. Los componentes de la leche interfirieron notablemente en la acción de la nisina, observándose diferencias de tan sólo 1,65 unidades logarítmicas respecto del control después de 24 h de incubación. Ninguna bacteriocina aplicada individualmente mostró efecto inhibitorio frente a *S. aureus*, y en combinación con nisina se observaron niveles del microorganismo superiores a los de la nisina aplicada de forma individual.

Mulet-Powell *et al.* (1998) observaron un efecto antagónico al combinar nisina y lacticina 481 frente a *S. aureus*, tanto en medio sólido como en líquido. En el presente trabajo dicho efecto se comprobó fundamentalmente a las 4 h en TSB y a las 24 h en leche, aunque las diferencias observadas entre la aplicación de nisina de forma individual o en combinación con lacticina 481 no fueron estadísticamente significativas.

S. aureus se muestra generalmente más resistente a la acción de las bacteriocinas que *L. monocytogenes*. Sin embargo, se ha demostrado la sensibilidad de este microorganismo a la nisina (Lauková, 1995; Carneiro de Melo *et al.*, 1996), la lactocina 705 (Vignolo *et al.*, 1993), la pediocina PA-1, la lactocina S o la enterocina L50 (enterocina I) (Cintas *et al.*, 1998b; Benkerroum *et al.*, 2002).

Por otro lado, la resistencia de *S. aureus* a bacteriocinas puede aumentar en la leche debido a interferencias con sus componentes y a la capacidad de este patógeno para formar cápsulas de polisacáridos (Opdebeeck *et al.*, 1988) o unirse a los glóbulos grasos de la leche (Ali-Vehmas *et al.*, 1997).

Tabla 2. Supervivencia de bacterias Gram-positivas (log ufc/ml) en TSB y leche con combinaciones de bacteriocinas

		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
		TSB	Leche	TSB	Leche
t = 0	Control	4,42	4,86	3,92	4,41
t = 4 h	Control	5,72 ^c	6,21 ^e	4,54 ^b	4,88 ^a
	Nisina (N)	1,11 ^a	0,43 ^{ab}	0 ^a	4,62 ^a
	TAB 7	4,51 ^{bc}	3,01 ^d	4,64 ^b	4,94 ^a
	Lacticina 481	5,38 ^c	4,99 ^e	4,18 ^b	4,81 ^a
	Enterocina I	0 ^a	4,80 ^e	3,49 ^b	4,76 ^a
	TAB 57	3,69 ^b	6,02 ^e	4,08 ^b	4,72 ^a
	Enterocina AS-48	0 ^a	2,51 ^{cd}	4,46 ^b	4,72 ^a
	N + TAB 7	0 ^a	0,18 ^a	0 ^a	4,66 ^a
	N + lacticina 481	0 ^a	0,70 ^{ab}	0,50 ^a	4,76 ^a
	N + enterocina I	0 ^a	1,70 ^{bcd}	0 ^a	4,68 ^a
	N + TAB 57	0,18 ^a	1,37 ^{abc}	0,18 ^a	4,63 ^a
	N + AS-48	0 ^a	0,18 ^a	0 ^a	4,55 ^a
t = 24 h	Control	8,89 ^{cd}	9,06 ^d	8,61 ^b	8,98 ^d
	Nisina	7,94 ^c	4,87 ^b	0 ^a	7,33 ^a
	TAB 7	9,19 ^d	8,57 ^d	8,53 ^b	9,03 ^d
	Lacticina 481	8,59 ^{cd}	8,68 ^d	8,40 ^b	8,85 ^d
	Enterocina I	0 ^a	8,66 ^d	8,49 ^b	8,87 ^d
	TAB 57	3,31 ^b	8,44 ^d	8,48 ^b	9,14 ^d
	Enterocina AS-48	0,61 ^a	4,98 ^b	8,59 ^b	8,95 ^d
	N + TAB 7	0,75 ^a	5,00 ^b	0 ^a	8,62 ^{cd}
	N + lacticina 481	8,81 ^{cd}	6,53 ^c	0 ^a	7,94 ^{ab}
	N + enterocina I	0 ^a	6,05 ^c	0 ^a	8,03 ^{bc}
	N + TAB 57	0 ^a	6,26 ^c	0 ^a	8,62 ^{cd}
	N + AS-48	0 ^a	3,41 ^a	0 ^a	7,95 ^b

Medias de la misma columna y tiempo con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

3.2.1.3. Efecto frente a bacterias Gram-negativas

Los niveles de las bacterias Gram-negativas ensayadas no resultaron afectados por la adición de bacteriocinas al caldo de cultivo, excepto en los casos de *E. coli* O157:H7 y *Y. enterocolitica* a las 24 h de incubación. Sin embargo, estas diferencias en los recuentos respecto de los caldos control son muy reducidas, por lo que no presentarían ventajas prácticas en el control de estos microorganismos patógenos (Tabla 3).

Las bacteriocinas de bacterias lácticas se consideran normalmente ineficaces frente a las bacterias Gram-negativas, aunque se han descrito casos de inhibición de cepas de *Neisseria* (Mattick y Hirsch, 1947) y *E. coli* (Carneiro de Melo *et al.*, 1996) por nisina, así como de diversas bacterias Gram-negativas por la enterocina AS-48 (Gálvez *et al.*, 1988; Gálvez *et al.*, 1989b). En cualquier caso, se pueden considerar generalmente atribuibles al uso de cantidades de bacteriocina muy elevadas o a la presencia de células con la membrana externa dañada. La capa externa de lipopolisacáridos se ha relacionado con la inefectividad de las bacteriocinas de bacterias lácticas frente a microorganismos Gram-negativos (Stevens, 1991; Ray, 1993).

3.2.2. BACTERIOCINAS Y SISTEMA LP

Se ha estudiado el efecto combinado de distintas bacteriocinas junto con la activación del sistema LP sobre la supervivencia de *L. monocytogenes* y *S. aureus* en leche.

Los niveles de *L. monocytogenes* resultaron significativamente ($P < 0,001$) influidos por los tratamientos con bacteriocinas y sistema LP, así como por el tiempo de incubación (Tabla 4).

L. monocytogenes alcanzó en la leche control niveles de 5,72 y 9,03 log ufc/ml a las 4 h y 24 h, respectivamente. La activación del sistema LP actuó de forma bacteriostática frente a *L. monocytogenes* durante las primeras 4 h, y posteriormente se observó la recuperación del patógeno hasta alcanzar a las 24 h niveles próximos a los de la leche control.

Estos resultados no difieren de los obtenidos por otros autores en leche a 35°C (Kamau *et al.*, 1990a) y 30°C (Bibi y Bachmann, 1990), aunque también se han observado efectos bactericidas del sistema LP durante las primeras horas frente a *L. monocytogenes* en leche a 35°C (El-Shenawy *et al.*, 1990).

Las combinaciones de las bacteriocinas nisina, TAB 7, enterocina I y enterocina AS-48 con el sistema LP actuaron de forma sinérgica, obteniéndose valores de *L. monocytogenes* 8,55, 3,85, 6,15 y 8,28 unidades logarítmicas inferiores a los de la leche control, respectivamente, a las 24 h de incubación.

Tabla 3. Supervivencia de bacterias Gram-negativas (log ufc/ml) en TSB con combinaciones de bacteriocinas

		<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> <i>choleraesuis</i>	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i>	<i>Aeromonas</i> <i>hydrophila</i>	<i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i>
t = 0 h	Control	4,23	3,27	3,92	3,59	3,06
t = 4 h	Control	7,01	5,07	4,01	5,83	4,19
	Nisina (N)	7,05	5,07	3,60	5,84	4,23
	TAB 7	7,01	5,13	3,94	5,75	4,03
	Lacticina 481	7,03	5,10	3,70	5,78	4,29
	Enterocina I	7,04	5,06	3,89	5,81	4,32
	TAB 57	7,11	5,09	3,62	5,81	4,26
	Enterocina AS-48	7,17	5,21	3,60	5,84	4,28
	N + TAB 7	6,87	4,88	3,95	5,69	4,07
	N + lacticina 481	6,97	4,94	3,99	5,78	4,10
	N + enterocina I	6,94	4,94	3,69	5,80	4,02
	N + TAB 57	7,08	5,03	3,84	5,82	4,11
	N + AS-48	7,06	5,08	3,67	5,82	4,12
	t = 24 h	Control	9,44 ^b	8,36	5,77	8,61
Nisina		9,27 ^{ab}	8,32	5,53	8,64	8,38 ^{ab}
TAB 7		9,13 ^a	8,61	5,90	8,56	8,37 ^{ab}
Lacticina 481		9,16 ^b	8,67	5,63	8,59	8,29 ^{ab}
Enterocina I		9,09 ^a	8,66	5,84	8,60	8,42 ^b
TAB 57		9,05 ^a	8,45	5,94	8,53	8,34 ^{ab}
Enterocina AS-48		9,09 ^a	8,76	6,34	8,58	8,30 ^{ab}
N + TAB 7		9,17 ^a	8,62	5,81	8,59	8,39 ^{ab}
N + lacticina 481		9,09 ^a	8,69	5,70	8,63	8,37 ^{ab}
N + enterocina I		9,19 ^{ab}	8,72	5,66	8,63	8,27 ^{ab}
N + TAB 57		9,19 ^{ab}	8,53	5,61	8,53	8,34 ^{ab}
N + AS-48		9,11 ^a	8,63	5,70	8,53	8,25 ^a

Medias de la misma columna y tiempo con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

Tabla 4. Supervivencia de *L. monocytogenes* y *S. aureus* (log ufc/ml) en leche con el sistema LP (LP) en combinación con bacteriocinas

		<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
t = 0 h	Control	4,47	4,71
t = 4 h	Control	5,72 ^g	5,35 ^b
	Nisina (N)	1,00 ^{ab}	4,27 ^a
	TAB 7	2,96 ^{cd}	5,36 ^b
	TAB 20	5,47 ^{gh}	5,29 ^b
	Lacticina 481	4,85 ^{efg}	5,28 ^b
	Enterocina I	5,00 ^{fgh}	5,33 ^b
	TAB 57	5,65 ^g	5,26 ^b
	Enterocina AS-48	2,33 ^c	5,25 ^b
	LP	4,30 ^{efg}	4,02 ^a
	LP + N	0 ^a	3,71 ^a
	LP + TAB 7	1,79 ^{bc}	3,90 ^a
	LP + TAB 20	4,18 ^{ef}	3,95 ^a
	LP + lacticina 481	4,17 ^{ef}	4,03 ^a
	LP + enterocina I	3,76 ^{de}	3,98 ^a
	LP + TAB 57	4,17 ^{ef}	3,97 ^a
	LP + AS-48	2,42 ^c	3,92 ^a
t = 24 h	Control	9,03 ^d	8,03 ^c
	Nisina	4,56 ^{bc}	7,48 ^{ab}
	TAB 7	8,54 ^d	8,08 ^c
	TAB 20	8,76 ^d	8,03 ^c
	Lacticina 481	8,60 ^d	8,09 ^c
	Enterocina I	8,56 ^d	8,05 ^c
	TAB 57	8,46 ^d	8,00 ^c
	Enterocina AS-48	3,35 ^b	8,11 ^c
	LP	8,55 ^d	7,81 ^{bc}
	LP + N	0,48 ^a	7,12 ^a
	LP + TAB 7	5,18 ^c	7,91 ^{bc}
	LP + TAB 20	8,38 ^d	7,93 ^c
	LP + lacticina 481	7,59 ^d	7,91 ^{bc}
	LP + enterocina I	2,87 ^b	7,92 ^{bc}
	LP + TAB 57	8,44 ^d	7,92 ^{bc}
	LP + AS-48	0,75 ^a	7,94 ^c

Medias de la misma columna y tiempo con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

Zapico *et al.* (1998) y Boussouel *et al.* (1999) describieron el efecto inhibitorio sinérgico de la combinación nisina-sistema LP frente a *L. monocytogenes* en leche a 30°C y 25°C, respectivamente. Sin embargo, Rodríguez *et al.* (1997) no observaron un incremento en las reducciones de este microorganismo al tratar leche cruda refrigerada a 4°C y 8°C con el productor de enterocina AS-48 *Ec. faecalis* INIA 4 junto con el sistema LP.

Los niveles de *S. aureus* también resultaron significativamente ($P < 0,001$) influidos al aplicar estos tratamientos a la leche, así como por el tiempo de incubación (Tabla 4).

A las 4 h, *S. aureus* alcanzó niveles de 5,35 log ufc/ml en la leche control. El tratamiento más efectivo después de 4 h fue la combinación del sistema LP con nisina, que condujo a unas diferencias en los niveles del microorganismo de 1,64 unidades logarítmicas respecto del control, mientras que las diferencias observadas en leche con el sistema LP de forma individual fueron de 1,33 unidades logarítmicas.

Después de 24 h de incubación, *S. aureus* alcanzó en la leche control 8,03 log ufc/ml. Los recuentos más bajos del patógeno se obtuvieron de nuevo con la combinación sistema LP-nisina, con niveles 0,91 unidades logarítmicas inferiores a los de la leche control. Con el resto de combinaciones de bacteriocinas con el sistema LP no se incrementó el efecto inhibitorio individual del sistema LP. Kamau *et al.* (1990a) también observaron un efecto bactericida inicial del sistema LP frente a *S. aureus* en leche a 37°C, y una recuperación del microorganismo entre las 2 h y las 4 h posteriores. La leche con nisina fue el segundo tratamiento inhibitorio más efectivo, mostrando una reducción en los niveles de *S. aureus* de 0,55 unidades logarítmicas respecto al control.

La combinación sistema LP-nisina se mostró ligeramente más efectiva que la suma de los dos tratamientos individuales a las 24 h. No obstante, a diferencia de *L. monocytogenes*, la población de *S. aureus* se recuperó y alcanzó niveles de 7,12 log ufc/ml.

3.2.3. NISINA Y SISTEMA LP EN REFRIGERACIÓN

Se ha estudiado el efecto de la combinación de nisina junto con la activación del sistema LP, por ser los más efectivos a las temperaturas óptimas de crecimiento, sobre la supervivencia de *L. monocytogenes* y *S. aureus* a 4°C y 8°C. Estas temperaturas influyen notablemente en el comportamiento de las bacterias patógenas y presentan un interés práctico para el almacenamiento y transporte de alimentos.

Los niveles de *L. monocytogenes* y *S. aureus* en la leche se vieron significativamente influidos ($P < 0,001$) por los tratamientos empleados y por el tiempo de refrigeración, tanto a 4°C como a 8°C.

3.2.3.1. Efecto frente a *L. monocytogenes*

Después de permanecer 12 d en refrigeración, *L. monocytogenes* alcanzó en la leche niveles de 6,58 log ufc/ml a 4°C (Tabla 5) y de 8,51 log ufc/ml a 8°C (Tabla 6). Rosso *et al.* (1996) pusieron de manifiesto las diferencias observadas en las curvas de crecimiento de este microorganismo en productos lácteos refrigerados a 4°C y 8°C.

La nisina presentó, a ambas temperaturas, un efecto bactericida en los primeros estadíos. Posteriormente se comprobó el crecimiento de células resistentes de *L. monocytogenes*. A 4°C, se observaron en la leche con nisina diferencias de 4,45 unidades logarítmicas respecto de la leche control después de 12 d, mientras que a 8°C estas diferencias fueron de tan sólo 1,82 unidades logarítmicas.

De acuerdo con nuestros resultados se confirmó el efecto más retardado de la nisina sobre las células sensibles cuanto más baja era la temperatura. Este efecto proporcionaría una barrera adicional al crecimiento del microorganismo patógeno y prolongaría la actividad de la bacteriocina en el tiempo (Parente y Hill, 1992c; Mathieu *et al.*, 1994).

A los 5 d, Mathieu *et al.* (1994) observaron en leche desnatada refrigerada a 7°C con carnocina 5, diferencias de 5 unidades logarítmicas en los niveles de *L. monocytogenes* respecto de la leche control. Posteriormente el microorganismo reanudó el crecimiento alcanzando valores de 6,7 log ufc/ml a los 14 d. La adición de pediocina 5 en leche provocó una reducción de entre 3 y 4,3 log ufc/ml en tres cepas de *L. monocytogenes* después de 1 d a 4°C, periodo tras el cual se inició el crecimiento (Huang *et al.*, 1994). *L. monocytogenes* Ohio alcanzó en leche estéril niveles de 8,7 log ufc/ml después de 6 d a 4,5°C, mientras que en presencia del productor de bacteriocina *Pediococcus pentosaceus* FBB-61 la población del patógeno se redujo en 1,2 unidades logarítmicas (Raccach y Geshell, 1993).

A 4°C, el sistema LP presentó un efecto bacteriostático sobre los niveles de *L. monocytogenes*, observándose al finalizar el periodo de refrigeración, recuentos 2,30 unidades logarítmicas inferiores a los de la leche control. A 8°C, dicho efecto bacteriostático se mantuvo hasta el tercer día, a partir del cual se reinició su crecimiento hasta valores cercanos a los de la leche control. Otros autores también han observado recuentos inferiores de esta misma cepa en leche cruda con el sistema LP respecto de leche no tratada, tanto a 4 como a 8°C (Gaya *et al.*, 1991; Rodríguez *et al.*, 1997).

El tratamiento combinado sistema LP-nisina resultó altamente efectivo frente a *L. monocytogenes* a las dos temperaturas de refrigeración ensayadas, reduciendo los niveles del microorganismo patógeno por debajo del límite de detección a 4°C y 8°C, desde los 7 d y 5 d respectivamente. Se observó un efecto sinérgico superior a 8°C que a 4°C.

Rodríguez *et al.* (1997) comprobaron un efecto inhibitorio sinérgico al añadir el productor de nisina *Lc. lactis* ESI 515 y activar el sistema LP en leche cruda a 8°C que atribuyeron a una mayor producción de nisina por parte del lactococo cuando el sistema LP estaba activado en la leche.

La efectividad de este tratamiento a ambas temperaturas de refrigeración presentaría un interés considerable como sistema protector frente a la eventual presencia de *L. monocytogenes* en el transporte y almacenamiento de la leche, ya que durante estos periodos pueden existir fluctuaciones de temperatura respecto de la óptima de refrigeración que permitirían el desarrollo del patógeno.

Tabla 5. Supervivencia de *L. monocytogenes* (log ufc/ml) en leche con nisina (N) y sistema LP (LP) a 4°C

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	4,14	4,14 ^c	4,18 ^c	4,20 ^c	4,36 ^d	4,80 ^d	6,58 ^d
N		2,55 ^b	1,98 ^b	1,08 ^b	1,29 ^b	1,58 ^b	2,13 ^b
LP		4,13 ^c	4,13 ^c	4,10 ^c	4,14 ^c	4,08 ^c	4,28 ^c
LP + N		1,93 ^a	1,49 ^a	0,75 ^a	0,15 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

Tabla 6. Supervivencia de *L. monocytogenes* (log ufc/ml) en leche con nisina (N) y sistema LP (LP) a 8°C

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	4,17	4,13 ^c	4,19 ^c	5,70 ^d	6,75 ^d	7,99 ^d	8,51 ^d
N		2,44 ^b	0,89 ^b	1,35 ^b	2,63 ^b	4,62 ^b	6,69 ^b
LP		4,12 ^c	4,07 ^c	4,12 ^c	4,56 ^c	5,62 ^c	7,93 ^c
LP + N		1,63 ^a	0,63 ^a	0,30 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

3.2.3.2. Efecto frente a *S. aureus*

S. aureus se inoculó en la leche con aproximadamente 4,50 log ufc/ml y no se desarrolló en la leche ni a 4°C ni a 8°C (Tablas 7 y 8), observándose niveles del patógeno de 3,62 y 3,93 log ufc/ml, respectivamente, después de 12 d.

A 4°C, la mayor reducción de *S. aureus* en la leche se obtuvo al aplicar nisina individualmente, con valores 1,20 unidades logarítmicas inferiores a los de la leche control al final de la refrigeración. El sistema LP no afectó a la supervivencia de *S. aureus*. Con la combinación LP-nisina se observó desde los 7 d, un efecto antagónico entre ambos antimicrobianos.

A 8°C, la adición de nisina a la leche redujo los niveles del patógeno en 0,85 unidades logarítmicas con respecto a la leche control, mientras que en combinación con el sistema LP esta reducción fue de 1,61 unidades logarítmicas, produciéndose por tanto, un efecto inhibitorio sinérgico frente a *S. aureus*. La leche con el sistema LP no presentó diferencias en los recuentos respecto de la leche control.

Zapico (1993) no observó crecimiento de *S. aureus* en leche cruda refrigerada a 4°C u 8°C, ni reducciones en los niveles de este microorganismo al activar el sistema LP en leche cruda respecto del control.

De acuerdo con nuestros resultados, la combinación sistema LP-nisina resultó eficaz en la reducción de los niveles de *S. aureus* en leche refrigerada a 8°C, mientras que a 4°C la nisina ejerció una mayor inhibición de forma individual que en combinación con el sistema LP.

Tabla 7. Supervivencia de *S. aureus* (log ufc/ml) en leche desnatada UHT con nisina (N) y sistema LP (LP) a 4°C

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	4,49	4,42 ^c	4,42 ^c	4,23 ^b	4,18 ^b	3,97 ^c	3,62 ^b
N		4,20 ^b	4,09 ^b	3,75 ^a	3,66 ^a	3,25 ^a	2,42 ^a
LP		4,38 ^c	4,30 ^c	4,24 ^b	4,22 ^b	4,26 ^d	4,23 ^c
LP + N		3,92 ^a	3,93 ^a	3,79 ^a	3,75 ^a	3,57 ^b	3,51 ^b

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

Tabla 8. Supervivencia de *S. aureus* (log ufc/ml) en leche desnatada UHT con nisina (N) y sistema LP (LP) a 8°C

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	4,55	4,38 ^c	4,38 ^b	4,20 ^c	4,07 ^c	4,00 ^b	3,94 ^c
N		4,02 ^b	3,87 ^a	3,45 ^b	3,22 ^b	3,04 ^a	3,09 ^b
LP		4,30 ^c	4,28 ^b	4,23 ^c	4,24 ^d	4,26 ^c	4,10 ^c
LP + N		3,84 ^a	3,74 ^a	3,09 ^a	3,05 ^a	2,97 ^a	2,32 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

3.2.4. NISINA, SISTEMA LP Y CITRATO EN REFRIGERACIÓN

Se ha estudiado el efecto de las combinaciones de nisina, sistema LP y citrato frente a bacterias patógenas Gram-negativas en leche refrigerada a 4°C y 8°C. Se empleó el citrato como agente quelante que afectaría a la pared celular de los microorganismos Gram-negativos y aumentaría la posibilidad de sensibilización frente a bacteriocinas.

Los niveles de *E. coli* O157:H7, *Sal. choleraesuis*, *C. jejuni*, *A. hydrophila* y *Y. enterocolitica* resultaron significativamente influidos ($P < 0,001$) por los tratamientos utilizados y por el tiempo de refrigeración, tanto en los recuentos en medio general como en medio selectivo a 4°C y a 8°C.

3.2.4.1. Efecto frente a *E. coli* O157:H7

Después de 12 d a 4°C, se observó en la leche control un descenso en los niveles del patógeno de 1,52 log ufc/ml (Tabla 9), mientras que a 8°C se incrementaron sus niveles, alcanzando 7,13 log ufc/ml (Tabla 11). Zapico *et al.* (1995) observaron un comportamiento similar de *E. coli* en leche cruda refrigerada a las mismas temperaturas.

En la leche a 4°C, la adición de nisina no afectó a la supervivencia de *E. coli* ni incrementó la inhibición detectada con citrato o sistema LP. En la leche con citrato *E. coli* presentó a los 12 d unas diferencias de 0,45 unidades logarítmicas respecto del control, mientras que en la leche con el sistema LP esta diferencia fue de 0,95 unidades logarítmicas. Las reducciones más altas de este microorganismo a los 12 d se obtuvieron con las combinaciones sistema LP-citrato y sistema LP-nisina-citrato, con niveles 1,87 y 1,75 unidades logarítmicas inferiores a los de la leche control, respectivamente. En la combinación sistema LP-citrato se observó un efecto inhibitorio sinérgico frente a *E. coli* O157:H7.

Farrag *et al.* (1992a) observaron en leche cruda con el sistema LP activado un descenso de *E. coli* O157:H7 de 4 unidades logarítmicas después de 5 d a 4°C, mientras que en la leche control se mantuvieron los niveles iniciales del microorganismo.

Tabla 9. Supervivencia de *E. coli* O157:H7 (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 4°C. Recuentos en TSA

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	4,51	4,40 ^c	4,14 ^d	3,97 ^c	3,70 ^c	3,56 ^e	2,99 ^e
N		4,31 ^c	3,95 ^d	3,82 ^c	3,60 ^c	3,44 ^e	2,97 ^e
C		4,05 ^b	3,40 ^{ab}	3,85 ^c	3,68 ^c	3,46 ^e	2,54 ^d
N + C		4,04 ^b	3,34 ^a	3,58 ^b	3,53 ^c	3,00 ^d	2,45 ^d
LP		3,90 ^b	3,69 ^c	3,23 ^a	2,59 ^b	2,26 ^c	2,04 ^c
LP + N		3,92 ^b	3,70 ^c	3,15 ^a	2,67 ^b	2,21 ^c	2,15 ^c
LP + C		3,87 ^b	3,59 ^b	3,13 ^a	2,20 ^a	1,71 ^a	1,12 ^a
LP + N + C		3,31 ^a	3,55 ^{abc}	3,09 ^a	2,72 ^b	1,94 ^b	1,24 ^b

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

Tras 12 d en refrigeración a 4°C, el 83% de las células de la leche control no fueron capaces de crecer en VRBA (Tabla 10). No se observaron diferencias significativas en

los recuentos de *E. coli* en VRBA en leche con nisina respecto de los de la leche control. En la leche con el sistema LP o sistema LP-nisina se observaron recuentos 0,61 y 0,72 unidades logarítmicas inferiores en VRBA que en TSA, respectivamente, mientras que con los tratamientos con citrato o nisina-citrato el número de células con daños subletales alcanzó valores próximos a una unidad logarítmica. Con el tratamiento LP-citrato no se detectó *E. coli* en VRBA tras 12 d a 4°C.

Tabla 10. Supervivencia de *E. coli* O157:H7 (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 4°C. Recuentos en VRBA

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	4,42	4,14 ^c	3,71 ^d	3,27 ^e	2,99 ^e	2,56 ^{de}	2,22 ^c
N		4,09 ^c	3,70 ^d	3,25 ^e	3,07 ^e	2,78 ^e	2,25 ^c
C		3,59 ^b	3,42 ^c	2,97 ^d	2,67 ^d	2,50 ^d	1,56 ^b
N + C		3,58 ^b	3,41 ^c	2,84 ^d	2,62 ^d	2,42 ^d	1,55 ^b
LP		3,42 ^b	3,30 ^{bc}	1,98 ^{bc}	1,78 ^c	1,59 ^c	1,43 ^b
LP + N		3,51 ^b	3,13 ^b	2,10 ^c	1,66 ^{bc}	1,28 ^b	1,43 ^b
LP + C		2,80 ^a	2,70 ^a	1,52 ^a	0,70 ^a	0,60 ^a	0 ^a
LP + N + C		2,73 ^a	2,69 ^a	1,77 ^{ab}	1,48 ^b	0,80 ^a	0,15 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

Después de 12 d a 8°C, la nisina y el citrato aplicados individualmente dieron lugar a valores de *E. coli* O157:H7 0,37 y 1,13 unidades logarítmicas inferiores a los de la leche control, respectivamente, mientras que ambos tratamientos en combinación incrementaron estas diferencias hasta 1,43 unidades logarítmicas. En leche con el sistema LP los niveles de *E. coli* resultaron 4,55 unidades logarítmicas inferiores a los de la leche control. La mayor reducción en los niveles del patógeno se observó, nuevamente, con el tratamiento combinado sistema LP-citrato, el cual presentó un efecto bactericida sinérgico a las 24 h que dio lugar a diferencias de 5,45 unidades logarítmicas con respecto a la leche control. El tratamiento triple no incrementó el efecto inhibitorio de la combinación sistema LP-citrato.

Earnshaw *et al.* (1990) comprobaron la actividad inhibitoria del sistema LP frente a *E. coli* durante las primeras 24 h en una fórmula de leche infantil almacenada a 15°C. Seguidamente el patógeno reinició su crecimiento alcanzando niveles similares al control.

Los niveles de 4 cepas verotoxigénicas de *E. coli* descendieron 2,3 log ufc/ml en agua peptonada tratada con 100 UI/ml de nisina tras 14 d de refrigeración a 6,5°C, mientras que en el agua control el descenso fue de 0,88 log ufc/ml (Elliason y Tatini, 1999). Según estos autores, los cambios en los ácidos grasos, así como la alteración de las características de permeabilidad de la membrana ocasionados por las bajas temperaturas, podrían ser la causa de la sensibilización de determinados microorganismos patógenos Gram-negativos a la acción de la nisina.

Tabla 11. Supervivencia de *E. coli* O157:H7 (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 8°C. Recuentos en TSA

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	4,34	4,38 ^f	4,59 ^f	5,13 ^g	5,53 ^e	5,99 ^f	7,13 ^h
N		4,32 ^{ef}	4,45 ^{ef}	4,92 ^f	5,34 ^d	5,81 ^e	6,76 ^g
C		4,19 ^{de}	4,33 ^{de}	4,63 ^e	4,90 ^c	5,15 ^d	6,00 ^f
N + C		4,07 ^{cd}	4,26 ^d	4,56 ^e	4,82 ^c	5,04 ^d	5,70 ^e
LP		4,10 ^{cd}	3,48 ^c	3,04 ^c	2,61 ^b	2,48 ^b	2,58 ^c
LP + N		3,92 ^{bc}	3,27 ^b	2,83 ^b	2,61 ^b	2,82 ^c	3,34 ^d
LP + C		3,80 ^b	2,86 ^a	2,60 ^a	1,95 ^a	1,75 ^a	1,68 ^a
LP + N + C		3,47 ^a	3,26 ^b	3,30 ^d	2,67 ^b	2,65 ^{bc}	2,25 ^b

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

En nuestro trabajo, después de 12 d en refrigeración, las células de *E. coli* se mostraron menos dañadas a 8°C que a 4°C, con un 30,8% de células incapaces de crecer en VRBA en la leche control (Tabla 12). El mayor número de células con daños subletales a los 12 d se observó cuando se trataron con citrato, con recuentos 0,44 unidades logarítmicas inferiores en VRBA que en TSA. No se detectaron diferencias significativas en los recuentos en VRBA de *E. coli* tratada con citrato y nisina-citrato, por lo que cabe suponer que la nisina impidió la recuperación en TSA de las células dañadas por el citrato. En la leche a 8°C con el sistema LP, tanto de forma individual como en combinación, se observó un menor número de células con daños subletales que en leche a 4°C.

Tabla 12. Supervivencia de *E. coli* O157:H7 (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 8°C. Recuentos en VRBA

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	4,35	4,07 ^d	4,41 ^e	4,96 ^e	5,40 ^d	5,89 ^f	6,97 ^g
N		4,18 ^d	4,23 ^e	4,87 ^e	5,30 ^d	5,66 ^f	6,60 ^f
C		4,15 ^d	3,97 ^d	4,11 ^d	4,38 ^c	4,89 ^e	5,56 ^e
N + C		4,06 ^d	3,92 ^d	4,23 ^d	4,29 ^c	4,74 ^e	5,50 ^e
LP		3,53 ^c	3,37 ^c	2,26 ^b	2,40 ^b	2,34 ^c	2,41 ^c
LP + N		2,86 ^b	3,09 ^b	2,69 ^c	2,44 ^b	2,70 ^d	3,25 ^d
LP + C		2,33 ^a	2,60 ^a	1,84 ^a	1,26 ^a	1,42 ^a	1,45 ^a
LP + N + C		2,25 ^a	2,86 ^b	2,83 ^c	1,36 ^a	1,94 ^b	1,95 ^b

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

3.2.4.2. Efecto frente a *Sal. choleraesuis*

A 4°C, *Sal. choleraesuis* con un recuento en leche de 3,87 log ufc/ml, presentó valores de 3,56 log ufc/ml tras 12 d de refrigeración (Tabla 13).

Con la nisina se observó una diferencia en los niveles del patógeno al final de la refrigeración de 0,58 unidades logarítmicas respecto de la leche control. En leche con el sistema LP se registraron valores 1,84 unidades logarítmicas inferiores a los de la leche control, mientras que en leche con citrato esta diferencia fue de 1,40 unidades logarítmicas.

Aunque se trata de una bacteria Gram-negativa, existen algunos datos de actividad inhibitoria de bacteriocinas sobre *Salmonella*. Elliason y Tatini (1999) observaron en agua peptonada con 100 UI/ml de nisina un descenso en *Sal. typhimurium* de 1,69 log ufc/ml después de 14 d a 6,5°C. *Salmonella* se mostró sensible a nisina en combinación con agentes quelantes que permeabilizan su membrana externa (Stevens *et al.*, 1991). La sensibilidad de *Salmonella* a determinadas bacteriocinas también ha sido demostrada mediante ensayos con esferoplastos (Abriouel *et al.*, 1998).

El tratamiento combinado nisina-citrato dio lugar a diferencias en los niveles de *Sal. choleraesuis* respecto del control de 2,00 unidades logarítmicas al final de la refrigeración, observándose un efecto sinérgico frente al patógeno a lo largo de todo el periodo estudiado.

La mayor inhibición de *Sal. choleraesuis* se obtuvo con el tratamiento sistema LP-nisina-citrato, con un efecto sinérgico entre las 8 h y los 7 d de almacenamiento que redujo la población del patógeno hasta valores inferiores a 10 ufc/ml desde el quinto día

de refrigeración. A los 12 d, los resultados obtenidos con el tratamiento triple fueron semejantes a las obtenidos con el sistema LP-citrato.

Tabla 13. Supervivencia de *Sal. choleraesuis* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 4°C. Recuentos en TSA

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	3,87	3,84 ^f	3,80 ^d	3,76 ^e	3,65 ^g	3,58 ^f	3,56 ^e
N		3,81 ^{ef}	3,78 ^d	3,56 ^{de}	3,35 ^f	3,28 ^e	2,98 ^d
C		3,76 ^{de}	3,63 ^d	3,38 ^d	2,95 ^e	2,58 ^d	2,16 ^c
N + C		3,19 ^b	3,07 ^b	2,81 ^c	2,40 ^d	1,97 ^c	1,56 ^b
LP		3,58 ^{cd}	3,33 ^c	2,95 ^c	2,25 ^{cd}	2,04 ^c	1,72 ^b
LP + N		3,62 ^{cde}	3,30 ^c	2,91 ^c	2,18 ^c	2,05 ^c	1,65 ^b
LP + C		3,46 ^c	3,01 ^b	2,16 ^b	1,57 ^b	1,06 ^b	0,15 ^a
LP + N + C		2,90 ^a	2,58 ^a	1,87 ^a	0,76 ^a	0 ^a	0,15 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

Después de 8 h de refrigeración a 4°C, no se observaron células con daños subletales en la leche control, mientras que a las 24 h un 36,9% de las células de *Salmonella* no fueron capaces de crecer en VRBA, y el porcentaje se elevó hasta el 96,2% a los 12 d (Tabla 14).

Al final de la refrigeración, el número de células con daños subletales en la leche con el sistema LP fue de superior a 1,5 unidades logarítmicas, mientras que en la leche con la combinación sistema LP-citrato el número se redujo a 0,15 log ufc/ml, indicando una acción del citrato frente a las células dañadas por el sistema LP. En la leche con el sistema LP-citrato y sistema LP-nisina-citrato *Salmonella* presentó recuentos similares en XLDA a las 8 h y 24 h, y no se detectó desde el tercer día. Sin embargo, en TSA los niveles del patógeno en presencia de LP-citrato resultaron 0,29, 0,81 y 1,06 unidades logarítmicas superiores a los 3 d, 5 d y 7 d, respectivamente, respecto de los determinados en leche con LP-nisina-citrato. Estas diferencias podrían indicar la presencia de células con daños subletales sensibles a la acción inhibitoria de la nisina.

También Elliason y Tatini (1999) observaron un incremento en las células de *Salmonella* con daños subletales a lo largo de 28 d de refrigeración a 6,5°C. A los 14 d en presencia de nisina, un 60% de las células resistentes fueron sensibles al desoxicolato del medio selectivo empleado en el estudio, mientras que a los 28 d el porcentaje de células sensibles aumentó al 100%.

Tabla 14. Supervivencia de *Sal. choleraesuis* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 4°C. Recuentos en XLDA

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	3,79	3,86 ^d	3,60 ^d	2,82 ^e	2,71 ^f	2,31 ^a	2,14 ^e
N		3,84 ^d	3,56 ^d	2,73 ^e	2,35 ^e	1,88 ^f	1,58 ^d
C		3,37 ^c	2,96 ^c	2,06 ^d	1,63 ^d	1,24 ^e	0,69 ^c
N + C		2,95 ^b	2,91 ^c	1,78 ^c	1,45 ^d	0,92 ^d	0,35 ^b
LP		3,01 ^b	2,68 ^b	1,34 ^b	0,59 ^c	0,39 ^b	0,15 ^{ab}
LP + N		3,00 ^b	2,63 ^b	1,58 ^c	0,24 ^b	0,65 ^c	0,63 ^c
LP + C		2,43 ^a	1,46 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
LP + N + C		2,33 ^a	1,41 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

Después de 12 d a 8°C, *Sal. choleraesuis* presentó valores de 3,51 log ufc/ml en la leche control (Tabla 15). En leche con nisina se observaron diferencias en los niveles de *Salmonella* con respecto a la leche control entre 0,43 y 0,59 unidades logarítmicas desde el tercer día. La adición de citrato a la leche dio lugar a reducciones menos marcadas a 8°C que a 4°C. La combinación nisina-citrato no incrementó el efecto inhibitorio del uso de individual de nisina. Tampoco se observaron diferencias significativas ($P < 0,01$) en los niveles del patógeno al aplicar el sistema LP de forma individual o en combinación con nisina, obteniéndose en ambos casos reducciones de *Salmonella* de 1,7 unidades logarítmicas respecto del control. El tratamiento más efectivo frente a *Sal. choleraesuis* fue la combinación triple, con niveles del patógeno 2,63 unidades logarítmicas inferiores a los de la leche control. Estas diferencias fueron similares a las obtenidas con el sistema LP-citrato. Se observó un efecto inhibitorio sinérgico en la combinación sistema LP-citrato durante todo el periodo de refrigeración estudiado.

Wolfson y Sumner (1994) comprobaron diferencias en la actividad del sistema LP frente a *Sal. typhimurium* en TSB a 37°C en función del inóculo de partida. El sistema LP presentó un efecto bactericida cuando el inóculo era de 10^3 y 10^5 ufc/ml, mientras que niveles iniciales de 10^7 ufc/ml permitieron a *Salmonella* reanudar el crecimiento después de 16 h. En una fórmula de leche infantil tratada con el sistema LP y almacenada a 15°C, los niveles de *Sal. typhimurium* descendieron durante los 2-3 primeros días y posteriormente se reanudó el crecimiento (Earnshaw *et al.*, 1990).

Tabla 15. Supervivencia de *Sal. choleraesuis* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 8°C. Recuentos en TSA

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	3,96	3,91 ^e	3,85 ^e	3,71 ^d	3,64 ^f	3,68 ^e	3,51 ^e
N		3,84 ^{de}	3,76 ^e	3,28 ^c	3,19 ^{de}	3,09 ^d	3,04 ^{cd}
C		3,86 ^e	3,68 ^{de}	3,41 ^c	3,34 ^e	3,10 ^d	3,21 ^d
N + C		3,62 ^{cd}	3,47 ^{cd}	3,21 ^c	3,04 ^d	2,96 ^d	2,98 ^c
LP		3,37 ^b	3,01 ^b	2,57 ^b	2,28 ^c	2,01 ^c	1,81 ^b
LP + N		3,43 ^{bc}	3,37 ^c	2,41 ^b	2,35 ^c	2,12 ^c	1,80 ^b
LP + C		3,34 ^{ab}	2,72 ^a	2,18 ^a	1,65 ^b	1,25 ^b	1,00 ^a
LP + N + C		3,13 ^a	2,56 ^a	2,13 ^a	1,40 ^a	1,02 ^a	0,88 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

En leche control refrigerada a 8°C, no se observaron células con daños subletales hasta los 5 d de refrigeración, pero la población de células dañadas alcanzó un 95,2% a los 12 d (Tabla 16).

Cuando los recuentos de *Sal. choleraesuis* se realizaron en XLDA en la leche tratada con las combinaciones sistema LP-citrato y sistema LP-nisina-citrato no se detectó la presencia del patógeno desde el tercer día.

Tabla 16. Supervivencia de *Sal. choleraesuis* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 8°C. Recuentos en XLDA

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	3,90	3,77 ^c	3,79 ^e	3,80 ^d	3,05 ^d	2,35 ^b	2,19 ^c
N		3,79 ^c	3,63 ^e	3,08 ^c	2,48 ^c	1,93 ^c	2,15 ^c
C		3,66 ^c	2,96 ^d	3,13 ^c	2,95 ^d	2,82 ^e	2,32 ^c
N + C		3,49 ^c	2,94 ^d	3,01 ^c	2,70 ^{cd}	2,66 ^{de}	2,30 ^c
LP		2,74 ^{ab}	2,21 ^c	1,51 ^b	1,18 ^b	1,01 ^b	0,88 ^b
LP + N		2,88 ^b	2,13 ^c	1,55 ^b	1,08 ^b	1,16 ^b	0,50 ^b
LP + C		2,67 ^{ab}	1,61 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
LP + N + C		2,37 ^a	1,10 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

3.2.4.3. Efecto frente a *C. jejuni*

C. jejuni no fue capaz de desarrollarse en la leche durante el periodo de refrigeración estudiado, observándose después de 12 d niveles de 3,06 log ufc/ml, tanto a 4°C (Tabla 17) como a 8°C (Tabla 19).

No se observaron diferencias significativas en los niveles de *C. jejuni* entre la leche con nisina y la leche control, a ninguna de las dos temperaturas ensayadas.

A los 12 d a 4°C, la leche con citrato presentó niveles de *C. jejuni* 1,03 unidades logarítmicas inferiores a los de la leche control. La combinación nisina-citrato no incrementó la inhibición observada.

Mediante la activación del sistema LP, *C. jejuni* no se detectó desde los tres días y hasta el final de la refrigeración, mientras que con las combinaciones del sistema LP con citrato o nisina y la combinación triple los valores de *C. jejuni* fueron inferiores al límite de detección desde las 24 h hasta los 12 d de refrigeración.

Beumer *et al.* (1985) observaron que la reducción de *C. jejuni* al activar el sistema LP en leche pasteurizada era mayor a 30°C que a 7°C, así como a valores de pH de 5,5 que a 6,7 ó de 7,5. Por otro lado, Borch *et al.* (1989) observaron un efecto bactericida superior del sistema LP frente a este patógeno en leche UHT incubada a 37°C que a 20°C.

Tabla 17. Supervivencia de *C. jejuni* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 4°C. Recuentos en BAB n° 2

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	3,38	3,45 ^e	3,50 ^d	3,13 ^c	3,38 ^c	3,27 ^d	3,06 ^c
N		3,45 ^e	3,44 ^d	3,16 ^c	3,41 ^c	3,18 ^d	3,03 ^c
C		3,31 ^{de}	3,20 ^c	2,61 ^b	2,81 ^b	2,30 ^c	2,03 ^b
N + C		3,28 ^d	3,22 ^c	2,65 ^b	2,80 ^b	2,09 ^b	2,11 ^b
LP		1,05 ^a	0,58 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
LP + N		1,30 ^b	0 ^a				
LP + C		1,35 ^b	0 ^a				
LP + N + C		1,52 ^c	0 ^a				

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

El 59,3% de las células de *C. jejuni* de la leche control no crecieron en el medio con el suplemento selectivo después de 12 d de refrigeración a 4°C, lo que podría explicarse por daño celular debido al frío (Tabla 18). En leche con el sistema LP, de forma individual o en combinación, no se detectó la presencia de *C. jejuni* desde las 24 h de refrigeración.

Tabla 18. Supervivencia de *C. jejuni* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 4°C. Recuentos en BAB n° 2 + suplemento selectivo

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	3,44	2,96 ^d	3,08 ^c	2,09 ^c	2,72 ^c	2,71 ^c	2,67 ^d
N		2,62 ^c	2,49 ^b	2,12 ^c	2,67 ^c	2,99 ^c	2,51 ^d
C		2,33 ^b	2,60 ^b	1,32 ^b	0,60 ^b	1,02 ^b	0,59 ^b
N + C		2,55 ^{bc}	2,41 ^b	1,16 ^b	0,39 ^b	1,21 ^b	1,05 ^c
LP		0,78 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
LP + N		0,73 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
LP + C		0,73 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
LP + N + C		0,71 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

A 8°C no se detectó efecto inhibitorio de la nisina sobre *C. jejuni*. Después de 12 d en leche con citrato se registraron diferencias de 1,35 unidades logarítmicas en los niveles del patógeno respecto de la leche control. El tratamiento combinado nisina-citrato no incrementó el efecto inhibitorio individual del citrato.

La combinación sistema LP-nisina resultó la más efectiva a las 8 h, observándose diferencias en los niveles del patógeno 2,91 unidades logarítmicas inferiores respecto del control. En leche con el sistema LP, sólo o en combinación, no se detectó *C. jejuni* desde las 24 h y hasta el final de la refrigeración. Beumer *et al.* (1985) observaron en leche refrigerada a 7°C con el sistema LP activado, un descenso de aproximadamente 0,9 log ufc/ml en los recuentos de *C. jejuni*, después de 24 h.

Tabla 19. Supervivencia de *C. jejuni* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 8°C. Recuentos en BAB n°2

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	3,47	3,72 ^e	3,51 ^c	3,42 ^c	3,36 ^d	3,09 ^d	3,06 ^c
N		3,76 ^e	3,60 ^c	3,37 ^c	3,35 ^d	2,98 ^d	3,08 ^c
C		3,49 ^d	3,25 ^b	2,68 ^b	2,53 ^c	2,03 ^c	1,71 ^b
N + C		3,51 ^d	3,10 ^b	2,66 ^b	2,31 ^b	1,76 ^b	1,64 ^b
LP		2,41 ^c	0 ^a				
LP + N		0,81 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
LP + C		1,23 ^b	0 ^a				
LP + N + C		1,40 ^b	0 ^a				

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

Después de 12 d a 8°C, el 61,1% de las células de *C. jejuni* mostraron daños subletales en la leche control (Tabla 20). Como ocurrió a 4°C, con el sistema LP aplicado individualmente o en combinación tampoco se pudo detectar la presencia de *C. jejuni* en el medio selectivo desde las 24 h hasta los 12 d. A las 8 h, en leche con el sistema LP se observaron recuentos del patógeno 1,28 unidades logarítmicas inferiores en el medio selectivo respecto del no selectivo. En cambio, la combinación sistema LP-citrato redujo a 0,38 unidades logarítmicas el número de células con daños subletales y éstas no fueron apreciables en la leche con el tratamiento sistema LP-nisina, por lo que tanto la nisina como el citrato podrían de alguna forma evitar la presencia de las células dañadas por el sistema LP.

Tabla 20. Supervivencia de *C. jejuni* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 8°C. Recuentos en BAB n° 2 + suplemento selectivo

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	3,35	3,20 ^c	3,40 ^c	2,36 ^c	3,00 ^c	2,90 ^d	2,65 ^c
N		3,12 ^c	3,32 ^{bc}	2,33 ^c	2,98 ^c	2,49 ^c	2,69 ^c
C		2,64 ^b	3,08 ^b	1,72 ^b	1,49 ^b	0,79 ^b	0,80 ^b
N + C		2,72 ^b	3,06 ^b	1,61 ^b	1,43 ^b	0,55 ^b	1,01 ^b
LP		1,13 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
LP + N		0,93 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
LP + C		0,85 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
LP + N + C		0,88 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

3.2.4.4. Efecto frente a *A. hydrophila*

Se observó el crecimiento de *A. hydrophila* a ambas temperaturas de refrigeración, alcanzando después de 12 d niveles de 5,75 y 8,55 log ufc/ml, a 4°C (Tabla 21) y 8°C (Tabla 23), respectivamente.

A 4°C, no se observaron diferencias significativas en los valores del patógeno entre la leche control y la tratada con nisina a lo largo de la refrigeración.

En la leche con citrato los recuentos del patógeno fueron 2,52 unidades logarítmicas inferiores respecto del control al final de la refrigeración, mientras que en la adicionada con nisina-citrato esta diferencia fue de 2,20 unidades logarítmicas.

En la leche con el sistema LP, de forma individual o en combinación, no se detectó el microorganismo patógeno a partir del quinto día y hasta el final del periodo de refrigeración. Al tercer día, las mayores reducciones de *A. hydrophila* se observaron con el sistema LP-nisina, que ejerció un efecto inhibitorio sinérgico, y con el tratamiento triple, con niveles 1,90 y 1,95 unidades logarítmicas inferiores a los de la leche control, respectivamente.

Santos *et al.* (1994) no detectaron en leche desnatada refrigerada a 6°C la presencia de tres cepas de *A. hydrophila* a partir de las 24 h y hasta los 25 d cuando el sistema LP fue activado. El efecto bactericida fue mucho más rápido en leche incubada a 28°C.

Tabla 21. Supervivencia de *A. hydrophila* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 4°C. Recuentos en TSA

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	3,70	3,76 ^c	3,54 ^c	3,46 ^{de}	3,64 ^{bc}	4,22 ^c	5,75 ^d
N		3,64 ^{bc}	3,55 ^c	3,51 ^e	3,69 ^c	4,21 ^c	5,69 ^d
C		3,57 ^{ab}	3,60 ^c	3,24 ^c	3,46 ^b	3,32 ^b	3,23 ^b
N + C		3,59 ^{abc}	3,60 ^c	3,28 ^{cd}	3,47 ^b	3,40 ^b	3,55 ^c
LP		3,58 ^{abc}	3,28 ^b	2,14 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a
LP + N		3,49 ^{ab}	3,09 ^a	1,56 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
LP + C		3,45 ^a	3,10 ^{ab}	1,97 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a
LP + N + C		3,49 ^{ab}	3,09 ^a	1,51 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

A los 7 d de refrigeración a 4°C, se observó un porcentaje de células de *A. hydrophila* con daños subletales del 35,4% en la leche control, que a los 12 d aumentó hasta el 84,9% (Tabla 22). Por otro lado, la leche tratada con el sistema LP o con sus combinaciones, presentó más de un 95% de células dañadas desde las 8 h hasta los 3 d de refrigeración. A partir de este momento, no se detectó *A. hydrophila* en la leche.

Tabla 22. Supervivencia de *A. hydrophila* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 4°C. Recuentos en VRBA

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	3,72	3,58 ^e	3,30 ^d	2,97 ^e	3,41 ^d	4,03 ^d	4,93 ^d
N		3,49 ^e	3,53 ^e	3,05 ^e	3,44 ^d	4,16 ^d	5,06 ^d
C		3,46 ^e	3,30 ^d	2,12 ^d	2,20 ^c	1,62 ^b	2,30 ^b
N + C		3,51 ^e	3,29 ^d	2,06 ^d	2,01 ^b	1,82 ^c	2,65 ^c
LP		2,20 ^d	1,10 ^c	0,24 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a
LP + N		1,48 ^c	0,93 ^{bc}	0,45 ^c	0 ^a	0 ^a	0 ^a
LP + C		0,75 ^a	0,51 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
LP + N + C		1,10 ^b	0,86 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

Después de 12 d de refrigeración a 8°C, no se observaron diferencias significativas en los niveles de *A. hydrophila* entre la leche con nisina y la leche control. Tampoco al aplicar el citrato individualmente o en combinación con nisina, aunque en estos casos se observó un efecto bacteriostático del tratamiento sobre el patógeno durante las primeras 24 h.

En la leche tratada con el sistema LP individualmente o en combinación, no se detectó *A. hydrophila* desde el tercer día hasta los 12 d de refrigeración. La combinación sistema LP-nisina actuó de forma sinérgica frente al patógeno a las 24 h.

En la leche control, el 43,8% de las células de *A. hydrophila* presentaron daños celulares al final de la refrigeración a 8°C (Tabla 24). No se observaron diferencias significativas en los recuentos en VRBA entre la leche control y la leche con nisina.

No se detectó *A. hydrophila* en VRBA en la leche adicionada con el sistema LP o sus combinaciones durante todo el periodo de refrigeración a 8°C.

Tabla 23. Supervivencia de *A. hydrophila* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 8°C. Recuentos en TSA

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	3,68	3,68 ^c	4,13 ^e	6,15 ^c	7,82 ^d	8,50 ^d	8,55 ^{bc}
N		3,60 ^c	4,00 ^e	6,13 ^c	7,94 ^d	8,31 ^c	8,68 ^c
C		3,54 ^c	3,56 ^d	4,32 ^b	5,80 ^c	7,62 ^b	8,51 ^b
N + C		3,57 ^c	3,61 ^d	4,20 ^b	5,50 ^b	7,66 ^b	8,59 ^{bc}
LP		2,65 ^b	1,90 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
LP + N		2,41 ^a	1,49 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
LP + C		2,54 ^{ab}	2,41 ^c	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
LP + N + C		2,51 ^{ab}	2,29 ^c	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

Tabla 24. Supervivencia de *A. hydrophila* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 8°C. Recuentos en VRBA

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	3,71	3,53 ^c	4,11 ^d	5,95 ^c	6,58 ^c	7,37 ^d	8,30 ^d
N		3,52 ^c	3,98 ^c	5,98 ^c	7,09 ^d	7,32 ^d	8,42 ^d
C		3,41 ^c	3,26 ^b	3,95 ^b	4,75 ^b	6,84 ^b	8,17 ^c
N + C		2,40 ^b	3,25 ^b	4,00 ^b	4,79 ^b	7,17 ^c	7,75 ^b
LP		0 ^a					
LP + N		0 ^a					
LP + C		0 ^a					
LP + N + C		0 ^a					

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

3.2.4.5. Efecto frente a *Y. enterocolitica*

Y. enterocolitica alcanzó unos niveles de 8,38 log ufc/ml a los 12 d de refrigeración a 4°C (Tabla 25). La nisina, el citrato o la combinación nisina-citrato apenas afectaron al comportamiento de *Y. enterocolitica* en leche refrigerada.

La máxima reducción en los niveles de *Y. enterocolitica* se alcanzó a los 7 d de refrigeración en la leche tratada con el sistema LP, con diferencias de 5,57 unidades logarítmicas respecto de la leche control. A los 12 d, se observó una leve recuperación del patógeno que dio lugar a unas diferencias finales de 4,68 unidades logarítmicas. La

combinación del sistema LP con citrato, nisina o con ambos no potenció el efecto inhibitorio del sistema LP.

Farrag *et al.* (1992b) observaron unas diferencias en los recuentos de *Y. enterocolitica* de 4,8 unidades logarítmicas en leche a 4°C con el sistema LP activado respecto de la leche control, en la que alcanzó valores de aproximadamente 10^8 ufc/ml después de 5 d de refrigeración. A 30°C la inhibición máxima del patógeno se produjo a las 12 h, aunque posteriormente reanudó el crecimiento y alcanzó valores ligeramente superiores a los del inóculo inicial a las 24 h de incubación.

Tabla 25. Supervivencia de *Y. enterocolitica* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 4°C. Recuentos en TSA

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	3,12	3,12 ^a	3,13 ^a	4,65 ^d	6,21 ^d	7,46 ^d	8,38 ^d
N		3,10 ^a	3,12 ^a	4,65 ^d	6,23 ^d	7,46 ^d	8,37 ^d
C		3,04 ^a	3,12 ^a	4,50 ^{cd}	6,00 ^c	7,19 ^c	8,47 ^d
N + C		3,06 ^a	3,10 ^a	4,43 ^c	6,00 ^c	7,13 ^c	8,38 ^d
LP		3,12 ^a	3,05 ^a	2,67 ^b	2,37 ^{ab}	1,89 ^a	3,70 ^a
LP + N		3,06 ^a	3,02 ^a	2,54 ^{ab}	2,37 ^{ab}	2,16 ^b	3,80 ^{ab}
LP + C		3,06 ^a	2,99 ^a	2,43 ^a	2,55 ^b	2,30 ^b	4,07 ^c
LP + N + C		3,06 ^a	3,00 ^a	2,41 ^a	2,24 ^a	2,23 ^b	3,91 ^{bc}

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

A 4°C, no se observó crecimiento de *Y. enterocolitica* en VRBA en la leche control y en la leche con nisina, citrato y la combinación nisina-citrato hasta los 5 d de refrigeración (Tabla 26). En la leche con el sistema LP, ya sea de forma individual o combinada, no se detectó *Y. enterocolitica* en VRBA hasta los 12 d a 4°C.

Al final de la refrigeración a 4°C, se observaron diferencias menores entre los recuentos celulares en VRBA y TSA en todos los casos. No obstante, en la leche con el sistema LP aplicado de forma individual o en combinación, el porcentaje de células con daños subletales fue menor al de la leche con los demás tratamientos.

Tabla 26. Supervivencia de *Y. enterocolitica* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 4°C. Recuentos en VRBA

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	0	0	0	0	3,14 ^d	5,71 ^c	6,59 ^h
N		0	0	0	3,14 ^d	5,72 ^c	6,48 ^f
C		0	0	0	3,00 ^b	5,56 ^b	6,52 ^g
N + C		0	0	0	3,05 ^c	5,53 ^b	6,43 ^e
LP		0	0	0	0 ^a	0 ^a	2,75 ^a
LP + N		0	0	0	0 ^a	0 ^a	2,91 ^b
LP + C		0	0	0	0 ^a	0 ^a	3,65 ^d
LP + N + C		0	0	0	0 ^a	0 ^a	3,44 ^c

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

En leche a 8°C *Y. enterocolitica* se desarrollo hasta niveles de 9,24 log ufc/ml a los 12 d (Tabla 27). Al igual que a 4°C, la adición a la leche de nisina, citrato o la combinación de ambos no afectó al desarrollo del microorganismo.

El sistema LP actuó de forma bacteriostática sobre *Y. enterocolitica* durante los tres primeros días de refrigeración a 8°C, con diferencias de 3,53 unidades logarítmicas respecto del control a los 3 d. Posteriormente, el patógeno reinició su crecimiento y alcanzó niveles de 8,88 log ufc/ml a los 12 d. La combinación con nisina, citrato o ambos no incrementó el efecto inhibitorio del sistema LP sobre *Y. enterocolítica*.

Tanto a 4°C como a 8°C, se observaron diferencias notables entre los recuentos de *Y. enterocolítica* en TSA y VRBA poniendo de manifiesto la sensibilización de las células de *Yersinia* sometidas a refrigeración a los agentes selectivos del VRBA.

A los 3 d a 8°C, la leche control presentó diferencias en los recuentos del patógeno entre los dos medios de cultivo de 3,87 unidades logarítmicas, mientras que en la leche con el sistema LP y sus combinaciones estas diferencias fueron inferiores a 1,45 unidades logarítmicas (Tabla 28). Este hecho podría atribuirse a la sensibilización de las células dañadas por el frío a la acción del sistema LP. En días posteriores, el porcentaje de células con daños subletales es muy similar con todos los tratamientos.

Entre los días 7 y 12, los recuentos en VRBA aumentaron una media de 2,28 unidades logarítmicas mientras que en TSA este aumento fue de 0,47 unidades logarítmicas, indicando una recuperación de las células dañadas por el frío al final del periodo de refrigeración a 8°C.

Tabla 27. Supervivencia de *Y. enterocolitica* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 8°C. Recuentos en TSA

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	4,25	4,46 ^c	5,76 ^c	8,05 ^c	8,69 ^b	8,74 ^c	9,24 ^b
N		4,50 ^c	5,83 ^c	8,12 ^c	8,69 ^b	8,76 ^c	9,21 ^b
C		4,21 ^b	5,40 ^b	8,05 ^c	8,68 ^b	8,74 ^c	9,21 ^b
N + C		4,23 ^b	5,47 ^b	8,06 ^c	8,65 ^b	8,74 ^c	9,25 ^b
LP		4,04 ^a	3,96 ^a	4,52 ^a	7,10 ^a	8,36 ^a	8,88 ^a
LP + N		4,08 ^a	3,96 ^a	4,56 ^{ab}	7,16 ^a	8,35 ^a	8,88 ^a
LP + C		4,08 ^a	3,97 ^a	4,63 ^b	7,17 ^a	8,47 ^b	8,89 ^a
LP + N + C		4,06 ^a	3,96 ^a	4,63 ^b	7,12 ^a	8,48 ^b	8,87 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

Tabla 28. Supervivencia de *Y. enterocolitica* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), citrato (C) y sistema LP (LP) a 8°C. Recuentos en VRBA

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	1,01	1,01 ^{bcd}	1,78 ^b	4,18 ^b	4,47 ^{ab}	4,10 ^{ab}	6,69 ^b
N		1,24 ^{cd}	1,84 ^b	4,33 ^b	4,54 ^b	4,16 ^{ab}	6,28 ^{ab}
C		1,49 ^d	2,05 ^b	4,71 ^b	4,80 ^b	4,54 ^b	6,33 ^{ab}
N + C		1,39 ^{cd}	2,62 ^c	4,80 ^b	4,89 ^b	4,60 ^b	6,10 ^a
LP		0,85 ^{abc}	0,70 ^a	3,20 ^a	3,97 ^a	3,61 ^a	6,46 ^{ab}
LP + N		1,27 ^{cd}	1,61 ^b	3,27 ^a	4,43 ^{ab}	3,71 ^a	6,54 ^{ab}
LP + C		0,58 ^{ab}	2,05 ^b	3,18 ^a	4,37 ^{ab}	4,22 ^b	6,54 ^{ab}
LP + N + C		0,35 ^a	1,90 ^b	3,40 ^a	4,62 ^b	4,40 ^b	6,65 ^{ab}

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

3.2.5. REUTERINA

Se ha estudiado el efecto inhibitorio de la reuterina, obtenida según se indica en el apartado 2.2.3, y añadida a una concentración de 8 UR/ml, frente a *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *Sal. choleraesuis*, *C. jejuni*, *A. hydrophila* y *Y. enterocolitica* en leche incubada en condiciones óptimas de crecimiento de cada patógeno, en distintos tiempos durante 24 h de incubación.

Los niveles de todos los patógenos estudiados resultaron significativamente influidos ($P < 0,001$) por la adición de reuterina a la leche (Tabla 29).

La reuterina actuó de forma bacteriostática frente a *L. monocytogenes* durante las primeras 8 h de incubación. A las 24 h, presentó valores en leche con reuterina 0,95 unidades logarítmicas superiores al recuento inicial.

Frente a *S. aureus* y *E. coli* O157:H7 la reuterina mostró un efecto bacteriostático durante las 8 primeras horas. A las 24 h, los niveles de *S. aureus* y *E. coli* fueron 0,16 y 0,69 unidades logarítmicas inferiores a los de la leche a las 0 h.

A las 24 h, la adición de reuterina a la leche dio lugar a una reducción en los niveles de *C. jejuni* de 2,48 unidades logarítmicas respecto del recuento inicial, mientras que *Sal. choleraesuis*, *A. hydrophila* y *Y. enterocolitica* no se detectaron.

Tabla 29. Supervivencia de bacterias patógenas (log ufc/ml) en leche con reuterina

Bacteria patógena		0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	24 h
<i>L. monocytogenes</i>	C	2,91 ^a	2,89 ^a	3,66 ^a	4,42 ^a	5,59 ^a	8,55 ^a
	R	2,86 ^a	2,82 ^a	2,77 ^b	2,75 ^b	2,84 ^b	3,81 ^b
<i>S. aureus</i>	C	3,00 ^a	3,09 ^a	4,69 ^a	6,00 ^a	7,09 ^a	8,79 ^a
	R	3,05 ^a	3,08 ^a	3,19 ^b	3,04 ^b	3,10 ^b	2,89 ^b
<i>E. coli</i>	C	3,16 ^a	3,73 ^a	5,58 ^a	7,13 ^a	8,14 ^a	8,75 ^a
	R	3,16 ^a	3,20 ^b	3,14 ^b	3,16 ^b	3,09 ^b	2,47 ^b
<i>S. choleraesuis</i>	C	2,61 ^a	2,55 ^a	3,70 ^a	4,46 ^a	5,88 ^a	8,68 ^a
	R	2,52 ^a	1,66 ^a	1,65 ^b	1,53 ^b	1,47 ^b	0 ^b
<i>C. jejuni</i>	C	3,51 ^a	3,23 ^a	-	-	3,03 ^a	6,72 ^a
	R	3,43 ^a	2,91 ^a	-	-	1,14 ^a	0,95 ^b
<i>A. hydrophila</i>	C	2,80 ^a	2,89 ^a	3,75 ^a	4,81 ^a	5,71 ^a	8,77 ^a
	R	2,84 ^a	2,69 ^a	2,47 ^b	2,54 ^b	2,41 ^b	0 ^b
<i>Y. enterocolitica</i>	C	2,60 ^a	2,82 ^a	3,44 ^a	4,12 ^a	4,62 ^a	7,63 ^a
	R	2,64 ^a	2,48 ^a	1,80 ^b	1,08 ^b	0,33 ^b	0 ^b

Medias de la misma columna y bacteria con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)
C = Control; R = Reuterina

De acuerdo con nuestros resultados, *L. monocytogenes* fue el microorganismo más resistente a la acción de la reuterina. En 1989, Axelsson *et al.*, ya observaron el potencial inhibitorio de la reuterina frente a algunos de estos patógenos y El Ziney *et al.* (1996) comprobaron que se requería una concentración mayor de reuterina para inhibir a *L. monocytogenes* que a *E. coli*, *S. aureus* y *Y. enterocolitica* en TSYB.

Por otra parte, se ha investigado la posible interferencia de la grasa de la leche en la capacidad inhibitoria de la reuterina utilizando *E. coli* O157:H7 como indicador. El efecto inhibitorio de la reuterina sobre *E. coli* en leche desnatada no fue significativamente diferente del obtenido en leche entera con un 3,6% de materia grasa (Tabla 30). El Ziney y Debevere (1998) observaron resultados similares con *L. monocytogenes* en leche con un 0,5% y 3% de materia grasa, y atribuyeron la falta de interacción entre grasa y reuterina a la gran solubilidad de la reuterina en la fase acuosa de la leche.

En cuanto a la influencia de otros factores en la actividad inhibitoria, Rasch (2002) investigó el efecto de la reuterina en el crecimiento de *E. coli* con distintas combinaciones de pH, sal y temperaturas de interés en alimentos. El efecto inhibitorio de la reuterina aumentaba al incrementar la temperatura, mientras que ni el pH ni la sal mostraron interacciones con el efecto de este antimicrobiano.

Tabla 30. Comportamiento de *E. coli* O157:H7 con reuterina en leche desnatada (0,04% materia grasa) y entera (3,6% materia grasa)

		Leche desnatada	Leche entera
t = 0	C	3,63 ^a	3,62 ^a
	R	3,69 ^a	3,66 ^a
t = 4 h	C	5,86 ^b	5,79 ^b
	R	3,66 ^a	3,53 ^a
t = 24 h	C	8,73 ^b	8,75 ^b
	R	2,96 ^a	2,88 ^a

Medias del mismo tiempo con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

C = Control; R = Reuterina

3.2.6. BACTERIOCINAS Y REUTERINA

Se ha investigado el efecto de la combinación de distintas bacteriocinas con reuterina sobre la supervivencia de bacterias patógenas Gram-positivas y Gram-negativas en leche incubada durante 24 h en las condiciones óptimas de los microorganismos ensayados.

3.2.6.1. Efecto frente a bacterias Gram-positivas

Los niveles de *L. monocytogenes* y *S. aureus* resultaron significativamente influidos ($P < 0,001$) por los tratamientos empleados y por el tiempo de incubación (Tabla 31).

L. monocytogenes alcanzó en leche control valores de 4,82 log ufc/ml y 9,04 log ufc/ml después de 4 y 24 h, respectivamente.

Tabla 31. Supervivencia de bacterias Gram-positivas (log ufc/ml) en leche con bacteriocinas y reuterina (R)

		<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
t = 0	Control	4,03	4,21
t = 4 h	Control	4,82 ^h	5,92 ^d
	Nisina	0,15 ^a	1,32 ^a
	TAB 7	1,98 ^c	6,02 ^d
	TAB 20	4,81 ^h	5,90 ^d
	Lacticina 481	3,22 ^e	5,88 ^d
	Enterocina I	4,40 ^g	5,88 ^d
	TAB 57	4,75 ^h	6,04 ^d
	Enterocina AS-48	2,00 ^c	5,97 ^d
	Reuterina	3,93 ^f	4,17 ^c
	R + nisina	0 ^a	3,68 ^b
	R + TAB 7	1,00 ^b	4,23 ^c
	R + TAB 20	3,99 ^f	4,24 ^c
	R + lacticina 481	0,15 ^a	4,15 ^c
	R + enterocina I	2,70 ^d	4,22 ^c
	R + TAB 57	4,00 ^f	4,24 ^c
	R + AS-48	0,24 ^a	4,18 ^c
t = 24 h	Control	9,04 ^j	8,85 ^e
	Nisina	7,45 ^f	8,39 ^d
	TAB 7	8,78 ^{hi}	9,03 ^{ef}
	TAB 20	8,97 ^{ij}	9,07 ^f
	Lacticina 481	5,99 ^e	9,07 ^f
	Enterocina I	8,61 ^h	9,11 ^f
	TAB 57	8,18 ^g	9,19 ^f
	Enterocina AS-48	7,28 ^f	9,09 ^f
	Reuterina	4,45 ^d	3,40 ^b
	R + nisina	0 ^a	2,34 ^a
	R + TAB 7	0,54 ^b	3,57 ^{bc}
	R + TAB 20	4,10 ^c	3,54 ^{bc}
	R + lacticina 481	0 ^a	3,40 ^b
	R + enterocina I	4,68 ^d	3,59 ^c
	R + TAB 57	3,90 ^c	3,64 ^c
	R + AS-48	0 ^a	3,41 ^b

Medias de la misma columna y tiempo con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

A las 4 h, se observaron en la leche con nisina, bacteriocina TAB 7, lacticina 481 y enterocina AS-48, recuentos 4,67, 2,84, 1,60 y 2,82 unidades logarítmicas inferiores, respectivamente, a los detectados en la leche control. Posteriormente, *L. monocytogenes* reanudó el crecimiento y alcanzó a las 24 h niveles comprendidos entre 5,99 y 8,97 log ufc/ml en función de la bacteriocina adicionada, apuntando a la aparición de células resistentes. Por otro lado, la reuterina actuó de forma bacteriostática frente a *L. monocytogenes* durante las primeras 4 h, mientras que a las 24 h se observó un incremento en los niveles de patógeno de 0,42 unidades logarítmicas respecto del inóculo inicial.

No se detectó *L. monocytogenes* en leche con reuterina en combinación con nisina, lacticina 481 o enterocina AS-48, comprobándose, un efecto bactericida sinérgico frente a *L. monocytogenes*. La bacteriocina TAB 7 también mostró un efecto sinérgico al ser combinada con reuterina, con recuentos en leche con esta combinación 8,50 unidades logarítmicas inferiores a los de la leche control, después de 24 h.

S. aureus presentó, en la leche control, unos recuentos 5,92 log ufc/ml a las 4 h y de 8,85 log ufc/ml a las 24 h de incubación a 37°C (Tabla 31).

Como habíamos observado anteriormente, la única bacteriocina efectiva en leche frente a *S. aureus* fue la nisina, que actuó de forma bactericida en las primeras 4 h, con valores 4,60 unidades logarítmicas inferiores a los de la leche control. *S. aureus* reanudó el crecimiento y alcanzó, al finalizar la incubación, niveles de 8,39 log ufc/ml. La reuterina mostró un efecto bacteriostático durante las primeras 4 h, y ligeramente bactericida a las 24 h, reduciendo los niveles iniciales de *S. aureus* en 0,81 unidades logarítmicas.

A las 24 h de incubación, la mayor inhibición de *S. aureus* se produjo en la leche con la combinación reuterina-nisina. Estos compuestos actuaron de forma sinérgica dando lugar a unos niveles de patógeno 6,51 unidades logarítmicas inferiores a los observados en la leche control.

La combinación de reuterina con nisina actuó, por tanto, de forma efectiva en el control de los dos patógenos Gram-positivos. Sin embargo, las combinaciones de reuterina con lacticina 481, enterocina AS-48 y bacteriocina TAB 7 únicamente resultaron efectivas frente a *L. monocytogenes*.

3.2.6.2. Efecto frente a bacterias Gram-negativas

Los niveles de las bacterias Gram-negativas ensayadas resultaron significativamente influidos ($P < 0,001$) por los tratamientos aplicados a la leche y el tiempo de incubación (Tabla 32).

Tabla 32. Supervivencia de bacterias Gram-negativas (log ufc/ml) en leche con bacteriocinas y reuterina (R)

		<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> <i>choleraesuis</i>	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i>	<i>Aeromonas</i> <i>hydrophila</i>	<i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i>
t = 0	Control	4,13	3,64	4,07	4,02	3,52
t = 4 h	Control	7,15 ^b	5,36 ^b	4,07 ^b	5,87 ^{cd}	5,09 ^b
	Nisina	7,16 ^b	5,28 ^{bc}	4,04 ^b	5,86 ^c	5,13 ^b
	TAB 7	7,13 ^b	5,19 ^b	4,00 ^b	5,98 ^{cd}	5,14 ^b
	TAB 20	7,13 ^b	5,47 ^c	4,03 ^b	5,92 ^{cd}	5,14 ^b
	Lacticina 481	7,15 ^b	5,40 ^b	4,00 ^b	5,98 ^{cd}	5,12 ^b
	Enterocina I	7,21 ^b	5,45 ^c	4,08 ^b	5,99 ^{cd}	5,13 ^b
	TAB 57	7,16 ^b	5,48 ^c	4,11 ^b	6,02 ^{cd}	5,12 ^b
	Enterocina AS-48	7,15 ^b	5,50 ^c	4,07 ^b	6,06 ^d	5,09 ^b
	Reuterina	3,95 ^a	3,15 ^a	0 ^a	3,35 ^a	3,49 ^a
	R + nisina	3,93 ^a	3,21 ^a	0 ^a	3,32 ^a	3,46 ^a
	R + TAB 7	3,96 ^a	3,20 ^a	0 ^a	4,21 ^b	3,52 ^a
	R + TAB 20	3,97 ^a	3,19 ^a	0 ^a	3,45 ^a	3,58 ^a
	R + lacticina 481	3,95 ^a	3,22 ^a	0 ^a	3,39 ^a	3,48 ^a
	R + enterocina I	4,01 ^a	3,23 ^a	0 ^a	3,51 ^a	3,53 ^a
	R + TAB 57	3,97 ^a	3,18 ^a	0 ^a	3,34 ^a	3,79 ^a
	R + AS-48	4,03 ^a	3,14 ^a	0 ^a	3,51 ^a	3,47 ^a
t = 24 h	Control	8,98 ^d	8,94 ^{de}	6,61 ^{cd}	9,05 ^b	8,60 ^e
	Nisina	8,94 ^d	8,83 ^d	6,60 ^{cd}	8,96 ^b	8,63 ^e
	TAB 7	8,96 ^d	8,99 ^{de}	6,55 ^c	9,05 ^b	8,65 ^e
	TAB 20	8,96 ^d	8,99 ^{de}	6,63 ^{cd}	9,05 ^b	8,49 ^e
	Lacticina 481	8,95 ^d	8,95 ^{de}	6,61 ^{cd}	9,02 ^b	8,49 ^e
	Enterocina I	8,92 ^d	9,11 ^e	6,67 ^{cd}	9,05 ^b	8,51 ^e
	TAB 57	8,92 ^d	9,08 ^e	6,73 ^d	9,03 ^b	8,59 ^e
	Enterocina AS-48	8,92 ^d	9,02 ^d	6,17 ^b	9,06 ^b	8,54 ^e
	Reuterina	3,14 ^{bc}	2,10 ^{ab}	0 ^a	0 ^a	1,86 ^b
	R + nisina	2,95 ^{ab}	2,41 ^c	0 ^a	0 ^a	1,82 ^{ab}
	R + TAB 7	3,01 ^{abc}	2,42 ^c	0 ^a	0 ^a	1,64 ^{ab}
	R + TAB 20	3,19 ^c	2,26 ^{bc}	0 ^a	0 ^a	2,36 ^c
	R + lacticina 481	2,89 ^a	1,97 ^a	0 ^a	0 ^a	1,38 ^a
	R + enterocina I	3,00 ^{abc}	2,12 ^{ab}	0 ^a	0 ^a	2,00 ^{bc}
	R + TAB 57	3,21 ^c	2,32 ^{bc}	0 ^a	0 ^a	3,03 ^d
	R + AS-48	3,00 ^{abc}	1,92 ^a	0 ^a	0 ^a	1,63 ^{ab}

Medias de la misma columna y tiempo con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,001$)

El crecimiento en leche de *E. coli* O157:H7, *Sal. choleraesuis*, *C. jejuni*, *Y. enterocolitica* y *A. hydrophila* no se vio afectado por ninguna de las bacteriocinas en las condiciones estudiadas, como habíamos observado previamente.

En presencia de reuterina no se detectaron *C. jejuni* ni *A. hydrophila* a las 4 h y 24 h de incubación, respectivamente. A las 24 h, *Sal. choleraesuis* y *Y. enterocolitica* mostraron valores 1,54 y 1,66 unidades logarítmicas inferiores a los iniciales. *E. coli* fue el patógeno Gram-negativo menos sensible a la reuterina. No obstante, sus niveles a las 24 h fueron 0,99 unidades logarítmicas inferiores a los inoculados inicialmente en la leche.

La combinación de reuterina con las distintas bacteriocinas no incrementó el efecto bactericida de la reuterina frente a ninguno de los patógenos Gram-negativos estudiados.

3.2.6.3. Aplicación en diferido de nisina y reuterina

Se ha estudiado el efecto de la reuterina adicionada en diferentes tiempos a leche con nisina sobre la supervivencia *S. aureus* a 37°C durante 24 h, con el fin de incrementar el efecto inhibitorio del tratamiento combinado observado en la experiencia anterior.

Los niveles de *S. aureus* resultaron significativamente influidos ($P < 0,001$) por los tratamientos aplicados y el tiempo de incubación (Tabla 33).

La adición de nisina a la leche dio lugar a diferencias de 4,84 unidades logarítmicas respecto de la leche control a las 6 h. A continuación, el patógeno reanudó el crecimiento hasta alcanzar al final del periodo estudiado niveles similares a los de la leche control. La leche con reuterina mostró un efecto bacteriostático sobre *S. aureus* durante las primeras 8 h, mientras que a las 24 h se observaron niveles 0,86 unidades logarítmicas inferiores a los del inóculo inicial.

A las 24 h, la combinación de nisina con reuterina redujo significativamente ($P < 0,01$) y de forma sinérgica los niveles de *S. aureus*, obteniéndose diferencias de 6,14 unidades logarítmicas respecto de la leche control. La adición retardada de reuterina a las 4 y 6 h incrementó este efecto bactericida, observándose diferencias de 7,92 y 7,58 unidades logarítmicas, respecto de la leche control a las 24 h. La adición de reuterina a las 8 h de la adición de la nisina resultó también más efectiva que la aplicación simultánea de ambos inhibidores aunque las células de *S. aureus* resistentes a nisina ya hubieran iniciado su desarrollo, y dio lugar a diferencias de 6,87 unidades logarítmicas respecto de la leche control a las 24 h.

La adición retardada de reuterina permitiría que la nisina ejerciera su máxima acción inhibitoria. Posteriormente, las células supervivientes resultarían afectadas por la acción de la reuterina, evitándose así la recuperación de las resistentes a la nisina.

Tabla 33. Supervivencia de *S. aureus* (log ufc/ml) en leche con nisina (N) y reuterina (R) añadida a distintos tiempos

	0 h	4 h	6 h	8 h	24 h
Control	3,87	5,22 ^c	6,52 ^c	7,59 ^e	8,54 ^e
N		1,87 ^a	1,68 ^a	2,13 ^b	8,31 ^e
R		3,80 ^b	3,76 ^b	3,77 ^d	3,01 ^d
N (0) + R (0)		3,72 ^b	3,60 ^b	3,21 ^c	2,40 ^c
N (0) + R (4)		1,87 ^a	1,86 ^a	1,63 ^a	0,62 ^a
N (0) + R (6)		1,87 ^a	1,68 ^a	1,36 ^a	0,96 ^a
N (0) + R (8)		1,87 ^a	1,68 ^a	2,13 ^b	1,67 ^b

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

3.2.7. NISINA, REUTERINA Y SISTEMA LP EN REFRIGERACIÓN

Se ha estudiado el efecto de las combinaciones de reuterina con nisina y sistema LP en leche refrigerada, frente a microorganismos patógenos Gram-positivos y Gram-negativos.

3.2.7.1. Efecto frente a bacterias Gram-positivas

Los niveles de *L. monocytogenes* y *S. aureus* resultaron significativamente influidos ($P < 0,001$) por los tratamientos empleados y el tiempo de refrigeración, tanto a 4°C como a 8°C.

La leche se inoculó con aproximadamente 4 log ufc/ml de *L. monocytogenes*, alcanzándose a los 12 d valores de 6,63 log ufc/ml a 4°C (Tabla 34) y 8,42 log ufc/ml a 8°C (Tabla 35).

Después de 12 d a 4°C, los valores de *L. monocytogenes* en leche con nisina resultaron 3,45 unidades logarítmicas inferiores a los de la leche control. La reuterina actuó de forma bacteriostática hasta los 7 d y ligeramente bactericida a los 12 d, dando lugar a un descenso de 0,54 unidades logarítmicas respecto de los niveles iniciales. La leche con el sistema LP mostró niveles del patógeno 0,49 unidades logarítmicas superiores a los del inóculo inicial.

La combinación reuterina-nisina mostró un efecto inhibitorio sinérgico frente a *L. monocytogenes*, y no se detectó a los 12 d. Esta combinación también había mostrado un efecto inhibitorio sinérgico frente a este microorganismo a 37°C (apartado 3.7.1). Sin embargo, la combinación de la reuterina con el sistema LP no incrementó el efecto inhibitorio de la reuterina.

Tabla 34. Supervivencia de *L. monocytogenes* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 4°C

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	4,21	4,15 ^c	4,25 ^d	4,26 ^d	4,47 ^e	5,07 ^d	6,63 ^e
N		2,95 ^b	2,31 ^a	1,66 ^a	1,70 ^b	2,20 ^b	3,18 ^b
R		4,13 ^c	4,17 ^{cd}	4,22 ^d	4,29 ^d	4,17 ^c	3,67 ^c
LP		4,09 ^c	4,09 ^c	4,05 ^c	4,12 ^c	4,06 ^c	4,58 ^d
R + N		2,76 ^a	2,82 ^b	1,81 ^b	1,00 ^a	0,70 ^a	0 ^a
LP + R		4,10 ^c	4,08 ^c	4,07 ^c	4,09 ^c	4,04 ^c	3,76 ^c

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

A 8°C, la nisina produjo un efecto bactericida sobre *L. monocytogenes* durante las primeras 24 h. Seguidamente se reinició el crecimiento hasta alcanzar 6,86 log ufc/ml a los 12 d. La reuterina actuó como bacteriostático, y dio lugar a diferencias en los niveles del patógeno de 4,14 unidades logarítmicas respecto a la leche control, al final del periodo de refrigeración estudiado. En leche con el sistema LP, se observó un efecto bacteriostático frente al patógeno hasta el tercer día, aunque después de 12 d alcanzó valores de 7,79 log ufc/ml.

Tabla 35. Supervivencia de *L. monocytogenes* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 8°C

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	4,25	4,19 ^c	4,22 ^d	5,36 ^e	6,59 ^e	7,99 ^f	8,42 ^f
N		2,58 ^b	1,35 ^b	2,23 ^b	3,54 ^b	4,98 ^d	6,86 ^d
R		4,19 ^c	4,19 ^d	3,55 ^c	4,55 ^d	4,46 ^c	4,28 ^c
LP		4,12 ^c	4,03 ^c	4,11 ^d	4,61 ^d	5,80 ^e	7,79 ^e
R + N		2,30 ^a	0,51 ^a	0,71 ^a	0,50 ^a	0,30 ^a	0 ^a
LP + R		4,11 ^c	4,03 ^c	4,04 ^d	4,03 ^c	4,00 ^b	3,40 ^b

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

El-Ziney y Debevere (1998) observaron la eliminación total de *L. monocytogenes* en leche inoculada con 4,8 unidades logarítmicas por ml después de 5 d a 7°C, tras la aplicación de altas concentraciones de reuterina. En carne picada de cerdo en las mismas condiciones, los niveles del patógeno se redujeron 1,3 unidades logarítmicas después de 7 d (El-Ziney *et al.*, 1999).

La combinación reuterina-nisina, al igual que a 4°C y 37°C, mostró un efecto sinérgico. *L. monocytogenes* no se detectó en leche con reuterina-nisina después de 12 d a 8°C.

Con el sistema LP en combinación con reuterina aumentó el efecto inhibitorio, provocando un descenso de 0,85 unidades logarítmicas en los niveles iniciales del patógeno después de 12 d de almacenamiento.

No se observó desarrollo de *S. aureus* en leche durante los 12 d de refrigeración a 4°C (Tabla 36) y 8°C (Tabla 37).

La nisina actuó de forma bactericida y a los 12 d redujo el nivel inicial de *S. aureus* 1,22 y 0,62 unidades logarítmicas a 4°C y 8°C, respectivamente. A los 12 d, la reuterina dio lugar a un notable efecto bactericida sobre *S. aureus* en la leche, que produjo una reducción en los niveles iniciales del patógeno de 3,58 y 3,84 unidades logarítmicas a 4°C y 8°C, respectivamente. El sistema LP también presentó un efecto ligeramente bactericida frente al patógeno reduciendo los niveles iniciales en 0,69 y 0,73 unidades logarítmicas a 4°C y 8°C, respectivamente.

A ambas temperaturas se comprobó una mayor supervivencia de *S. aureus* con el tratamiento sistema LP-reuterina que con reuterina aplicada individualmente. Con la combinación reuterina-nisina se incrementó el efecto inhibitorio, obteniéndose a los 12 d niveles de 0,15 log ufc/ml a 4°C, mientras que no se detectó *S. aureus* a 8°C.

Tabla 36. Supervivencia de *S. aureus* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 4°C

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	4,01	3,82 ^a	3,93 ^a	4,00 ^b	4,01 ^e	3,87 ^e	3,85 ^f
N		3,93 ^a	3,89 ^a	3,84 ^{ab}	3,70 ^d	3,49 ^d	2,79 ^d
R		3,89 ^a	3,95 ^a	3,71 ^a	2,99 ^b	2,05 ^b	0,43 ^b
LP		3,80 ^a	3,87 ^a	3,83 ^{ab}	3,76 ^d	3,52 ^d	3,32 ^e
R + N		3,91 ^a	3,90 ^a	3,64 ^a	2,73 ^a	1,57 ^a	0,15 ^a
LP + R		3,84 ^a	3,88 ^a	3,78 ^a	3,27 ^c	2,89 ^c	1,31 ^e

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

Tabla 37. Supervivencia de *S. aureus* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 8°C

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	4,08	4,03 ^a	4,08 ^b	4,10 ^d	4,10 ^d	4,07 ^e	4,13 ^e
N		3,98 ^a	3,88 ^a	3,83 ^b	3,72 ^{cd}	3,54 ^d	3,46 ^d
R		3,97 ^a	3,99 ^{ab}	3,78 ^b	3,35 ^b	2,68 ^b	0,24 ^b
LP		3,91 ^a	3,99 ^{ab}	4,00 ^{cd}	3,87 ^d	3,62 ^d	3,35 ^d
R + N		4,04 ^a	3,91 ^a	3,54 ^a	2,79 ^a	1,99 ^a	0 ^a
LP + R		3,95 ^a	3,94 ^{ab}	3,92 ^{bc}	3,68 ^c	2,91 ^c	1,41 ^c

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

La adición de nisina y reuterina a la leche permitió un control más efectivo de los patógenos Gram-positivos *L. monocytogenes* y *S. aureus* a 4°C y 8°C, durante el tiempo de refrigeración estudiado.

3.2.7.2. Efecto frente a bacterias Gram-negativas

Los niveles de *E. coli* O157:H7, *Sal. choleraesuis*, *C. jejuni*, *A. hydrophila* y *Y. enterocolitica* resultaron significativamente influidos ($P < 0,001$) por los tratamientos aplicados y el tiempo de refrigeración, tanto a 4°C como a 8°C.

E. coli presentó niveles en leche de 3,48 log ufc/ml después de 12 días a 4°C (Tabla 38). En la leche con nisina se observaron diferencias de 0,32 unidades logarítmicas respecto de la leche control, mientras que con el sistema LP o reuterina no se detectaron diferencias significativas.

Tabla 38. Supervivencia de *E. coli* O157:H7 (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 4°C

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	4,24	4,05 ^a	3,95 ^{ab}	3,79 ^b	4,09 ^c	3,75 ^c	3,48 ^c
N		4,08 ^a	3,90 ^a	3,54 ^a	3,57 ^b	3,46 ^b	3,16 ^b
R		4,13 ^a	4,16 ^b	3,96 ^{bc}	3,89 ^c	3,98 ^d	3,46 ^c
LP		4,17 ^a	4,17 ^b	4,05 ^c	3,99 ^c	3,94 ^{cd}	3,51 ^c
R + N		4,18 ^a	4,10 ^{ab}	4,00 ^{bc}	3,93 ^c	3,94 ^{cd}	3,48 ^c
LP + R		4,13 ^a	4,09 ^{ab}	3,95 ^{bc}	3,28 ^a	2,66 ^a	0,94 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

La combinación sistema LP-reuterina actuó de forma sinérgica frente a *E. coli*, observándose una reducción en los niveles del patógeno hasta valores inferiores a 10

ufc/ml al final de la refrigeración, mientras que la combinación reuterina-nisina no afectó a los recuentos del patógeno.

A 8°C, *E. coli* se desarrolló en la leche control hasta niveles de 6,27 log ufc/ml después de 12 d (Tabla 39). La nisina no mostró inhibición a esta temperatura. Sin embargo, la aplicación de reuterina o del sistema LP dio lugar a diferencias en los niveles del patógeno respecto del control de 3,15 y 2,30 unidades logarítmicas, respectivamente, después de 12 d.

Los resultados obtenidos por El-Ziney *et al.* (1999) en carne picada de cerdo refrigerada a 7°C y tratada con altas concentraciones de reuterina, mostraron un fuerte descenso de *E. coli* O157:H7 desde las 24 h de refrigeración. No se han publicado datos sobre el efecto de la reuterina en leche frente a patógenos Gram-negativos.

La adición de nisina a la leche no incrementó el efecto inhibitorio de la reuterina frente a *E. coli* O157:H7. La combinación sistema LP-reuterina actuó de forma sinérgica y redujo los niveles de *E. coli* O157:H7 por debajo del límite de detección después de 12 d a 8°C.

Tabla 39. Supervivencia de *E. coli* O157:H7 (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 8°C

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	4,27	4,14 ^a	4,10 ^b	4,39 ^c	4,83 ^c	5,28 ^d	6,27 ^d
N		4,12 ^a	3,95 ^a	4,33 ^c	4,87 ^c	5,32 ^d	6,22 ^d
R		4,20 ^a	4,06 ^{ab}	4,03 ^b	3,95 ^b	3,80 ^b	3,12 ^b
LP		4,15 ^a	4,07 ^{ab}	4,01 ^b	3,99 ^b	3,94 ^c	3,97 ^c
R + N		4,15 ^a	4,07 ^{ab}	4,00 ^{ab}	3,93 ^b	3,80 ^b	3,28 ^b
LP + R		4,19 ^a	4,08 ^{ab}	3,87 ^a	2,98 ^a	1,33 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

Como observamos anteriormente, *Sal. choleraesuis* no fue capaz de desarrollarse a ninguna de las temperaturas ensayadas, presentando unos niveles al finalizar el periodo de refrigeración de 2,99 y 3,24 log ufc/ml a 4°C (Tabla 40) y 8°C (Tabla 41), respectivamente.

A los 12 d, la leche con nisina mostró unas diferencias en los niveles de *Sal. choleraesuis* inferiores a 0,4 unidades logarítmicas respecto de la leche control, a ambas temperaturas. Sin embargo, en la leche con reuterina, se observaron mayores diferencias, con valores 1,09 y 0,75 unidades logarítmicas inferiores a los de la leche control a 8°C y a 4°C, respectivamente. El sistema LP fue el tratamiento individual más efectivo frente a *Sal. choleraesuis*, tanto a 4°C como a 8°C, dando lugar a los 12 d a

diferencias en los niveles del patógeno de 1,67 y 1,34 unidades logarítmicas respectivamente, comparadas con los niveles en leche control, de acuerdo con nuestros resultados anteriores.

Tabla 40. Supervivencia de *Sal. choleraesuis* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 4°C

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	3,94	3,89 ^c	3,62 ^c	3,59 ^c	3,46 ^d	3,22 ^d	2,99 ^f
N		3,89 ^c	3,60 ^c	3,31 ^b	3,18 ^c	2,91 ^c	2,65 ^e
R		3,52 ^b	3,47 ^c	3,37 ^b	3,19 ^c	2,86 ^c	2,24 ^d
LP		3,14 ^a	3,01 ^b	2,70 ^a	2,51 ^b	2,26 ^b	1,32 ^b
R + N		3,56 ^b	3,45 ^c	3,27 ^b	3,01 ^c	2,83 ^c	1,90 ^c
LP + R		3,08 ^a	2,77 ^a	2,58 ^a	2,02 ^a	0,66 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

El tratamiento combinado reuterina-nisina redujo 0,34 y 0,13 unidades logarítmicas los niveles de *Sal. choleraesuis* de la leche a 4°C y 8°C, respectivamente, con respecto a la aplicación individual de reuterina. La combinación sistema LP-reuterina actuó de forma sinérgica, y no se detectó *Sal. choleraesuis* en la leche con dicho tratamiento a los 12 d y 7 d a 4°C y 8°C, respectivamente, de acuerdo con nuestros resultados anteriores.

Tabla 41. Supervivencia de *Sal. choleraesuis* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 8°C

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	3,92	3,79 ^d	3,70 ^d	3,48 ^d	3,29 ^d	3,47 ^e	3,24 ^f
N		3,83 ^d	3,58 ^c	3,34 ^c	3,07 ^c	3,14 ^d	2,86 ^e
R		3,61 ^c	3,60 ^{cd}	3,52 ^d	3,10 ^c	2,80 ^c	2,15 ^d
LP		3,19 ^b	2,95 ^b	2,71 ^b	2,56 ^b	2,32 ^b	1,90 ^b
R + N		3,61 ^c	3,60 ^{cd}	3,47 ^d	2,63 ^b	2,73 ^c	2,02 ^c
LP + R		2,97 ^a	2,68 ^a	2,39 ^a	1,30 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

Los recuentos de *C. jejuni* a las 0 h en la leche refrigerada a 4°C fueron de 5,65 log ufc/ml y después de 12 d descendieron 0,65 unidades logarítmicas en la leche control (Tabla 42).

La leche con nisina no presentó diferencias significativas ($P < 0,01$) en los niveles de *C. jejuni* respecto de la leche control a lo largo de la refrigeración, a ninguna de las dos temperaturas ensayadas. Sin embargo, tanto la adición de reuterina como del sistema LP a la leche inhibieron a este microorganismo, que no se detectó desde los 7 d y 3 d, respectivamente.

La combinación reuterina-nisina actuó de manera similar frente a *C. jejuni*, no pudiéndose detectar el microorganismo patógeno desde el séptimo día. El tratamiento combinado sistema LP-reuterina fue el más efectivo, ya que no se detectó *C. jejuni* desde el tercer día hasta el final del periodo de refrigeración a 4°C.

Tabla 42. Supervivencia de *C. jejuni* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 4°C

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	5,65	5,07 ^e	5,20 ^d	5,36 ^d	5,23 ^c	5,19 ^b	5,00 ^c
N		5,01 ^e	5,23 ^d	5,36 ^d	5,24 ^c	5,15 ^b	4,92 ^b
R		4,99 ^d	5,10 ^c	4,11 ^c	0,30 ^b	0 ^a	0 ^a
LP		3,93 ^b	1,80 ^b	0,90 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a
R + N		4,84 ^c	5,11 ^c	4,08 ^c	0,35 ^b	0 ^a	0 ^a
LP + R		3,67 ^a	1,55 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

C. jejuni, con un recuento inicial en leche refrigerada a 8°C de 5,67 log ufc/ml, tampoco se desarrolló durante el periodo de refrigeración (Tabla 43). La aplicación individual de reuterina o el sistema LP a la leche, redujo los niveles del microorganismo que no se detectó desde los 5 d y las 24 h, respectivamente, y hasta el final del periodo estudiado.

A 8°C, el tratamiento combinado reuterina-nisina no incrementó el efecto inhibitorio de la reuterina. En leche con la combinación sistema LP-reuterina, se comprobó, a las 8 h, una reducción del patógeno 0,34 unidades logarítmicas superior a la observada con el sistema LP. A partir de las 24 h, ambos tratamientos mantuvieron los niveles de *C. jejuni* por debajo del límite de detección hasta los 12 d.

Tabla 43. Supervivencia de *C. jejuni* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 8°C

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	5,67	5,04 ^c	5,15 ^c	5,22 ^c	5,09 ^c	4,74 ^b	3,99 ^b
N		5,02 ^c	5,15 ^c	5,25 ^c	5,06 ^c	4,82 ^b	4,04 ^b
R		5,03 ^c	4,80 ^b	1,28 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a
LP		1,88 ^b	0 ^a				
R + N		5,03 ^c	4,79 ^b	1,16 ^b	0,24 ^b	0 ^a	0 ^a
LP + R		1,54 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

A. hydrophila alcanzó niveles de 6,66 log ufc/ml en la leche a 4°C tras 12 d (Tabla 44) y de 8,58 log ufc/ml a 8°C (Tabla 45).

La nisina no mostró ningún efecto inhibitorio frente a *A. hydrophila* a las dos temperaturas estudiadas, mientras que el sistema LP dio lugar a reducciones de 6,51 y 8,58 unidades logarítmicas después de 12 d a 4°C y 8°C, respectivamente, como se había comprobado en los ensayos anteriores.

A 4°C, la leche con reuterina y la leche con la combinación reuterina-nisina, presentaron niveles del patógeno similares durante todo el periodo de refrigeración, y que fueron en ambos casos, inferiores al límite de detección a los 12 d. La leche con la combinación sistema LP-reuterina presentó un efecto inhibitorio sinérgico frente al patógeno a las 24 h y a los 3 d, con niveles de *A. hydrophila* por debajo del límite de detección desde los 3 d y hasta el final de la refrigeración.

Tabla 44. Supervivencia de *A. hydrophila* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 4°C

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	3,90	3,81 ^b	3,78 ^d	4,22 ^d	5,15 ^d	5,69 ^c	6,66 ^b
N		3,79 ^b	3,80 ^d	4,17 ^d	5,16 ^d	5,82 ^c	6,97 ^c
R		3,82 ^b	3,48 ^c	3,26 ^c	2,41 ^c	0,24 ^b	0 ^a
LP		3,07 ^a	2,48 ^b	1,17 ^b	0 ^a	0 ^a	0,15 ^a
R + N		3,77 ^b	3,41 ^c	3,29 ^c	2,21 ^b	0,24 ^b	0 ^a
LP + R		2,92 ^a	1,69 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

Después de 12 d a 8°C, no se detectó la presencia de *A. hydrophila* en la leche con reuterina aplicada individualmente o en combinación con nisina, de forma similar a lo observado a 4°C. El sistema LP dio lugar a mayores reducciones del patógeno a 8°C que a 4°C a las 24 h y a los 3 d, y prácticamente no se detectó a partir de los 5 d.

Al igual que a 4°C, la combinación sistema LP-reuterina fue el tratamiento más efectivo, ya que no se detectó *A. hydrophila* desde las 24 h hasta el final del periodo en estudio.

Tabla 45. Supervivencia de *A. hydrophila* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 8°C

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	3,84	3,89 ^d	4,60 ^d	6,34 ^d	7,06 ^d	8,17 ^c	8,58 ^b
N		3,85 ^d	4,53 ^d	6,33 ^d	7,18 ^d	8,13 ^c	8,58 ^b
R		3,59 ^c	3,42 ^c	3,31 ^c	2,19 ^c	0,15 ^b	0 ^a
LP		3,31 ^b	1,66 ^b	0,24 ^b	0,15 ^b	0 ^a	0 ^a
R + N		3,79 ^d	3,38 ^c	3,36 ^c	2,15 ^c	0 ^a	0 ^a
LP + R		2,22 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

Y. enterocolitica se desarrolló en leche a ambas temperaturas y alcanzó a los 12 d niveles de 8,56 log ufc/ml a 4°C (Tabla 46) y de 9,38 log ufc/ml a 8°C (Tabla 47), como habíamos observado previamente.

De acuerdo con los resultados anteriores, la nisina no inhibió a *Y. enterocolitica* a ninguna de las dos temperaturas ensayadas.

La aplicación de reuterina a la leche dio lugar a diferencias de 5,57 y 6,70 unidades logarítmicas en la leche con reuterina refrigerada a 4°C y 8°C, respectivamente, respecto de la leche control. La nisina no aumentó el efecto inhibitorio.

A 4°C, el sistema LP retrasó el crecimiento del patógeno, alcanzando a los 12 d niveles de 4,70 log ufc/ml. La combinación con reuterina aumentó considerablemente la inhibición, no detectándose *Y. enterocolitica* desde el día 7.

Tabla 46. Supervivencia de *Y. enterocolitica* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 4°C

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	3,58	3,52 ^c	3,74 ^c	5,11 ^c	6,59 ^c	7,23 ^c	8,56 ^d
N		3,58 ^c	3,73 ^c	5,06 ^c	6,60 ^c	7,14 ^c	8,53 ^d
R		3,40 ^{ab}	3,30 ^{ab}	3,32 ^b	3,25 ^b	3,24 ^b	2,99 ^b
LP		3,47 ^{abc}	3,37 ^b	3,26 ^{ab}	3,25 ^b	3,22 ^b	4,70 ^c
R + N		3,54 ^{bc}	3,30 ^{ab}	3,32 ^b	3,22 ^b	3,20 ^b	3,00 ^b
LP + R		3,34 ^a	3,17 ^a	3,13 ^a	2,26 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

A 8°C se comprobó el efecto bacteriostático del sistema LP durante tres días, tras los que *Y. enterocolitica* reinició el crecimiento alcanzando valores de 8,59 log ufc/ml a los 12 d. La combinación sistema LP-reuterina mostró un efecto inhibitorio sinérgico a partir del quinto día de refrigeración con diferencias respecto del control de 8,24 unidades logarítmicas a los 5 d. *Y. enterocolitica* no se detectó en leche con el tratamiento sistema LP-reuterina a partir de los 7 d.

Tabla 47. Supervivencia de *Y. enterocolitica* (log ufc/ml) en leche con nisina (N), reuterina (R) y sistema LP (LP) a 8°C

	0 h	8 h	24 h	3 d	5 d	7 d	12 d
Control	3,49	3,52 ^c	4,66 ^c	7,47 ^c	8,39 ^d	9,10 ^d	9,38 ^d
N		3,51 ^c	4,68 ^c	7,45 ^c	8,50 ^d	9,04 ^d	9,21 ^d
R		3,44 ^{bc}	3,43 ^b	3,29 ^a	3,27 ^b	3,15 ^b	2,68 ^b
LP		3,27 ^a	3,28 ^{ab}	3,75 ^b	5,93 ^c	7,72 ^c	8,59 ^c
R + N		3,47 ^c	3,42 ^b	3,30 ^a	3,21 ^b	3,11 ^b	2,69 ^b
LP + R		3,28 ^{ab}	3,19 ^a	3,18 ^a	0,15 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice no difieren significativamente ($P < 0,01$)

3.3. TRATAMIENTOS INHIBITORIOS COMBINADOS EN CUAJADA

Las cuajadas pueden suponer un riesgo microbiológico para el consumidor debido a la potencial contaminación postpasteurización de la leche y posterior desarrollo de los patógenos en el producto.

3.3.1. REUTERINA Y SISTEMA LP

Los tratamientos combinados que dieron lugar a resultados más satisfactorios en los ensayos de inhibición en leche se aplicaron en cuajadas elaboradas a partir de leche inoculada con las bacterias patógenas, reduciendo la cantidad de reuterina en función de ensayos previos.

Se ha estudiado el efecto inhibitorio de la combinación de reuterina y sistema LP frente a bacterias patógenas Gram-negativas en cuajadas refrigeradas a 10°C elaboradas según se especifica en el apartado 2.4.4.

3.3.1.1. Efecto frente a *E. coli* O157:H7

Los niveles de *E. coli* O157:H7 resultaron significativamente ($P < 0,001$) influidos por la aplicación de los distintos tratamientos y el tiempo de refrigeración (Tabla 48).

El patógeno, con un recuento en la leche inoculada de 3,63 log ufc/ml, alcanzó en la cuajada control un valor máximo de 8,59 log ufc/ml a los 6 d y de 8,01 log ufc/ml al final de la refrigeración.

La adición de 2 UR/ml de reuterina a la leche no afectó al crecimiento de *E. coli* O157:H7. La aplicación del sistema LP retrasó el crecimiento del microorganismo patógeno en la cuajada, observándose unas diferencias respecto del control de 1,88, 1,13 y 1,06 unidades logarítmicas, a los 3 d, 6 d y 9 d, respectivamente. Sin embargo, al final de la refrigeración no se observaron diferencias con la cuajada control.

La combinación sistema LP-reuterina mostró un efecto bactericida sinérgico frente a *E. coli* O157:H7, que no se detectó en el producto durante todo el periodo de refrigeración.

La leche cruda es la principal fuente de *E. coli* O157:H7 en las plantas de procesado de leche y productos lácteos, y aunque este microorganismo es sensible a los tratamientos térmicos, existe el riesgo de contaminaciones postpasteurización de la leche a través de los equipos o del personal de la planta (Bastian y Sivelä, 2000). La aplicación de la combinación sistema LP-reuterina permitiría disponer de un sistema de seguridad ante la posible presencia de este microorganismo en cuajada.

Tabla 48. Supervivencia de *E. coli* O157:H7 (log ufc/ml) en cuajadas refrigeradas a 10°C elaboradas con leche con reuterina (R) y sistema LP (LP)

	0 h	3 d	6 d	9 d	12 d
Control	3,63	6,48 ^c	8,59 ^c	7,97 ^c	8,01 ^b
R		6,48 ^c	8,40 ^c	7,25 ^b	8,06 ^b
LP		4,60 ^b	7,46 ^b	6,91 ^b	8,10 ^b
LP + R		0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

El pH de la cuajada resultó significativamente ($P < 0,001$) influido por la aplicación de los distintos tratamientos y el tiempo de refrigeración. La reducción del pH observada en la cuajada control a lo largo de la refrigeración, podría atribuirse al crecimiento de *E. coli* O157:H7, ya que las cuajadas con niveles más bajos del patógeno presentaron unos valores de pH superiores (Tabla 49).

Tabla 49. Valores de pH en cuajadas con *E. coli* O157:H7 refrigeradas a 10°C y elaboradas con leche con reuterina (R) y sistema LP (LP)

	Leche	3 d	6 d	9 d	12 d
Control	6,63	6,17 ^a	5,85 ^a	5,56 ^a	5,44 ^a
R		6,59 ^b	6,27 ^b	5,84 ^b	5,61 ^a
LP		6,60 ^b	6,46 ^{bc}	5,97 ^{bc}	5,70 ^a
LP + R		6,57 ^b	6,59 ^c	6,45 ^c	6,31 ^b

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

En todas las muestras se observaron valores de a_w superiores a 0,989 (datos no mostrados), por lo que este factor no se puede considerar limitante para el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en la cuajada.

3.3.1.2. Efecto frente a *Sal. choleraesuis*

Se comprobó la influencia significativa ($P < 0,001$) del tratamiento y el tiempo de refrigeración sobre los niveles de *Sal. choleraesuis* en cuajada (Tabla 50).

Sal. choleraesuis se inoculó en la leche a una concentración de aproximadamente 4 unidades logarítmicas por ml y alcanzó en la cuajada control niveles superiores a 7 log ufc/ml desde el sexto día de refrigeración a 10°C. Roundy (1967) ya describió la capacidad de *Salmonella* para crecer a esta temperatura.

En la cuajada con reuterina (2 UR/ml) se observó un retraso en el crecimiento de *Sal. choleraesuis*. En la cuajada con el sistema LP se comprobó un potente efecto bactericida

que dio lugar a valores de *Sal. choleraesuis* inferiores a 0,70 log ufc/ml hasta los 9 d. A los 12 d se observó una ligera recuperación del microorganismo, que presentó niveles de 1,01 log ufc/ml. Con la combinación LP-reuterina no se detectó el patógeno desde los 3 d. La inhibición se confirmó a los 12 d con resultado negativo en muestras de 25 g de cuajada.

El tratamiento combinado sistema LP-reuterina representaría un nuevo sistema protector muy efectivo frente a una potencial contaminación de la cuajada por *Salmonella*.

Tabla 50. Supervivencia de *Sal. choleraesuis* (log ufc/ml) en cuajadas refrigeradas a 10°C elaboradas con leche con reuterina (R) y sistema LP (LP)

	0 h	3 d	6 d	9 d	12 d
Control	3,95	6,27 ^c	7,15 ^b	7,82 ^b	7,56 ^b
R		4,67 ^b	5,92 ^b	6,53 ^b	6,92 ^b
LP		0,24 ^a	0,69 ^a	0,67 ^a	1,01 ^a
LP + R		0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

El pH de la cuajada resultó significativamente ($P < 0,001$) influido por la aplicación de los distintos tratamientos y el tiempo de refrigeración (Tabla 51). Las cuajadas con el sistema LP-reuterina presentaron los valores de pH más elevados, lo que coincide con los niveles más bajos de *Sal. choleraesuis*. A los 12 d, el pH más bajo (5,79) se observó en la cuajada control, que presentó a su vez los niveles más altos del patógeno (7,56 log ufc/ml).

Tabla 51. Valores de pH en cuajadas con *Sal. choleraesuis* refrigeradas a 10°C y elaboradas con leche con reuterina (R) y sistema LP (LP)

	Leche	3 d	6 d	9 d	12 d
Control	6,63	6,59 ^a	6,33 ^a	6,01 ^a	5,79 ^a
R		6,63 ^a	6,46 ^b	6,15 ^a	5,90 ^{ab}
LP		6,63 ^a	6,57 ^c	6,35 ^a	6,12 ^{ab}
LP + R		6,61 ^a	6,57 ^c	6,40 ^a	6,29 ^c

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

En ninguna de las cuajadas examinadas se observaron valores de a_w inhibitorios para el crecimiento de *Sal. choleraesuis*, ya que en todos los casos fueron superiores a 0,989 y la a_w mínima para el crecimiento de *Salmonella* es de 0,94-0,95 (Christian, 1955).

3.3.1.3. Efecto frente *A. hydrophila* y *Y. enterocolitica*

Los niveles de *A. hydrophila* resultaron significativamente ($P < 0,001$) influidos por la aplicación de los distintos tratamientos inhibitorios y el tiempo de refrigeración (Tabla 52).

El contenido en *A. hydrophila* de la leche inoculada fue 3,88 log ufc/ml y alcanzó 8,36 log ufc/ml en la cuajada control al final de la refrigeración a 10°C.

Únicamente a los 9 y 12 d, se observaron en la cuajada con reuterina (0,5 UR/ml) niveles de *A. hydrophila* significativamente ($P < 0,01$) inferiores a los de la cuajada control. Sin embargo, el sistema LP redujo a los 3 d en 0,81 unidades logarítmicas los niveles iniciales del patógeno, dando lugar a diferencias de 4,76 unidades logarítmicas respecto del control. Posteriormente, el sistema LP actuó de forma bacteriostática, con diferencias en los recuentos del patógeno de 5,26 unidades logarítmicas respecto del control a los 12 d.

La aplicación del tratamiento combinado sistema LP-reuterina mostró un efecto inhibitorio sinérgico. *A. hydrophila* no se detectó en estas cuajadas prácticamente desde el inicio de la refrigeración.

Tabla 52. Supervivencia de *A. hydrophila* (log ufc/ml) en cuajadas refrigeradas a 10°C y elaboradas con leche con reuterina (R) y sistema LP (LP)

	0 h	3 d	6 d	9 d	12 d
Control	3,88	7,83 ^c	8,02 ^c	7,79 ^d	8,36 ^d
R		7,13 ^c	7,62 ^c	7,16 ^c	7,78 ^c
LP		3,07 ^b	2,88 ^b	2,81 ^b	3,10 ^b
LP + R		0 ^a	0,24 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

Los niveles de *Y. enterocolitica* se vieron significativamente ($P < 0,001$) afectados por la aplicación de los distintos tratamientos inhibitorios y el tiempo de refrigeración. *Y. enterocolitica* se desarrolló rápidamente en la cuajada control y alcanzó niveles de 8,34 log ufc/ml a los 3 d. Durante el resto de la refrigeración, el patógeno aumentó sus niveles 0,71 unidades logarítmicas (Tabla 53).

La adición de reuterina (0,5 UR/ml) a la cuajada no inhibió *Y. enterocolitica*. El sistema LP produjo un retraso en el crecimiento del microorganismo que a partir de los 6 d se comportó como en la cuajada control.

Sin embargo, en la leche con la combinación sistema LP-reuterina, se observaron diferencias en los niveles de *Y. enterocolitica* de 6,76 y 7,30 unidades logarítmicas con respecto de la cuajada control a los 3 d y 6 d. Posteriormente, el microorganismo reanudó el crecimiento hasta alcanzar niveles de 8,12 log ufc/ml a los 12 d de

refrigeración. Esta combinación mostró un efecto inhibitorio sinérgico frente a *Y. enterocolitica* durante todo el periodo de refrigeración que fue insuficiente para controlar el crecimiento del patógeno.

Tabla 53. Supervivencia de *Y. enterocolitica* (log ufc/ml) en cuajadas refrigeradas a 10°C y elaboradas con leche con reuterina (R) y sistema LP (LP)

	0 h	3 d	6 d	9 d	12 d
Control	3,57	8,34 ^c	8,91 ^b	8,76 ^c	9,05 ^b
R		8,42 ^c	8,99 ^b	7,34 ^b	8,87 ^b
LP		4,20 ^b	7,35 ^b	8,71 ^c	8,60 ^{ab}
LP + R		1,58 ^a	1,61 ^a	5,08 ^a	8,12 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

El pH de la cuajada resultó significativamente ($P < 0,001$) influido por el tiempo de refrigeración (Tabla 54). En todos los casos, los valores de pH fueron superiores a 6,3, por lo que no representarían un factor limitante para el crecimiento de los microorganismos patógenos estudiados.

Tabla 54. Valores de pH en cuajadas con *A. hydrophila* y *Y. enterocolitica* refrigeradas a 10°C y elaboradas con leche con reuterina (R) y sistema LP (LP)

	Leche	3 d	6 d	9 d	12 d
Control	6,64	6,47 ^a	6,56 ^a	6,54 ^a	6,31 ^a
R		6,54 ^b	6,53 ^a	6,55 ^a	6,32 ^a
LP		6,67 ^c	6,47 ^a	6,55 ^a	6,42 ^a
LP + R		6,65 ^c	6,53 ^a	6,56 ^a	6,44 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

Los valores de a_w fueron en todos los casos superiores a 0,989 por lo que este factor no se puede considerar limitante para el crecimiento de *A. hydrophila* y *Y. enterocolitica*. Según Christian (1980), estas bacterias necesitan unos valores mínimos de a_w de 0,95 para su crecimiento.

3.3.2. NISINA, REUTERINA Y SISTEMA LP

Se ha estudiado el efecto inhibitorio de la combinación de nisina, reuterina y sistema LP sobre bacterias patógenas Gram-positivas en cuajadas refrigeradas a 10°C elaboradas según lo indicado en el apartado 2.4.4.

3.3.2.1. Efecto frente *L. monocytogenes*

Los niveles de *L. monocytogenes* resultaron significativamente ($P < 0,001$) influidos por la aplicación de los distintos tratamientos y el tiempo de refrigeración (Tabla 55).

El recuento de *L. monocytogenes* en leche inoculada fue de 3,82 log ufc/ml. El patógeno alcanzó en la cuajada control un valor de 8,31 log ufc/ml a los 3 d y de 8,53 log ufc/ml a los 12 d.

La reuterina no afectó al comportamiento de *L. monocytogenes* en cuajada. Con nisina, se observaron a los 12 d diferencias en los niveles del patógeno de 0,48 unidades logarítmicas respecto del control, mientras que esta diferencia fue de 0,63 unidades logarítmicas con reuterina-nisina. Esta combinación no mostró el efecto sinérgico observado en leche refrigerada, aunque en leche se adicionaron 8 UR/ml y en cuajada se redujo a 2 UR/ml. La sensibilidad del patógeno al tratamiento podría variar en función de la cantidad de reuterina empleada.

Tabla 55. Supervivencia de *L. monocytogenes* (log ufc/ml) en cuajadas refrigeradas a 10°C elaboradas con leche con reuterina (R), nisina (N) y sistema LP (LP)

	0 h	3 d	6 d	9 d	12 d
Control	3,82	8,31 ^e	8,77 ^e	8,81 ^b	8,53 ^d
N		5,77 ^d	8,05 ^d	8,30 ^b	8,05 ^{bc}
R		8,23 ^e	8,56 ^e	8,34 ^b	8,55 ^d
R + N		4,62 ^{cd}	6,79 ^c	8,20 ^b	7,90 ^b
LP		4,19 ^{bc}	7,92 ^d	8,37 ^b	8,47 ^d
LP + R		3,06 ^b	5,69 ^b	7,96 ^b	8,27 ^{cd}
LP + N		0,35 ^a	0,24 ^a	0,83 ^a	0 ^a
LP + R + N		0 ^a	0,30 ^a	0 ^a	0,20 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

Con el sistema LP o con la combinación sistema LP-reuterina, sólo se detectaron diferencias frente a la cuajada control hasta los 6 d. La combinación sistema LP-nisina fue la más efectiva, con diferencias de aproximadamente 8 unidades logarítmicas respecto del control durante todo el periodo de refrigeración. El tratamiento triple no

incrementó significativamente el efecto inhibitorio observado con el sistema LP-reuterina.

En cuajadas elaboradas de forma tradicional a partir de leche cruda se ha descrito la presencia de *L. monocytogenes* a niveles superiores a 4 log ufc/g (Marco *et al.* 2002). Nuestros resultados mostraron que con la combinación sistema LP-nisina se consigue una reducción eficaz de la población de *L. monocytogenes* en este producto refrigerado deficientemente a 10°C, y en el que puede tener lugar una rápida proliferación de *L. monocytogenes*.

3.3.2.2. Efecto frente a *S. aureus*

Los niveles de *S. aureus* se vieron significativamente ($P < 0,001$) influidos por la aplicación de los distintos tratamientos y el tiempo de refrigeración (Tabla 56).

A los 12 d, se registraron valores de *S. aureus* de 7,70 log ufc/ml en la cuajada control. La aplicación individual de los agentes inhibidores no afectó al crecimiento de este patógeno en la cuajada.

Durante los 3 primeros días los niveles del patógeno no aumentaron con las combinaciones reuterina-nisina y sistema LP-reuterina. Con LP-nisina y LP-reuterina-nisina se detectó una reducción de 0,58 y 0,74 unidades logarítmicas respecto a las 0 h. Después de 12 d a 10°C, todas las cuajadas con excepción de la tratada con la combinación triple, presentaron niveles de *S. aureus* superiores a 6 log ufc/ml. Con la combinación LP-reuterina-nisina los recuentos de *S. aureus* fueron de 2,61 log ufc/ml a los 12 d.

Tabla 56. Supervivencia de *S. aureus* (log ufc/ml) en cuajadas refrigeradas a 10°C elaboradas con leche con reuterina (R), nisina (N) y sistema LP (LP)

	0 h	3 d	6 d	9 d	12 d
Control	3,77	6,40 ^b	7,44 ^c	8,04 ^b	7,70 ^b
N		5,12 ^{ab}	5,60 ^{bcd}	6,68 ^{bc}	6,48 ^b
R		5,49 ^{ab}	7,44 ^c	7,61 ^{bc}	7,17 ^b
R + N		3,87 ^{ab}	6,09 ^{bcd}	7,17 ^{bc}	7,06 ^b
LP		5,38 ^{ab}	7,06 ^{cd}	7,81 ^b	7,52 ^b
LP + R		3,70 ^{ab}	5,24 ^{abc}	6,32 ^{bc}	6,11 ^b
LP + N		3,19 ^a	4,43 ^{ab}	5,36 ^b	6,26 ^b
LP + R + N		3,03 ^a	3,31 ^a	2,76 ^a	2,61 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

S. aureus puede crecer rápidamente y producir enterotoxinas a partir 10°C (Otero *et al.*, 1988), especialmente en alimentos con elevada a_w y ricos en proteínas como puede ser la cuajada.

Según nuestros resultados, el tratamiento combinado sistema LP-reuterina-nisina mostró un efecto inhibitorio sinérgico frente a *S. aureus* en cuajadas insuficientemente refrigeradas, manteniendo al patógeno a niveles inferiores a los considerados de riesgo para el consumidor.

El pH de la cuajada resultó significativamente ($P < 0,001$) influido por la aplicación de los distintos tratamientos y el tiempo de refrigeración (Tabla 57). Hasta los 9 d, todas las cuajadas presentaron valores de pH superiores a 6. A los 12 d no se detectaron diferencias significativas entre el pH de la cuajada control y el pH de las cuajadas con los distintos tratamientos.

Tabla 57. Valores de pH en cuajadas con patógenos Gram-positivos refrigeradas a 10°C y elaboradas con leche con reuterina (R), nisina (N) y sistema LP (LP)

	Leche	3 d	6 d	9 d	12 d
Control	6,67	6,50 ^a	6,40 ^a	6,00 ^a	6,00 ^{abc}
N		6,55 ^a	6,53 ^{bc}	6,51 ^b	6,45 ^{bc}
R		6,49 ^a	6,39 ^a	6,20 ^{ab}	5,93 ^{ab}
R + N		6,53 ^a	6,58 ^{bcd}	6,42 ^{ab}	6,36 ^{bc}
LP		6,55 ^a	6,51 ^b	6,12 ^{ab}	5,61 ^a
LP + R		6,54 ^a	6,59 ^{bcd}	6,21 ^{ab}	5,93 ^{ab}
LP + N		6,56 ^a	6,61 ^{cd}	6,51 ^b	6,54 ^c
LP + R + N		6,55 ^a	6,61 ^{cd}	6,53 ^b	6,47 ^c

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

Los valores de a_w fueron en todos los casos superiores a 0,989.

3.3.2.3. Actividad nisina en cuajada

En todas las cuajadas con nisina aplicada individualmente o en combinación con otros tratamientos, se detectó actividad inhibitoria determinada por la formación de halos de inhibición frente a *C. tyrobutyricum*. Esta actividad fue positiva durante todo el periodo de refrigeración (Tabla 58).

Tabla 58. Actividad nisina* en cuajadas inoculadas con patógenos Gram-positivos y elaboradas con leche con reuterina (R), nisina (N) y sistema LP (LP)

	3 d	6 d	9 d	12 d
N	18,1	17,5	18,1	18,0
R + N	18,0	17,9	16,8	16,8
LP + N	17,2	17,9	17,5	17,8
LP + R + N	16,9	17,8	16,6	16,5

*Expresada como diámetro en mm del halo de inhibición frente a *C. tyrobutyricum*

3.3.2.4. Reuterina residual en cuajada

Mediante la prueba colorimétrica de Circle *et al.* (1945) se puso de manifiesto visualmente una disminución del color a lo largo de la refrigeración en los extractos obtenidos de todas las cuajadas. Sin embargo, las medidas de absorbancia resultaron muy variables debido posiblemente a interferencias con componentes de la cuajada. No obstante, las medias por día de los valores de absorbancia obtenidos entre todas las cuajadas tratadas con 2 UR/ml y 0,5 UR/ml mostraron una tendencia a la reducción a lo largo de la refrigeración acorde con la disminución de color observada visualmente (Tabla 59), que se correspondería con un descenso de la cantidad de reuterina en la cuajada al aumentar el tiempo de almacenamiento.

Tabla 59. Determinación de reuterina (valores medios de absorbancia a 490 nm) en cuajadas refrigeradas 10°C elaboradas con leche con reuterina individualmente o en combinación con otros tratamientos

	3 d	6 d	9 d	12 d
Cuajadas con 2 UR/ml	0,29	0,26	0,24	0,21
Cuajadas con 0,5 UR/ml	0,17	0,16	0,03	0,01

3.4. TRATAMIENTOS INHIBITORIOS COMBINADOS EN QUESO

3.4.1. BACTERIAS LÁCTICAS PRODUCTORAS DE BACTERIOCINAS

Se ha estudiado el efecto de la adición de diferentes bacterias lácticas productoras de bacteriocinas como adjuntos al fermento comercial, sobre la supervivencia de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 y *B. cereus*, durante la elaboración y maduración de queso tipo Hispánico fabricado a partir de leche cruda de vaca.

La elaboración y maduración de los quesos se realizó según el protocolo descrito en el apartado 2.4.4.

3.4.1.1 Efecto frente a *L. monocytogenes*

Los niveles de *L. monocytogenes* resultaron significativamente ($P < 0,001$) influidos por el cultivo bacteriocinogénico adicionado y el tiempo de maduración (Tabla 60).

L. monocytogenes alcanzó a las 6 h un nivel de 6,47 log ufc/g. Entre las 6 h y los 60 d se comprobó un descenso de 1,69 unidades logarítmicas.

En estudios previos con la misma cepa de *L. monocytogenes* (Scott A), Nuñez *et al.* (1997) observaron un comportamiento semejante durante la maduración de queso Manchego elaborado con un fermento comercial. La supervivencia de *L. monocytogenes* durante la elaboración y maduración de quesos de similares características ha sido descrita en queso Cheddar (Ryser and Marth, 1987) y quesos españoles de pasta semi-dura (Domínguez *et al.*, 1987; Rodríguez *et al.*, 2001).

La mayor inhibición de *L. monocytogenes* se comprobó en los quesos elaborados con el productor de enterocina AS-48, con recuentos 2,83 unidades logarítmicas inferiores a los del queso control a los 60 d de maduración. Nuñez *et al.* (1997) observaron en queso Manchego de 60 d elaborado con el productor de enterocina AS-48 como adjunto al fermento comercial, niveles de *L. monocytogenes* Scott A 1,18 unidades logarítmicas inferiores a los del queso fabricado únicamente con el fermento comercial.

A los 60 d, los quesos con los productores de lacticina 481, bacteriocina TAB 7 ó bacteriocina TAB 57 presentaron diferencias en los niveles del patógeno de más de una unidad logarítmica respecto del queso control, mientras que con los productores de nisina A o nisina Z éstas diferencias fueron de 0,63 y 0,57 unidades logarítmicas, respectivamente. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en los recuentos de *L. monocytogenes* respecto del control con el productor de enterocina I.

Rodríguez *et al.* (2001) observaron en queso de pasta prensada de 60 d de maduración, elaborado con lactococos productores de nisina o lacticina 481, recuentos de *L. monocytogenes* Ohio 2,41 y 2,56 unidades logarítmicas inferiores a los del queso

elaborado con fermento comercial, respectivamente. En quesos elaborados con un productor de enterocina AS-48 no se detectó *L. monocytogenes* durante la elaboración y maduración del queso. Las diferencias observadas entre estos resultados y los observados en el presente trabajo podrían atribuirse a la distinta sensibilidad entre las cepas Ohio y Scott A, la carga inicial del patógeno, así como a diferencias en el pH que pudiesen afectar a la actividad inhibitoria de las bacteriocinas (Nuñez *et al.*, 1997).

La adición de bacteriocinas activas frente a *L. monocytogenes* o de los cultivos productores ha sido también estudiada en queso Cottage (McAuliffe *et al.* (1999), Camembert (Maisnier-Patin *et al.*, 1992; Wan *et al.*, 1997b), Ricotta (Davies *et al.*, 1997) o Taleggio (Giraffa y Carminati, 1997). El empleo de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas ha dado lugar a resultados distintos en función de las condiciones de fabricación y almacenamiento del queso. La producción de bacteriocina por los cultivos productores y su actividad inhibitoria dependen de una serie de factores como temperatura, características fisicoquímicas o composición del alimento (Biswas *et al.*, 1991; Parente y Hill, 1992b,c; Gänzle *et al.*, 1999).

Tabla 60. Supervivencia de *L. monocytogenes* (log ufc/g) durante la fabricación y maduración de quesos elaborados con distintos fermentos

	Bacteriocina	0 h	6 h	2 d	15 d	30 d	60 d
Control	-	5,14	6,47 ^b	6,25 ^a	6,05 ^d	5,69 ^c	4,78 ^d
<i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481		6,29 ^{ab}	6,15 ^a	5,93 ^{cd}	5,73 ^c	3,55 ^b
<i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z		6,24 ^{ab}	6,13 ^a	6,09 ^d	5,63 ^c	4,21 ^c
<i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A		6,32 ^{ab}	5,98 ^a	5,67 ^{bc}	5,10 ^b	4,15 ^c
<i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57		6,24 ^{ab}	6,15 ^a	5,68 ^{bc}	5,62 ^c	3,61 ^b
<i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7		6,07 ^a	6,15 ^a	6,08 ^d	5,81 ^c	3,61 ^b
<i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I		6,29 ^{ab}	6,21 ^a	5,52 ^{ab}	5,67 ^c	4,82 ^d
<i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48		6,31 ^{ab}	6,24 ^a	5,28 ^a	2,77 ^a	1,95 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

3.4.1.2. Inhibición de *S. aureus*

El análisis de varianza reveló la influencia significativa ($P < 0,001$) del cultivo bacteriocinogénico adicionado y del tiempo de maduración sobre los niveles de *S. aureus* (Tabla 61).

Los niveles más altos del patógeno se alcanzaron a las 6 h en el queso control, con 6,68 log ufc/g. En los quesos con bacteriocinas se observaron diferencias respecto del control de tan solo 0,10-0,28 unidades logarítmicas.

A los 30 d, los quesos elaborados con el productor de bacteriocina TAB 57 y el productor de enterocina I presentaron los niveles más bajos de *S. aureus*, con diferencias de 0,46 y 0,36 unidades logarítmicas respecto al queso control. Sin embargo, los quesos adicionados con *Lc. lactis* TAB 24, *Lc. lactis* TAB 26, *Lc. lactis* TAB 50 ó *Ec. faecium* TAB 7 mostraron valores de *S. aureus* superiores a los del queso control.

Entre los 30 d y los 60 d se produjo un incremento en los niveles de *S. aureus* en el queso control, que alcanzó un valor de 5,60 log ufc/g al final de la maduración. En los quesos con los productores de nisina TAB 26 y TAB 50, los niveles del patógeno resultaron 0,61 y 0,38 unidades logarítmicas superiores a los del control a los 60 d de maduración. El resto de quesos presentaron niveles del patógeno inferiores a los del queso control. Las mayores diferencias se detectaron con *Lc. lactis* TAB 57, *Ec. faecalis* TAB 52 y *Ec. faecalis* INIA 4, con valores de 1,46, 1,36 y 1,45 unidades logarítmicas inferiores a los del queso control, respectivamente.

Gaya *et al.* (1988) elaboraron queso Manchego con y sin fermento a partir de leche cruda inoculada con *S. aureus*. Los niveles de este microorganismo alcanzaron en el queso control 5,84 log ufc/g a las 24 h, y disminuyeron hasta 4,45 log ufc/g a los 60 d de maduración, mientras que los quesos que contenían *Lc. lactis* INIA 12 presentaron recuentos de 5,61 y 3,69 log ufc/g a las 24 h y 60 d de maduración, respectivamente. Los niveles más bajos de *S. aureus* observados en los quesos con fermento no fueron exclusivamente atribuidos al descenso del pH de los quesos.

Abdalla *et al.* (1993) observaron la inhibición total de *S. aureus* en queso en salmuera elaborado con leche pasteurizada adicionada con un cultivo iniciador al 1%. Sin embargo, la adición de 25 µg/ml de nisina no produjo ningún efecto inhibitorio después de 60 d a 4°C.

En queso de pasta prensada elaborado a partir de leche cruda e inoculado con un productor de nisina, se observaron diferencias en los recuentos de *S. aureus* de 0,82 unidades logarítmicas respecto del queso con fermento comercial, después de 30 d de maduración a 12°C. Sin embargo, a los 60 d no se detectaron diferencias entre ambos quesos (Rodríguez *et al.*, 2000). En el presente trabajo se obtuvieron resultados similares.

Tabla 61. Supervivencia de *S. aureus* (log ufc/g) durante la fabricación y maduración de quesos elaborados con distintos fermentos

	Bacteriocina	0 h	6 h	2 d	15 d	30 d	60 d
Control	-	5,32	6,68 ^b	6,46 ^b	6,34 ^b	5,37 ^c	5,60 ^c
<i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481		6,48 ^{ab}	6,21 ^a	5,99 ^a	5,91 ^d	5,35 ^b
<i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z		6,53 ^{ab}	6,42 ^b	6,09 ^a	6,13 ^d	6,21 ^d
<i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A		6,49 ^{ab}	6,27 ^{ab}	6,11 ^a	5,92 ^d	5,98 ^d
<i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57		6,56 ^{ab}	6,31 ^{ab}	6,21 ^{ab}	4,91 ^a	4,14 ^a
<i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7		6,58 ^{ab}	6,35 ^a	6,21 ^a	6,16 ^d	5,49 ^b
<i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I		6,40 ^a	6,25 ^{ab}	6,00 ^a	5,01 ^{ab}	4,24 ^a
<i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48		6,44 ^a	6,26 ^{ab}	6,21 ^{ab}	5,19 ^{bc}	4,15 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

3.4.1.3. Bacterias totales

La población de bacterias totales no se puede considerar influida por la adición de los diferentes cultivos bacteriocinogénicos, ya que se mantuvo en niveles muy elevados durante toda la maduración del queso. Los recuentos más altos se obtuvieron entre los 2 d y los 30 d, con valores superiores a 9,5 log ufc/g. A los 60 d, se detectó un descenso en los niveles de bacterias totales en todos los quesos de entre 0,20 y 0,72 unidades logarítmicas respecto de los observados a los 30 d (Tabla 62).

Tabla 62. Bacterias totales (log ufc/g) durante la fabricación y maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y *L. monocytogenes*/*S. aureus*

	Bacteriocina	0 h	6 h	2 d	15 d	30 d	60 d
Control	-	5,22	9,01	9,73	9,63	9,64	9,34
<i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481		9,33	9,65	9,59	9,53	9,15
<i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z		9,26	9,69	9,63	9,73	9,01
<i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A		9,11	9,67	9,59	9,72	9,30
<i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57		9,24	9,70	9,65	9,69	9,29
<i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7		9,15	9,62	9,64	9,70	9,46
<i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I		9,03	9,64	9,50	9,56	9,36
<i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48		8,79	9,68	9,70	9,71	9,19

3.4.1.4 . pH y a_w

El pH del queso resultó influido significativamente ($P < 0,001$) por el cultivo bacteriocinogénico adicionado y por el tiempo de maduración (Tabla 63).

En queso control los valores de pH fueron más bajos ($P < 0,01$) desde los 15 d y hasta el final de la maduración en comparación con el resto de los quesos.

A los 30 d, el pH del queso control presentó un valor de 4,75, que coincidió con el nivel más bajo de *S. aureus*.

Tabla 63. Valores de pH durante la fabricación y maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y *L. monocytogenes*/*S. aureus*

	Leche	6 h	1 d	2 d	15 d	30 d	60 d
Control	6,80	6,15 ^{bcd}	5,14 ^a	5,31 ^a	4,94 ^a	4,75 ^a	5,06 ^a
<i>Lc. lactis</i> TAB 24		6,07 ^{ab}	5,29 ^b	5,42 ^b	5,24 ^b	5,15 ^d	5,29 ^b
<i>Lc. lactis</i> TAB 26		6,11 ^{abc}	5,33 ^c	5,36 ^{ab}	5,15 ^b	5,11 ^{cd}	5,33 ^b
<i>Lc. lactis</i> TAB 50		6,06 ^a	5,28 ^{bc}	5,28 ^a	5,20 ^b	5,03 ^{bc}	5,31 ^b
<i>Lc. lactis</i> TAB 57		6,16 ^{bcd}	5,26 ^{bc}	5,32 ^a	5,21 ^b	4,97 ^b	5,24 ^b
<i>Ec. faecium</i> TAB 7		6,16 ^{bcd}	5,22 ^{ab}	5,33 ^{ab}	5,19 ^b	5,13 ^d	5,33 ^b
<i>Ec. faecalis</i> TAB 52		6,18 ^{cd}	5,30 ^{bc}	5,34 ^a	5,25 ^b	5,00 ^b	5,30 ^b
<i>Ec. faecalis</i> INIA 4		6,23 ^d	5,30 ^{bc}	5,30 ^a	5,19 ^b	5,00 ^b	5,32 ^b

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

Los valores mínimos de a_w para el crecimiento de *L. monocytogenes* y *S. aureus* son de 0,94 y 0,85, respectivamente. Además, la producción de enterotoxinas por *S. aureus* tiene lugar a valores superiores a 0,93 (Farkas, 1997). Los valores de a_w observados en los quesos son todos superiores a 0,970 (datos no mostrados) y, por tanto, no resultarían inhibitorios para ninguno de estos dos microorganismos ni impedirían la producción de enterotoxinas a *S. aureus*.

3.4.1.5. Actividad bacteriocina

Se observó actividad bacteriocina en todos los quesos elaborados con los aislamientos productores durante el periodo de maduración estudiado, lo que indica que los cultivos bacteriocinogénicos fueron capaces de crecer en competición con la flora nativa de la leche durante la fabricación y maduración del queso (Tabla 64). Por otra parte, no se observaron halos de inhibición en el queso control.

Tradicionalmente los lactococos productores de nisina se han considerado inapropiados como cultivos iniciadores en la fabricación de queso (Roberts *et al.*, 1992). Sin

embargo, algunos autores han aislado de queso y leche cepas productoras de nisina con características tecnológicas adecuadas (Martínez *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 1998).

Por otro lado, Rodríguez *et al.* (2001) observaron actividad inhibitoria de las bacteriocinas nisina, lacticina 481 y enterocina AS-48 durante todo el periodo de maduración en queso de pasta prensada elaborado con leche cruda de vaca. Además verificaron la presencia de las bacterias productoras de bacteriocinas a los 60 d detectando su gen estructural mediante la técnica de hibridación en colonia.

Tabla 64. Actividad de las bacteriocinas* durante la maduración de queso tipo Hispánico elaborado con distintos fermentos y *L. monocytogenes*/*S. aureus*

	Bacteriocina	2 d	15 d	30 d	60 d
Control	-	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Sin halo
<i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	9,4	9,9	8,0	7,9
<i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	10,0	13,0	8,5	7,3
<i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	18,4	14,3	21,8	20,5
<i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	9,6	11,5	8,6	9,0
<i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	6,0	5,5	6,0	5,5
<i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	12,5	12,5	10,8	11,0
<i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	6,5	5,5	6,50	5,0

*Expresada como diámetro en mm del halo de inhibición frente a *C. tyrobutyricum* NZ8

3.4.1.6. Efecto frente a *E. coli* O157:H7

Los niveles de *E. coli* O157:H7 se mostraron significativamente ($P < 0,001$) influidos por el cultivo bacteriocinogénico adicionado y el tiempo de maduración (Tabla 65).

En el queso control los niveles del patógeno aumentaron durante el periodo de fabricación, alcanzando a las 6 h un valor de 6,74 log ufc/g. Posteriormente, se observó un descenso de la población del microorganismo a lo largo de maduración hasta 2,36 log ufc/g a los 60 d.

A los 2 d y 15 d, los niveles más bajos del patógeno se obtuvieron en los quesos con el productor de lacticina 481, que mostró diferencias de 0,86 y 1,8 unidades logarítmicas con el queso control, respectivamente.

A los 30 d, el queso control presentó niveles de *E. coli* de 4,51 log ufc/g, mientras que en los quesos elaborados con los productores de las bacteriocinas lacticina 481, nisina Z, TAB 7, enterocina I y enterocina AS-48 estos fueron entre 0,56 y 0,96 unidades logarítmicas inferiores a los del queso control. Entre los 15 d y los 30 d, el mayor descenso del patógeno se observó en el queso con *Lc. lactis* TAB 26.

E. coli O157:H7 fue capaz de sobrevivir en el queso control hasta el final de la maduración, con recuentos de 2,36 log ufc/g. En el resto de quesos los niveles de patógeno fueron similares o superiores al control, excepto en el queso con *Lc. lactis* TAB 26, que presentó valores 0,70 unidades logarítmicas inferiores.

La diferencia observada con el productor de nisina Z podría deberse a una sensibilización por ácidos orgánicos, de acuerdo con el efecto observado por Kalchayanand *et al.* (1992) con nisina o pediocina. Este efecto se atribuye a la permeabilización de la capa externa de lipopolisacáridos de los microorganismos Gram negativos (Alakomi *et al.*, 2000). Los quesos elaborados con *L. lactis* TAB 26 presentaron el valor de pH más bajo a los 30 d de la maduración (Tabla 68).

Sin embargo, la resistencia de *E. coli* O157:H7 a valores de pH bajos ha sido puesta de manifiesto por diversos autores. *E. coli* O157:H7 sobrevivió en yogur inoculado a 10^7 ufc/ml entre 5 y 17 días, dependiendo de la temperatura de refrigeración (4°C u 8°C) y el pH del yogur (entre 4,17 y 4,47) (Hudson *et al.*, 1997). En otro estudio, *E. coli* O157:H7 inoculado a 10^3 ufc/ml sobrevivió durante la fabricación y almacenamiento de yogur tradicional y yogur con bifidobacterias durante 7 d a 4°C, con un pH mínimo de 4,5 (Massa *et al.*, 1997).

Por otra parte, se han descrito distintos comportamientos de *E. coli* O157:H7 en función de las características particulares de cada tipo de queso. Arocha *et al.* (1992) observaron un incremento de 2 unidades logarítmicas en los niveles de *E. coli* O157:H7 durante la fabricación de queso Cottage en presencia de bacterias lácticas. Después de la fase de calentamiento a 57°C ya no se pudo detectar el patógeno.

En quesos Colby, Romano y Feta, *E. coli* O157:H7 sobrevivió durante la fabricación y posterior maduración durante 27 d, 30 d y 27 d, respectivamente. En queso Colby (pH 4,6) se produjo una disminución gradual del patógeno, mientras que en queso Romano (pH 5,2) y Feta (pH 4,8) se observó una rápida disminución del patógeno después de la salida de salmuera (Hudson *et al.*, 1997).

Por otro lado, Reitsma y Henning (1996) observaron una disminución de 2 unidades logarítmicas en los recuentos de *E. coli* O157:H7 después de 60 d de maduración en queso Cheddar inoculado con 10^3 ufc/ml del patógeno. A los 158 d todavía detectaron la presencia de *E. coli* O157:H7 en el queso.

En quesos Feta y Camembert elaborados con leche cruda, leche pasteurizada y leche cruda inoculada con un productor de nisina, los recuentos de *E. coli* O157:H7 aumentaron respecto de los niveles iniciales (10^4 ufc/ml) en todos los casos después de 75 d y 65 d, respectivamente (Ramsaran *et al.*, 1998)

Tabla 65. Supervivencia de *E. coli* O157:H7 (log ufc/g) durante la faricación y maduración de quesos elaborados con distintos fermentos

	Bacteriocina	0 h	6 h	2 d	15 d	30 d	60 d
Control	-	4,44	6,74 ^{cde}	5,67 ^d	5,45 ^d	4,51 ^c	2,36 ^b
<i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481		6,76 ^{cde}	4,81 ^a	3,65 ^a	3,71 ^{ab}	2,78 ^c
<i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z		6,89 ^e	5,42 ^{bcd}	4,80 ^c	3,55 ^a	1,66 ^a
<i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A		6,16 ^a	5,52 ^{cd}	4,72 ^c	4,60 ^c	2,95 ^{cd}
<i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57		6,45 ^{abc}	5,23 ^{bc}	4,69 ^c	4,36 ^c	3,25 ^d
<i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7		6,81 ^{de}	5,23 ^{bc}	4,47 ^c	3,75 ^{ab}	2,05 ^b
<i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I		6,20 ^{ab}	5,40 ^{bc}	4,11 ^b	3,95 ^b	3,26 ^d
<i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48		6,51 ^{bcd}	5,15 ^b	4,57 ^c	3,67 ^{ab}	2,84 ^c

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

3.4.1.7. Efecto frente a *B. cereus*

Los niveles de *B. cereus* resultaron influidos significativamente ($P < 0,001$) por el cultivo bacteriocinogénico adicionado y el tiempo de maduración (Tabla 66).

A las 6 h de fabricación, *B. cereus* alcanzó niveles de 6,49 log ufc/g en el queso control. En este tiempo, los niveles más bajos del patógeno se observaron en los quesos con *Lc. lactis* TAB 50, *Lc. lactis* TAB 57, *Ec. faecalis* TAB 52 y *Ec. faecalis* INIA 4 que presentaron diferencias de entre 0,66 y 0,81 unidades logarítmicas respecto del queso control. Ronner *et al.* (1999) observaron como en leche infantil rehidratada e inoculada con una mezcla de tres cepas de *B. cereus*, el microorganismo creció aproximadamente 4 unidades logarítmicas después de 24 h a 25°C, mientras que a 4°C, 8°C ó 12°C no se observó crecimiento.

A los 2 d, los niveles de *B. cereus* descendieron una media de 3,61 unidades logarítmicas en todos los quesos, coincidiendo con una disminución del pH hasta valores comprendidos entre 4,90 y 5,02. En queso control *B. cereus* presentó de 3,11 log ufc/g, y en los elaborados con los productores de lacticina 481, TAB 57, enterocina I ó enterocina AS-48 se registraron diferencias de más de una unidad logarítmica respecto del queso control. Estos resultados coinciden con los de Jaquette y Beuchat (1998), quienes no observaron crecimiento de formas vegetativas o esporas de distintas cepas de *B. cereus* en caldo BHI a valores de pH inferiores a 5,06 a temperaturas de 8°C ó 15°C.

Entre los días 2 y 30, los niveles de *B. cereus* continuaron descendiendo en todos los quesos, y a los 60 d únicamente se pudo detectar la presencia del microorganismo en el queso control y en el elaborado con *Lc. lactis* TAB 26 a niveles de 1,59 y 1,29 log

ufc/g, respectivamente. En el resto de quesos los niveles de *B. cereus* quedaron por debajo del límite de detección.

La diferente actividad inhibitoria observada en los quesos elaborados con el productor de nisina Z, respecto del productor de nisina A coincidió con los valores de actividad bacteriocina detectados frente a *Clostridium* (Tabla 69). Vessoni *et al.* (2002) observaron la capacidad de la nisina para inhibir el crecimiento de *B. cereus* en leche. La efectividad de esta bacteriocina es superior al incrementar la concentración, mostrando un efecto más pronunciado en el tiempo a pH ácido y a baja temperatura (Jaquette y Beuchat, 1998).

En queso Cheddar para untar inoculado con 10^5 ufc/g de una mezcla de tres cepas de *B. cereus* aisladas de brotes diarreicos, el microorganismo no fue capaz de crecer después de 6 meses a 8°C, 12°C ó 25°C (Ronner *et al.*, 1999). Tampoco *B. cereus* fue capaz de desarrollarse en queso loncheado inoculado con 10^3 ufc/g y mantenido durante 7 d a 27°C en bolsas de plástico (Glass *et al.*, 2001). Aunque generalmente *B. cereus* no crece a bajas temperaturas, algunas cepas aisladas de leche son psicrotrofas y pueden producir toxinas a temperaturas de refrigeración (Van Netten *et al.*, 1990).

La información bibliográfica sobre el comportamiento *B. cereus* en queso es escasa. En queso, la proliferación de *B. cereus* hasta niveles de 10^6 ufc/g puede dar lugar a la liberación de toxina emética. La estabilidad de esta toxina en un amplio rango de pH (2-11) unida a su resistencia a la proteólisis la harían susceptible de permanecer en el queso hasta el final de la maduración y podría suponer un riesgo potencial para el consumidor. La presencia de adjuntos productores de bacteriocinas en el queso podría contribuir a mejorar la seguridad microbiológica del queso de pasta prensada ante la eventual presencia de este microorganismo patógeno en la leche.

Tabla 66. Supervivencia de *B. cereus* (log ufc/g) durante la fabricación y maduración de queso tipo Hispánico elaborado con distintos fermentos

	Bacteriocina	0 h	6 h	2 d	30 d	60 d
Control	-	3,61	6,49 ^b	3,11 ^b	1,76 ^{ab}	1,59 ^b
<i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481		6,18 ^{ab}	2,01 ^a	1,00 ^a	0 ^a
<i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z		6,31 ^{ab}	2,51 ^{ab}	1,89 ^b	1,29 ^b
<i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A		5,82 ^{ab}	2,93 ^b	1,35 ^{ab}	0 ^a
<i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57		5,72 ^{ab}	2,01 ^a	1,27 ^{ab}	0 ^a
<i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7		6,26 ^{ab}	2,91 ^b	1,18 ^{ab}	0 ^a
<i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I		5,68 ^a	2,01 ^a	1,18 ^{ab}	0 ^a
<i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48		5,83 ^{ab}	2,01 ^a	1,65 ^{ab}	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

3.4.1.8. Bacterias totales

Los niveles más altos de bacterias totales se observaron entre los días 2 y 30, manteniéndose a los 60 d, por encima de 8,50 log ufc/g en todos los casos (Tabla 67).

Tabla 67. Bacterias totales (log ufc/g) durante la fabricación y maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y *E. coli/B. cereus*

	Bacteriocina	0 h	6 h	2 d	15 d	30 d	60 d
Control	-	4,40	8,92	9,71	9,75	9,82	9,04
<i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481		8,99	9,58	9,79	9,56	8,58
<i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z		9,06	9,64	9,88	9,79	8,68
<i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A		8,91	9,64	9,43	9,76	9,20
<i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57		8,82	9,63	9,75	9,76	9,25
<i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7		8,90	9,65	9,66	9,87	8,99
<i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I		8,82	9,62	9,76	9,74	8,74
<i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48		8,75	9,65	9,72	9,75	8,75

3.4.1.9. pH y a_w

Los valores de pH del queso resultaron influidos significativamente ($P < 0,001$) por el cultivo bacteriocinogénico adicionado y por el tiempo de maduración (Tabla 68).

El pH del queso a las 24 h fue aproximadamente una unidad inferior en todos los quesos respecto de los valores observados las 6 h.

A los 30 d, el pH del queso con *Lc. lactis* TAB 26 fue significativamente ($P < 0,01$) inferior al del resto de quesos en 0,09-0,13 unidades. Al final de la maduración se observó un aumento de pH en todos los quesos, que presentaron unos valores de pH finales comprendidos entre 5,21 y 5,38 unidades.

Conner y Kotrola (1995) establecieron con distintos ácidos un pH de 5,5 como inhibitorio del crecimiento de *E. coli* O157:H7 a 10°C, mientras que a temperaturas superiores el pH inhibitorio era una unidad menor. Estos autores observaron que niveles de 10^5 ufc/ml de *E. coli* O157:H7 se redujeron ligeramente con ácido láctico a pH 4,7 en caldo TSBYE mantenido a 10°C durante 8 semanas. Por otro lado, Casey y Condon (2002) observaron una disminución del efecto bactericida del ácido láctico (pH 4,2) frente a *E. coli* O157: H45 en presencia de un 4% de NaCl.

En el presente trabajo, la temperatura de fabricación osciló entre 32°C y 37°C y el pH de los quesos a las 6 h se situó en valores superiores a 6, lo que permitió el crecimiento de

B. cereus durante la fabricación. A los 2 d, la temperatura de maduración era de 12°C y el pH del queso control descendió hasta valores de 4,92, dando lugar una disminución de más de 3 unidades logarítmicas de los niveles del patógeno en el queso.

Tabla 68. Valores de pH durante la fabricación y maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y *E. coli/B. cereus*

	Leche	6 h	1 d	2 d	15 d	30 d	60 d
Control	6,83	6,45 ^c	5,21 ^a	4,92 ^a	5,07 ^{ab}	5,13 ^b	5,21 ^a
<i>Lc. lactis</i> TAB 24		6,15 ^a	5,16 ^a	4,95 ^a	5,12 ^b	5,10 ^b	5,30 ^{bc}
<i>Lc. lactis</i> TAB 26		6,17 ^a	5,17 ^a	4,90 ^a	5,03 ^a	5,01 ^a	5,22 ^{ab}
<i>Lc. lactis</i> TAB 50		6,21 ^a	5,20 ^a	4,98 ^a	5,13 ^b	5,14 ^b	5,37 ^c
<i>Lc. lactis</i> TAB 57		6,22 ^{ab}	5,22 ^a	5,02 ^a	5,07 ^{ab}	5,12 ^b	5,32 ^c
<i>Ec. faecium</i> TAB 7		6,29 ^b	5,20 ^a	4,98 ^a	5,10 ^a	5,15 ^b	5,36 ^c
<i>Ec. faecalis</i> TAB 52		6,22 ^{ab}	5,24 ^a	5,02 ^a	5,16 ^b	5,14 ^b	5,38 ^c
<i>Ec. faecalis</i> INIA 4		6,20 ^a	5,21 ^a	4,97 ^a	5,10 ^a	5,12 ^b	5,32 ^c

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

Los valores de a_w observados en los quesos están por encima de 0,970 (datos no mostrados) y los valores mínimos necesarios para el desarrollo de *E. coli* y *Bacillus* son de 0,95 y 0,91, respectivamente (Marshall *et al.*, 1971), por lo que este factor no se podría considerar crítico para el desarrollo de estos microorganismos en el queso.

3.4.1.10. Actividad bacteriocina

Se observó la presencia de actividad bacteriocina en los quesos inoculados con los aislados productores de bacteriocinas a lo largo del periodo de maduración (Tabla 69).

3.4.1.11. Calidad organoléptica

Los quesos elaborados con los diferentes cultivos bacteriocinogénicos en combinación con el fermento comercial y sin patógeno, no presentaron defectos de textura, olor, aroma o sabor conforme a los resultados obtenidos de una cata hedónica realizada con cuatro catadores entrenados (datos no mostrados).

Tabla 69. Actividad de las bacteriocinas* durante la maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y *E. coli/B. cereus*

	Bacteriocina	2 d	15 d	30 d	60 d
Control	-	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Sin halo
<i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	11,6	9,8	10,8	15,3
<i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	8,1	5,0	5,0	5,3
<i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	21,0	22,0	22,0	22,0
<i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	11,5	12,0	11,5	6,0
<i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	5,5	5,9	5,5	5,5
<i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	12,0	11,3	12,0	12,0
<i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	9,8	10,5	6,5	8,0

*Expresada como diámetro en mm del halo de inhibición frente a *C. tyrobutyricum* NZ8

3.4.2. BACTERIAS LÁCTICAS PRODUCTORAS DE BACTERIOCINAS Y TRATAMIENTOS DE ALTAS PRESIONES

Se ha estudiado el efecto de la adición de diferentes bacterias lácticas productoras de bacteriocinas como cultivos adjuntos a un fermento comercial, en combinación con la aplicación al principio (2 d) y al final (50 d) de la maduración de distintos tratamientos de altas presiones hidrostáticas (300 MPa/10°C/10 min y 500 MPa/10°C/5 min), sobre la supervivencia de *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli* O157:H7 en queso tipo Hispánico fabricado a partir de leche cruda de vaca. La elaboración y maduración de los quesos se realizó según se describe en el apartado 2.4.4.

3.4.2.1. Inhibición de *L. monocytogenes*

El análisis de varianza reveló el efecto significativo ($P < 0,001$) del cultivo bacteriocinogénico adicionado, el tratamiento con altas presiones aplicado a los 2 d, así como del tiempo de maduración de los quesos sobre los niveles de *L. monocytogenes* (Tabla 70).

El recuento de *L. monocytogenes* en la leche inoculada fue de 4,80 log ufc/ml. A los 3 d, *L. monocytogenes* alcanzó en el queso control unos niveles de 7,03 log ufc/g. Entre los quesos no presurizados, la mayor diferencia con el control se observó en el queso con el productor de nisina A, con un valor 0,97 unidades logarítmicas inferior.

El queso presurizado a los 2 d con 300 MPa/10°C/10 min presentó, a los 3 d, niveles de *L. monocytogenes* 0,90 unidades logarítmicas inferiores a los del queso control. Se observó un efecto inhibitorio sinérgico de la presurización y las bacteriocinas frente a *L. monocytogenes* en los elaborados con los productores de nisina Z, bacteriocina TAB 57

y enterocina AS-48, con diferencias de 3,11, 3,20 y 2,65 unidades logarítmicas respecto del queso control.

Tabla 70. Supervivencia de *L. monocytogenes* (log ufc/g) durante la maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 2 d

Tratamiento	Bacteriocina	3 d	20 d	60 d
Control	-	7,03 ^f	6,70 ^h	5,66 ^f
<i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	6,63 ^f	6,48 ^{gh}	4,98 ^{def}
<i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	6,45 ^f	6,32 ^{fgh}	5,62 ^{df}
<i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	6,06 ^{ef}	5,97 ^{efgh}	5,06 ^{def}
<i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	6,41 ^f	6,26 ^{fgh}	5,26 ^{def}
<i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	6,73 ^f	6,39 ^{fgh}	5,24 ^{def}
<i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	6,45 ^f	6,51 ^{gh}	5,61 ^{ef}
<i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	6,46 ^f	5,35 ^{cdefg}	5,05 ^{def}
P2-300	-	6,13 ^{ef}	5,41 ^{defg}	3,48 ^{cde}
P2-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	5,37 ^{def}	4,80 ^{bcde}	1,81 ^{abc}
P2-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	3,92 ^d	4,54 ^{bcd}	3,86 ^{cdef}
P2-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	5,43 ^{def}	5,24 ^{bcdef}	1,81 ^{abc}
P2-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	3,83 ^{cd}	4,18 ^{bc}	1,00 ^{ab}
P2-300 + <i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	5,35 ^{def}	5,29 ^{bcdefg}	3,41 ^{cd}
P2-300 + <i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	5,21 ^{def}	4,12 ^b	2,77 ^{bc}
P2-300 + <i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	4,38 ^{de}	4,41 ^{bcd}	1,78 ^{abc}
P2-500	-	2,01 ^{bc}	0 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	0,90 ^{ab}	0 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	0,55 ^{ab}	0,05 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	1,81 ^{ab}	0 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	0,65 ^{ab}	0 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	0 ^a	0,05 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	0,90 ^{ab}	0 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

P2-300: Quesos presurizados a los 2 d con 300 MPa/10°C/10 min.

P2-500: Quesos presurizados a los 2 d con 500 MPa/10°C/5 min.

A los 3 d, en los quesos presurizados con 500 MPa/10°C/5 min se observaron las mayores reducciones del patógeno. El queso sin bacteriocina presentó un recuento de *L. monocytogenes* 5,02 unidades logarítmicas inferior al del queso control, mientras que en los quesos fabricados con productores de bacteriocinas y sometidos a 500 MPa se observó un efecto bactericida sinérgico en todos los casos, excepto en el queso con el productor de nisina A, con diferencias entre 6,13 y 7,03 unidades logarítmicas respecto del queso control. En los quesos elaborados con *Ec. faecium* TAB 7 ó *Ec. faecalis* INIA 4 y sometidos a este tratamiento de presión, no se detectó la presencia de *L. monocytogenes* tras el enriquecimiento de 1 g de queso.

A los 20 d, los niveles de *L. monocytogenes* en el queso control, disminuyeron 0,33 unidades logarítmicas respecto de los 3 d. Los quesos con el productor de nisina A y el productor de enterocina AS-48 mostraron las mayores diferencias con el queso control, 0,73 y 1,35 unidades logarítmicas, respectivamente.

Con el tratamiento combinado de 300 MPa/10°C/10 min a los 2 d y enterocina I se observó a los 20 d, un descenso de 1,09 unidades logarítmicas en los niveles de *L. monocytogenes* respecto de los de 3 d. En el resto de quesos presurizados en estas condiciones, se observaron durante este periodo, descensos de entre 0,06 y 0,72 unidades logarítmicas, excepto en los elaborados con el productor de bacteriocina TAB 57, nisina Z ó enterocina AS-48, en los que se constató un aumento del patógeno en 0,35, 0,62 y 0,03 unidades logarítmicas, respectivamente. Este aumento de *L. monocytogenes* podría atribuirse a la recuperación de bacterias con daños subletales después de la presurización. Ponce *et al.* (1998) observaron, en huevo batido tratado con 300 MPa ó 450 MPa/20°C/10 min, un descenso inicial en los niveles de *L. innocua* de 0,84 y 6,63 unidades logarítmicas, respectivamente, y su posterior aumento en 0,62 y 4,93 unidades logarítmicas tras 18 h de almacenamiento a 4°C.

Al final de la maduración, *L. monocytogenes* sobrevivió en el queso control, donde presentó niveles de 5,66 log ufc/g. Los quesos con *Lc. lactis* TAB 24, *Lc. lactis* TAB 50 ó *Ec. faecalis* INIA mostraron diferencias de 0,68, 0,60 y 0,61 unidades logarítmicas en comparación con el control, respectivamente, que fueron menores con el resto de los cultivos bacteriocinogénicos. El efecto inhibitorio de los cultivos productores de bacteriocinas en estas fabricaciones, fue menor, en general, que el observado en las fabricaciones previas realizadas en el presente trabajo.

El tratamiento con 300 MPa a los 2 d, dio lugar a diferencias de 2,18 unidades logarítmicas a los 60 d respecto del control. En este queso los niveles de *L. monocytogenes* descendieron 1,93 unidades logarítmicas desde los 20 d a los 60 d, mientras que el descenso observado durante este mismo periodo de tiempo en el queso control no presurizado, fue de 1,04 unidades logarítmicas. Esta diferencia podría deberse a la presencia en el queso presurizado de células de *L. monocytogenes* con

daños subletales como consecuencia del tratamiento y que muestran una mayor sensibilidad a las condiciones desfavorables del queso (Alpas *et al.*, 2000).

A los 60 d, en los quesos presurizados elaborados con los productores de lacticina 481, nisina A, enterocina I, bacteriocina TAB 57 ó enterocina AS-48 se observó un efecto inhibitorio sinérgico de ambos tratamientos, que condujo a diferencias de 3,85, 3,85, 2,89, 4,66 y 3,88 unidades logarítmicas respecto del control, respectivamente.

En los quesos con el tratamiento de 500 MPa a los 2 d no se observó presencia de *L. monocytogenes* en las muestras de 20 d y de 60 d tras el enriquecimiento de 1 g, excepto en los quesos fabricados con *Lc. lactis* TAB 26 ó *Ec. faecium* TAB 7 en los que se detectó la presencia del patógeno en una de las repeticiones, después del enriquecimiento de la muestra a los 20 d.

En la Tabla 71 se recogen los recuentos de *L. monocytogenes* (log ufc/g) a los 51 y 60 d de maduración, en los quesos presurizados a los 50 d. Los niveles de este patógeno se mostraron significativamente ($P < 0,001$) influidos por el cultivo bacteriocinogénico adicionado, el tratamiento con altas presiones a los 50 d, así como por el tiempo de maduración de los quesos.

A los 51 d, *L. monocytogenes* alcanzó en el queso control niveles de 6,34 log ufc/g. En los quesos no presurizados, se observaron diferencias de 0,27-1,49 unidades logarítmicas respecto del queso control.

En los quesos presurizados a los 50 d con 300 MPa/10°C/10 min o con 500 MPa/10°C/5 min no se detectó a los 51 d *L. monocytogenes* en 1 g de muestra, excepto en los quesos presurizados a 300 MPa sin cultivo bacteriocinogénico y con el productor de nisina A, así como en el queso presurizado a 500 MPa adicionado con el productor de la bacteriocina TAB 7, en los cuales se detectó presencia del patógeno después del enriquecimiento de 1 g de queso en una de las repeticiones.

La aplicación de altas presiones a los 50 d, tanto a 300 MPa como a 500 MPa, dio lugar a reducciones de *L. monocytogenes* mucho más elevadas que cuando se aplicó el tratamiento a los 2 d (Tabla 70). Estas diferencias podrían ser atribuidas a la situación de mayor estrés en que se encontrarían las células a los 50 d de maduración del queso.

A los 60 d, no se detectó *L. monocytogenes* tras el enriquecimiento de 1 g de queso en ninguno de los quesos presurizados a los 50 d.

Tabla 71. Supervivencia de *L. monocytogenes* (log ufc/g) durante la maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 50 d

Tratamiento	Bacteriocina	51 d	60 d
Control	-	6,34 ^b	5,66 ^d
<i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	5,54 ^{ab}	4,98 ^b
<i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	6,07 ^{ab}	5,62 ^{de}
<i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	5,10 ^{ab}	5,06 ^{abc}
<i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	5,37 ^{ab}	5,26 ^{abcd}
<i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	5,82 ^{ab}	5,24 ^{abcd}
<i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	5,76 ^{ab}	5,61 ^{cde}
<i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	4,85 ^b	5,05 ^{ab}
P50-300	-	0,05 ^a	0 ^a
P50-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	0 ^a	0 ^a
P50-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	0 ^a	0 ^a
P50-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	0,05 ^a	0 ^a
P50-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	0 ^a	0 ^a
P50-300 + <i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	0 ^a	0 ^a
P50-300 + <i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	0 ^a	0 ^a
P50-300 + <i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	0 ^a	0 ^a
P50-500	-	0 ^a	0 ^a
P50-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	0 ^a	0 ^a
P50-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	0 ^a	0 ^a
P50-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	0 ^a	0 ^a
P50-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	0 ^a	0 ^a
P50-500 + <i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	0,05 ^a	0 ^a
P50-500 + <i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	0 ^a	0 ^a
P50-500 + <i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

P50-300: Quesos presurizados a los 50 d con 300 MPa/10°C/10 min.

P50-500: Quesos presurizados a los 50 d con 500 MPa/10°C/5 min.

En la figura 4 se recogen los recuentos de *L. monocytogenes* al final de la maduración en los quesos con los distintos fermentos y presurizados a los 2 d y a los 50 d.

En los quesos sin presurizar los niveles más bajos del patógeno se detectaron en los elaborados con los productores de lacticina 481, nisina A y enterocina AS-48, aunque las diferencias respecto del queso control fueron inferiores a 0,7 unidades logarítmicas.

No se observaron diferencias significativas al final de la maduración entre los quesos tratados con 300 MPa/10°C/10 min a los 50 d y los tratados con 500 MPa/10°C/5 min a los 2 d ó 50 d, ya que en todos los casos no se pudo detectar la presencia de *L. monocytogenes* tras el enriquecimiento de 1 g de queso. Estos resultados sugerirían la posibilidad de emplear presiones menores durante un tiempo mayor y minimizar los efectos adversos de la presión en la textura y color de los alimentos conforme a lo señalado por Alpas *et al.* (2000).

La información sobre el efecto de la presurización del queso en *L. monocytogenes* es escasa. Gallot-Lavallee (1998) observó reducciones superiores a 5,6 unidades logarítmicas de *L. monocytogenes* en queso de cabra elaborado a partir de leche cruda inoculada con aproximadamente 10^7 ufc/ml del patógeno, al tratar quesos de 14 d de maduración con 450 ó 500 MPa durante tiempos de 10 y 5 min, respectivamente, sin ningún efecto negativo sobre la calidad organoléptica del queso.

El efecto inhibitorio de las altas presiones sobre los microorganismos patógenos depende de diferentes factores como son el tipo de microorganismo y su estado fisiológico, el tratamiento empleado o las características del alimento. Gervilla *et al.* (1997a) observaron mayor sensibilidad de *L. innocua* a presiones de entre 200 MPa y 500 MP a 2°C y 10°C que a 25°C. Según estos autores, este comportamiento se explicaría por la mayor susceptibilidad a la desnaturalización de algunas proteínas durante la presurización a bajas temperaturas o la mayor rigidez de la membrana celular a bajas temperaturas.

Los constituyentes de la leche, principalmente la grasa, podrían ofrecer a los microorganismos protección frente a los efectos letales de la presurización. El empleo de 5 ciclos en continuo a 300 MPa/25°C (dynamic high pressure) redujo los niveles de *L. monocytogenes* 5,8 unidades logarítmicas en leche cruda, mostrándose más efectivo que el empleo estático de las altas presiones (Vachon *et al.*, 2002). Kheadr *et al.* (2002) consiguieron reducciones de 3-4 unidades logarítmicas de *L. innocua* al tratar leche en continuo, con 200 MPa/25°C en 5 ciclos de 1 min. Posteriormente, fabricaron queso Cheddar con leche presurizada y con leche pasterizada, observando en los quesos fabricados con leche presurizada una mayor retención de humedad y proteína, así como un mayor rendimiento de la leche. Además los quesos se mostraron más firmes, cohesivos y menos quebradizos que los fabricados con leche pasterizada.

En leche UHT sometida a 400 MPa, *L. monocytogenes* se mostró más sensible al tratamiento en su fase logarítmica de crecimiento que en su fase estacionaria. Además las células que habían crecido a 8°C fueron más resistentes al tratamiento que las crecidas a 30°C (McClements *et al.*, 2001).

Nuestros resultados mostraron un incremento del efecto de las altas presiones al ser combinadas con algunos de los productores de bacteriocinas. Se observó un efecto bactericida sinérgico en los quesos tratados a los 2 d con 300 MPa y los productores de bacteriocinas *Lc. lactis* TAB 24, *Lc. lactis* TAB 50, *Lc. lactis* TAB 57, *Ec. faecalis* TAB 52 y *Ec. faecalis* INIA 4, aunque en todos los casos se detectó la presencia de *L. monocytogenes* al final de la maduración.

La aplicación a los 2 d de 500 MPa junto con la adición de *Ec. faecium* TAB 7 ó *Ec. faecalis* INIA 4 dio lugar, a los 3 d, a quesos libres de *L. monocytogenes* en 1 g de muestra. Desde los 20 d y hasta el final de la maduración, no se pudo detectar la presencia del patógeno en muestras de 1 g en la mayoría de quesos presurizados.

Kalchayanand *et al.* (1998) observaron, en agua peptonada inoculada con 10^8 ufc/ml de *L. monocytogenes* Scott A, una reducción de 1,3 unidades logarítmicas del microorganismo al aplicar presiones de 345 MPa/25°C/5 min. El efecto inhibitorio de las altas presiones se incrementó hasta 3,4 unidades logarítmicas al añadir pediocina PA-1 a la muestra.

La nisina evitó la recuperación de *L. innocua* en huevo batido sometido a una presión de 450 MPa/20°C/10 min, no detectándose su presencia tras 30 d a 4°C. Sin embargo, *L. innocua* alcanzó durante ese tiempo en la muestra sin bacteriocina niveles de 6,08 log ufc/ml (Ponce *et al.*, 1998).

En suero lácteo inoculado con 6,4 log *L. innocua*/ml, la combinación de 275 MPa/25°C/30 min y 15000 UA/ml de lacticina 3147 redujo de forma sinérgica los niveles del microorganismo por debajo del límite de detección (Morgan *et al.*, 2000)

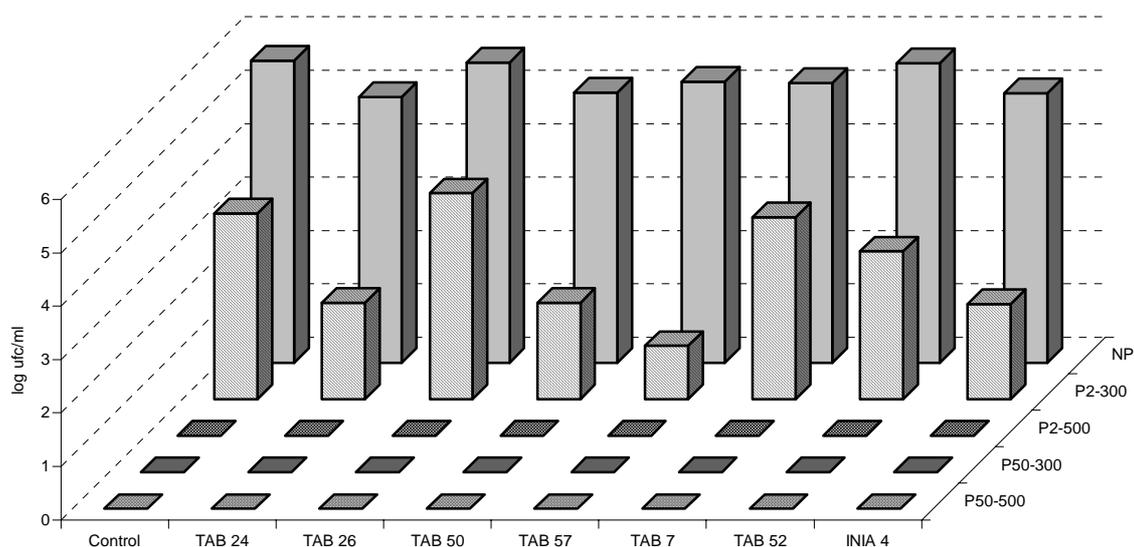


Figura 5. Supervivencia de *L. monocytogenes* (log ufc/g) a los 60 d de maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 2 d y 50 d

NP: No presurizados. **P2-300:** Presurizados a los 2 d con 300 MPa/10°C/10 min. **P2-500:** Presurizados a los 2 d con 500 MPa/10°C/5 min. **P50-300:** Presurizados a los 50 d con 300 MPa/10°C/10 min. **P50-500:** Presurizados a los 50 d con 500 MPa/10°C/5 min.

3.4.2.2. Inhibición de *S. aureus*

El cultivo bacteriocinogénico adicionado, el tratamiento con altas presiones a los 2 d, así como el tiempo de maduración de los quesos, influyeron significativamente ($P < 0,001$) sobre los niveles de *S. aureus* en el queso (Tabla 72).

S. aureus, con un recuento en leche de 4,85 log ufc/ml, alcanzó a los 3 d unos niveles de 6,46 log ufc/g en el queso control. No se observaron diferencias significativas entre los quesos sin presurizar y los quesos tratados con 300 MPa/10°C/10 min a los 2 d. No obstante, en los quesos con productores de bacteriocinas y presurizados en estas condiciones se observaron diferencias en los recuentos del patógeno de entre 0,67 y 1,02 unidades logarítmicas respecto del control, que pusieron de manifiesto con los productores de lacticina 481, TAB 57 ó enterocina AS-48 una ligera sinergia de ambos tratamientos. El queso presurizado pero sin cultivo bacteriocinogénico, presentó unas diferencias en los niveles del patógeno respecto del control de 0,45 unidades logarítmicas.

La aplicación del tratamiento de 500 MPa/10°C/5 min a los 2 d, dio lugar a diferencias significativas ($P < 0,01$) en los niveles de *S. aureus* en los quesos de 3 d. El queso presurizado sin productor de bacteriocina mostró valores 2,43 unidades logarítmicas inferiores a los del control. En los quesos presurizados y con los productores de bacteriocinas se comprobó un efecto inhibitorio sinérgico. Únicamente los quesos con los productores de nisina Z, nisina A o bacteriocina TAB 57, presentaron diferencias significativas ($P < 0,01$) en los niveles del patógeno respecto del queso presurizado sin bacteriocina.

A los 20 d, *S. aureus* alcanzó niveles de 5,84 log ufc/g en el queso control. En los quesos con bacteriocinas se observaron recuentos similares, excepto el queso con el productor de enterocina AS-48, con recuentos 1,76 unidades logarítmicas inferiores a los del queso control.

Los quesos presurizados a los 2 d con 300 MPa/10°C/10 min no presentaron diferencias en los recuentos del patógeno respecto del control, a los 20 d de maduración. Sin embargo, los recuentos en los quesos presurizados y con *Lc. lactis* TAB 57 ó *Ec. faecalis* INIA 4 fueron significativamente diferentes al control, con unas reducciones en los niveles de *S. aureus* de 0,59 y 0,62 unidades logarítmicas, respectivamente.

A los 20 d, no se observó la presencia de *S. aureus* en ninguno de los quesos tratados a los 2 d con 500 MPa/10°C/5 min, tras realizar el enriquecimiento de 1 g de muestra.

Tabla 72. Supervivencia de *S. aureus* (log ufc/g) durante la maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 2 d

Tratamiento	Bacteriocina	3 d	20 d	60 d
Control	-	6,46 ^c	5,84 ^{efg}	5,30 ^c
<i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	6,28 ^c	5,74 ^{efg}	5,14 ^c
<i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	6,07 ^c	5,89 ^{fg}	5,28 ^c
<i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	6,00 ^c	5,95 ^g	5,41 ^c
<i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	6,22 ^c	5,45 ^{cde}	4,74 ^c
<i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	6,32 ^c	5,87 ^{fg}	5,32 ^c
<i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	6,19 ^c	5,81 ^{efg}	4,73 ^c
<i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	6,30 ^c	4,08 ^b	4,49 ^c
P2-300	-	6,01 ^c	5,53 ^{cdef}	2,84 ^b
P2-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	5,50 ^c	5,74 ^{efg}	2,41 ^b
P2-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	5,44 ^c	5,65 ^{defg}	2,67 ^b
P2-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	5,63 ^c	5,66 ^{efg}	2,79 ^b
P2-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	5,51 ^c	5,25 ^{cd}	2,58 ^b
P2-300 + <i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	5,79 ^c	5,88 ^{fg}	2,73 ^b
P2-300 + <i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	5,71 ^c	5,69 ^{efg}	2,58 ^b
P2-300 + <i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	5,50 ^c	5,22 ^c	2,26 ^b
P2-500	-	4,03 ^b	0 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	3,04 ^{ab}	0 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	2,77 ^a	0 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	2,46 ^a	0 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	2,68 ^a	0 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	3,01 ^{ab}	0 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	3,09 ^{ab}	0 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	3,14 ^{ab}	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

P2-300: Quesos presurizados a los 2 d con 300 MPa/10°C/10 min.

P2-500: Quesos presurizados a los 2 d con 500 MPa/10°C/5 min.

Después de 60 d de maduración a 12°C, los valores de *S. aureus* en queso control fueron 5,30 log ufc/g. Las mayores reducciones con bacteriocinas se observaron en los quesos con los productores de bacteriocina TAB 57, enterocina I ó enterocina AS-48, como se había comprobado en las fabricaciones anteriores, que presentaron diferencias de 0,56, 0,57 y 0,81 unidades logarítmicas con respecto al queso control.

En el queso presurizado a 300 MPa a los 2 d y sin productor de bacteriocina, los niveles del patógeno fueron 2,46 unidades logarítmicas inferiores a los del queso control, observándose una importante disminución entre los 20 d y los 60 d, mucho más drástica que en el queso control. Este hecho puede atribuirse a la presencia de células de *S. aureus* con daños subletales como consecuencia del tratamiento con alta presión. Con el tratamiento combinado la mayor reducción se observó en el queso con el productor de enterocina AS-48, con niveles 3,04 unidades logarítmicas inferiores a los del queso control.

En los quesos presurizados a los 2 d con 500 MPa/10°C/5 min continuó sin detectarse el patógeno a los 60 d tras el enriquecimiento de 1 g de muestra.

En un queso modelo Cheddar tratado con 500 Mpa/20°C/20 min se observó un descenso de 3-4 unidades logarítmicas en los niveles de *S. aureus*, y un total de 3 unidades logarítmicas de células con daños subletales (O'Reilly *et al.*, 2000).

La Tabla 73 recoge los recuentos de *S. aureus* de los quesos presurizados a los 50 d. El cultivo bacteriocinogénico adicionado, el tratamiento a los 50 d con altas presiones, así como el tiempo de maduración de los quesos, influyeron significativamente ($P < 0,001$) en los niveles del patógeno.

A los 51 d los niveles de *S. aureus* en el queso control fueron de 5,55 log ufc/g. Los niveles más bajos de patógeno entre los quesos no presurizados se observaron en los adicionados con los productores de bacteriocina TAB 57, enterocina I y enterocina AS-48.

El queso sin cultivo bacteriocinogénico y presurizado a los 50 d con 300 MPa/10°C/10 min presentó unos niveles de patógeno 1,05 unidades logarítmicas inferiores al control a los 51 d. Del grupo de quesos sometidos a este tratamiento de presión, los niveles más bajos de *S. aureus* se observaron en el queso fabricado con el productor de TAB 57. Esta combinación dio lugar a un efecto inhibitorio sinérgico sobre el patógeno que presentó niveles 2,44 unidades logarítmicas inferiores a los del control. En el queso presurizado y con el productor de lacticina 481 también se observó un efecto bactericida sinérgico frente a *S. aureus*, con valores 1,56 unidades logarítmicas inferiores al control a los 51 d.

Tabla 73. Supervivencia de *S. aureus* (log ufc/g) durante la maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 50 d

Tratamiento	Bacteriocina	51 d	60 d
Control	-	5,55 ^h	5,30 ^b
<i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	5,60 ^h	5,14 ^b
<i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	5,53 ^h	5,28 ^b
<i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	5,57 ^h	5,41 ^b
<i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	5,02 ^{gh}	4,74 ^b
<i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	5,49 ^h	5,32 ^b
<i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	5,13 ^{gh}	4,73 ^b
<i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	4,87 ^{fgh}	4,49 ^b
P50-300	-	4,50 ^{efgh}	1,38 ^a
P50-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	3,99 ^{cdefgh}	1,78 ^a
P50-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	4,39 ^{efgh}	1,08 ^a
P50-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	4,28 ^{efgh}	1,57 ^a
P50-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	3,11 ^{bcdefg}	0,93 ^a
P50-300 + <i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	4,68 ^{fgh}	1,62 ^a
P50-300 + <i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	3,98 ^{cdefgh}	0 ^a
P50-300 + <i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	4,19 ^{defgh}	0 ^a
P50-500	-	3,17 ^{bcdefg}	0 ^a
P50-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	1,93 ^{abc}	0 ^a
P50-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	2,32 ^{abcde}	0 ^a
P50-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	2,00 ^{abcd}	0 ^a
P50-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	0,80 ^a	0 ^a
P50-500 + <i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	2,68 ^{abcdef}	0 ^a
P50-500 + <i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	2,44 ^{abcde}	0 ^a
P50-500 + <i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	1,70 ^{ab}	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

P50-300: Quesos presurizados a los 50 d con 300 MPa/10°C/10 min.

P50-500: Quesos presurizados a los 50 d con 500 MPa/10°C/5 min.

El tratamiento con 500 MPa/10°C/5 min a los 50 d dio lugar a los 51 d a unos niveles de *S. aureus* 2,38 unidades logarítmicas inferiores al control. En todos los quesos elaborados con cultivos productores de bacteriocina se manifestó un efecto inhibitorio sinérgico frente al patógeno a los 51 d al ser sometidos a este tratamiento de presión.

Los niveles más bajos de este grupo se obtuvieron con el productor de la bacteriocina TAB 57, con unas diferencias en los recuentos del patógeno de 4,75 unidades logarítmicas respecto del control. En el resto de quesos presurizados con bacteriocinas, las diferencias respecto del control oscilaron entre 2,87 y 3,85 unidades logarítmicas.

Al finalizar el periodo de maduración, en el queso presurizado a los 50 d con 300 MPa, se observó una disminución de 3,12 log unidades logarítmicas respecto al recuento a los 51 d. Con respecto al control de 60 d esta diferencia fue de 3,92 unidades logarítmicas. En los quesos elaborados con el productor de enterocina I o el productor de enterocina AS-48 y sometidos a este tratamiento de presión se registró un efecto bactericida sinérgico que impidió la detección de *S. aureus* en 1 g de queso.

Con la presurización de los quesos a los 50 d con 500 MPa no se detectó *S. aureus* en 1 g de muestra a los 60 d, en ninguno de los casos.

En la Figura 5 se observa el efecto de los distintos tratamientos de altas presiones y el cultivo bacteriocinogénico sobre los niveles de *S. aureus* en el queso al final de la maduración.

Las diferencias en los recuentos de los quesos con bacteriocinas fueron inferiores a una unidad logarítmica respecto al control sin bacteriocina.

El queso presurizado a los 50 d con 300 MPa/10°C/10 min presentó unos niveles de *S. aureus* 1,46 unidades logarítmicas inferiores al presurizado a los 2 d.

La aplicación de 500 MPa dio lugar en todos los casos a ausencia de *S. aureus* en 1 g de muestra. Además, con la aplicación del tratamiento a los 2 d no se detectó *S. aureus* desde los 20 d. Con 300 MPa, la inactivación total sólo se consiguió con la aplicación combinada de presión a los 50 d y los productores de enterocina I o enterocina AS-48.

S. aureus se considera uno de los microorganismos no esporulados más resistente a las altas presiones. No obstante, la capacidad de las altas presiones para inactivar a este patógeno varía en función de la temperatura, el medio y la cepa. La inactivación de *S. aureus* aumenta linealmente con la presión aplicada y el tiempo de exposición (Patterson *et al.*, 1995; Alpas *et al.*, 1999; Gervilla *et al.*, 1999a).

O'Reilly *et al.* (2000) observaron que el efecto inhibitorio frente a *S. aureus* a 20°C fue superior al incrementar la presión de 300 a 400 MPa que al prolongar el tiempo de presurización. Por otra parte, describieron una menor inactivación de *S. aureus* a 10°C que a 30°C ó 20°C en un modelo de queso Cheddar a presiones comprendidas entre 50 y 800 MPa. Las mayores reducciones de este microorganismo se obtuvieron con 600 MPa/20°C/20 min.

Patterson y Kilpatrick (1998) comprobaron reducciones en los niveles de *S. aureus* de 6 unidades logarítmicas en leche de vaca UHT tratada con 500 MPa/50°C/15 min, mientras que Gervilla *et al.* (1999a) al aplicar el mismo tratamiento en leche de oveja, observaron reducciones superiores a 7 unidades logarítmicas tanto a 50°C como a 10°C y 25°C.

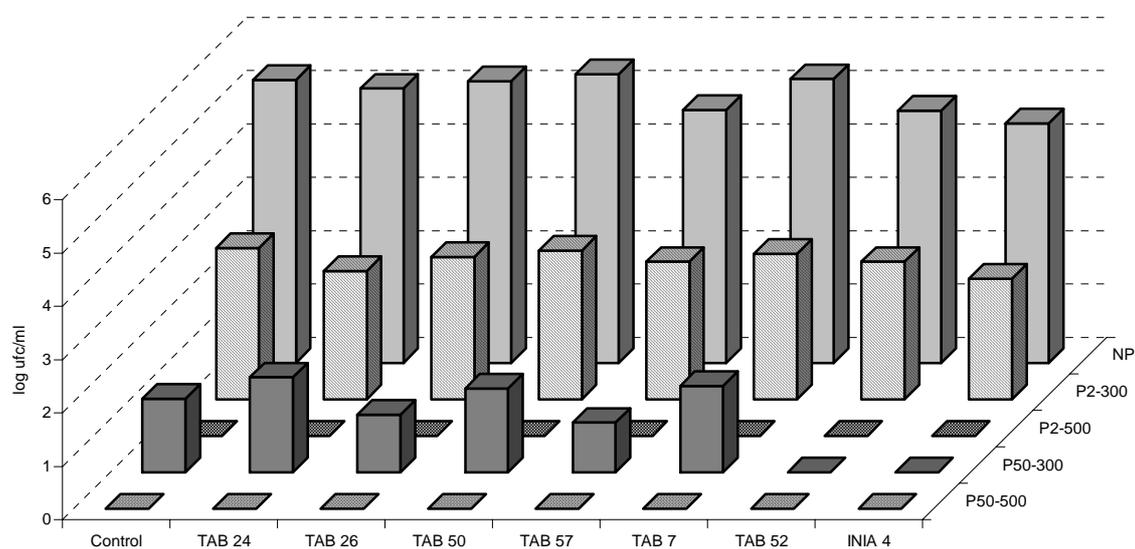


Figura 6. Supervivencia de *S. aureus* (log ufc/g) a los 60d de maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 2 d y 50 d

NP: No presurizados. **P2-300:** Presurizados a los 2 d con 300 MPa/10°C/10 min. **P2-500:** Presurizados a los 2 d con 500 MPa/10°C/5 min. **P50-300:** Presurizados a los 50 d con 300 MPa/10°C/10 min. **P50-500:** Presurizados a los 50 d con 500 MPa/10°C/5 min.

El incremento de la actividad inhibitoria frente a *S. aureus* al aplicar altas presiones en combinación con bacteriocinas también ha sido descrito por otros autores.

Morgan *et al.* (2000) observaron un efecto inhibitorio sinérgico frente a *S. aureus* al aplicar presiones comprendidas entre 150 y 275 MPa/25°C/30 min y lacticina 3147 en leche desnatada. La mayor reducción del patógeno, más de 6 unidades logarítmicas, se obtuvo al combinar 250 MPa/25°C/30 min con 10.000 UA/ml de la bacteriocina.

Al combinar un tratamiento de 400 MPa/20°C/15 min con 100 UI/ml de nisina se incrementó en una unidad logarítmica el efecto inhibitorio de la presurización frente a *S. aureus* en tampón fosfato pH 7 (Masschalck *et al.*, 2001a).

El empleo de 345 MPa/25°C/5 min redujo los niveles de *S. aureus* en 6,7 unidades logarítmicas en agua peptonada. La adición de pediocina PA-1 a la muestra incrementó esta reducción en 1,7 unidades logarítmicas (Kalchayanand *et al.*, 1998).

3.4.2.3. Inhibición de *E. coli* O157:H7

Los niveles de *E. coli* O157:H7 resultaron influidos significativamente ($P < 0,001$) por el cultivo bacteriocinogénico adicionado, el tratamiento con altas presiones aplicado a los 2 d, así como por el tiempo de maduración de los quesos (Tabla 74).

El recuento de *E. coli* O157:H7 en la leche inoculada fue de 4,85 log ufc/ml y a los 3 d alcanzó 6,80 log ufc/g en el queso control. No se observaron diferencias significativas entre el queso control y los quesos fabricados con cultivos bacteriocinogénicos.

A los 3 d, los recuentos en el queso sin productor de bacteriocina y presurizado a los 2 d con 300 MPa/10°C/10 min fueron 1,3 unidades logarítmicas inferiores a los del queso control, mientras que en los quesos con cultivos bacteriocinogénicos y sometidos a este mismo tratamiento se observó un efecto inhibitorio sinérgico. Los niveles más bajos en los quesos con el tratamiento combinado se registraron en el queso con *Ec. faecium* TAB 7, que presentó diferencias de 4,38 y 3,08 unidades logarítmicas con el queso control y el queso sin cultivo bacteriocinogénico sometido a 300 MPa a los 2 d, respectivamente. En el resto de quesos con cultivos bacteriocinogénicos y presurizados en estas condiciones las diferencias fueron de 2,02-3,17 unidades logarítmicas respecto del queso control.

La aplicación a los 2 d de 500 MPa/10°C/5 min redujo los niveles de *E. coli* del queso sin cultivo bacteriocinogénico en 3,73 unidades logarítmicas respecto del control a los 3 d. En los quesos presurizados a 500 MPa con los productores de lacticina 481, nisina Z, TAB 57, TAB 7, enterocina I ó enterocina AS-48 se observó un efecto bactericida sinérgico frente a *E. coli* O157:H7, que no se detectó tras el enriquecimiento de 1 g de queso desde los 3 d y hasta el final de la maduración. A los 20 d no se observó su presencia tras el enriquecimiento de 1 g de queso en ninguno de ellos, y tampoco se detectó a los 60 d.

A los 20 d, se observó un descenso en los niveles del patógeno de 0,58 unidades logarítmicas en el queso control. El queso fabricado con el productor de enterocina AS-48 mostró los niveles más bajos de *E. coli* O157:H7 entre los quesos sin presurizar, que fueron 1,20 unidades logarítmicas inferiores a los del queso control.

Los niveles del patógeno descendieron en todos los casos a los 20 d en los quesos presurizados a los 2 d a 300 MPa/10°C/10 min, excepto en el queso con *Ec. faecium* TAB 7, en el que se observó un aumento de la población del patógeno que dio lugar a niveles similares al del resto de quesos con cultivos bacteriocinogénicos. Hugas *et al.* (2001) observaron en jamón cocido homogeneizado una mayor disminución inicial de los niveles de *E. coli* al ser presurizado a 400 MPa/17°C/10 min con las enterocinas A y B que con sakacina K, pediocina PA-1 o en ausencia de bacteriocina, aunque en los días

siguientes se produjo una rápida recuperación del microorganismo, que dio lugar a niveles de *E. coli* similares en todas las muestras.

Tabla 74. Supervivencia de *E. coli* O157:H7 (log ufc/g) durante la maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 2 d

Tratamiento	Bacteriocina	3 d	20 d	60 d
Control	-	6,80 ^h	6,22 ^e	5,11 ^e
<i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	6,29 ^{gh}	5,63 ^{cde}	4,66 ^{de}
<i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	6,31 ^{gh}	6,11 ^e	4,84 ^{de}
<i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	6,06 ^{fgh}	5,58 ^{cde}	4,66 ^{de}
<i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	6,25 ^{gh}	5,89 ^{de}	4,59 ^{de}
<i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	6,41 ^{gh}	5,34 ^{bcde}	4,25 ^{de}
<i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	6,44 ^h	6,21 ^e	5,10 ^e
<i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	6,44 ^h	5,02 ^{bcde}	5,15 ^e
P2-300	-	5,50 ^{efgh}	4,58 ^{bcde}	3,18 ^{cde}
P2-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	3,63 ^{bcde}	3,63 ^{bc}	1,88 ^{abc}
P2-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	3,83 ^{bcde}	3,60 ^{bc}	2,96 ^{bcd}
P2-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	4,23 ^{cdefg}	4,00 ^{bcd}	1,81 ^{abc}
P2-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	4,04 ^{bcdef}	3,43 ^b	0,90 ^{ab}
P2-300 + <i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	2,42 ^{bc}	3,98 ^{bcd}	2,79 ^{bcd}
P2-300 + <i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	4,78 ^{defgh}	4,34 ^{bcde}	2,94 ^{bcd}
P2-300 + <i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	3,97 ^{bcdef}	3,88 ^{bcd}	1,94 ^{abc}
P2-500	-	3,07 ^{bcd}	0 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	0 ^a	0 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	0 ^a	0 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	1,92 ^{ab}	0 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	0 ^a	0 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	0 ^a	0 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	0 ^a	0 ^a	0 ^a
P2-500 + <i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

P2-300: Quesos presurizados a los 2 d con 300 MPa/10°C/10 min.

P2-500: Quesos presurizados a los 2 d con 500 MPa/10°C/5 min.

E. coli O157:H7 sobrevivió en el queso control y alcanzó valores de 5,11 log ufc/g al final de la maduración. Las mayores reducciones del patógeno entre los quesos no presurizados, se obtuvieron con el productor de la bacteriocina TAB 7, con diferencias de 0,86 unidades logarítmicas, respecto al queso control a los 60 d.

En el queso sin cultivo bacteriocinogénico y sometido a los 2 d a 300 MPa, las diferencias a los 60 d fueron de 1,93 unidades logarítmicas respecto del queso control. La combinación de dicho tratamiento con los productores de lacticina 481, nisina A, bacteriocina TAB 57 ó enterocina AS-48 presentó un efecto inhibitorio sinérgico con diferencias respecto al queso control de 3,23, 3,30, 4,21 y 3,17 unidades logarítmicas, respectivamente.

En la Tabla 75 se recogen los recuentos de *E. coli* O157:H7 en los quesos presurizados a los 50 d de maduración. Los niveles de *E. coli* se mostraron significativamente ($P < 0,001$) influidos por el cultivo bacteriocinogénico adicionado, el tratamiento a los 50 d con altas presiones, así como por el tiempo de maduración de los quesos.

A los 51 d, no se observaron diferencias significativas entre los quesos con cultivos bacteriocinogénicos y el queso control, que presentó niveles del patógeno de 5,82 log ufc/g.

La presurización de los quesos a los 50 d, tanto con 300 MPa como con 500 MPa, condujo a los 51 d a reducciones de *E. coli* O157:H7 mucho más elevadas que las observadas al aplicar los mismos tratamientos a los 2 d. Estas diferencias podrían ser atribuidas, como se ha comentado anteriormente, a la mayor situación de estrés en que se encontrarían las células en la matriz del queso a los 50 d de maduración.

El queso presurizado a los 50 d con 300 MPa presentó a los 51 d unas diferencias en los niveles de *E. coli* de 3,78 unidades logarítmicas respecto del control. En los quesos con los cultivos bacteriocinogénicos, la presurización dio lugar a un efecto inhibitorio sinérgico excepto en el queso con *Ec. faecium* TAB 7. No se pudo detectar la presencia del patógeno en 1 g de muestra en el queso presurizado con el productor de enterocina AS-48, mientras que en los elaborados con los productores de lacticina 481, nisina Z, nisina A o enterocina I el enriquecimiento dio resultado positivo en una de las repeticiones, lo que puso de manifiesto la presencia del patógeno a niveles muy bajos.

A los 60 d, no se detectó la presencia de *E. coli* O157:H7 en 1 g de muestra en los quesos presurizados a los 50 d a 300 MPa con los productores de nisina A, bacteriocina TAB 57, enterocina I ó enterocina AS-48, mientras que en el resto de quesos sometidos a este tratamiento de presión sí se detectó la presencia del patógeno tras el enriquecimiento de 1 g de muestra.

El tratamiento con 500 MPa a los 50 d inhibió completamente a *E. coli* O157:H7, que no se detectó tras el enriquecimiento de 1 g de muestra en ninguno de los quesos, desde los 51 d hasta el final de la maduración.

Tabla 75. Supervivencia de *E. coli* O157:H7 (log ufc/g) durante la maduración de queso tipo Hispánico elaborado con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 50 d

Tratamiento	Bacteriocina	51 d	60 d
Control	-	5,82 ^c	5,11 ^{de}
<i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	5,40 ^c	4,66 ^c
<i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	5,69 ^c	4,84 ^{cd}
<i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	5,56 ^c	4,66 ^c
<i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	5,50 ^c	4,59 ^c
<i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	5,40 ^c	4,25 ^b
<i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	5,92 ^c	5,10 ^{de}
<i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	5,51 ^c	5,15 ^e
P50-300	-	2,04 ^b	0,10 ^a
P50-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	0,05 ^a	0,05 ^a
P50-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	0,05 ^a	0,05 ^a
P50-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	0,05 ^a	0 ^a
P50-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	0,55 ^a	0 ^a
P50-300 + <i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	1,88 ^b	0,05 ^a
P50-300 + <i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	0,05 ^a	0 ^a
P50-300 + <i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	0 ^a	0 ^a
P50-500	-	0 ^a	0 ^a
P50-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	0 ^a	0 ^a
P50-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	0 ^a	0 ^a
P50-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	0 ^a	0 ^a
P50-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	0 ^a	0 ^a
P50-500 + <i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	0 ^a	0 ^a
P50-500 + <i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	0 ^a	0 ^a
P50-500 + <i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	0 ^a	0 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

P50-300: Quesos presurizados a los 50 d con 300 MPa/10°C/10 min.

P50-500: Quesos presurizados a los 50 d con 500 MPa/10°C/5 min.

En la Figura 6 se recogen los recuentos de *E. coli* O157:H7 al final de la maduración. Los niveles de *E. coli* de los quesos a los 60 d se mostraron significativamente ($P < 0,001$) influidos por el cultivo bacteriocinogénico adicionado y el tratamiento con altas presiones.

Mediante el empleo individual de cultivos bacteriocinogénicos la población de *E. coli* O157:H7 presentó en todos los casos niveles entre 5,15 y 4,25 log ufc/g al final de la maduración, siendo esta cifra en el queso control 5,11 log ufc/g.

La presurización a 500 MPa, tanto a los 2 d como a 50 d, así como la aplicación a los 50 d de presiones de 300 MPa en combinación con los productores de nisina A, bacteriocina TAB 57, enterocina I ó enterocina AS-48 inhibieron completamente a *E. coli* O157:H7. Los quesos presurizados a los 2 d con 500 MPa en combinación con los cultivos bacteriocinogénicos, excepto *Lc. lactis* TAB 50, dieron lugar a quesos sin *E. coli* O157:H7 en 1 g de muestra desde el tercer día y hasta el final de la maduración. En los quesos presurizados con 300 MPa a los 2 d en combinación con el productor de bacteriocina TAB 57 se comprobó un efecto bactericida sinérgico que dio lugar a recuentos inferiores a 1 log *E. coli*/g.

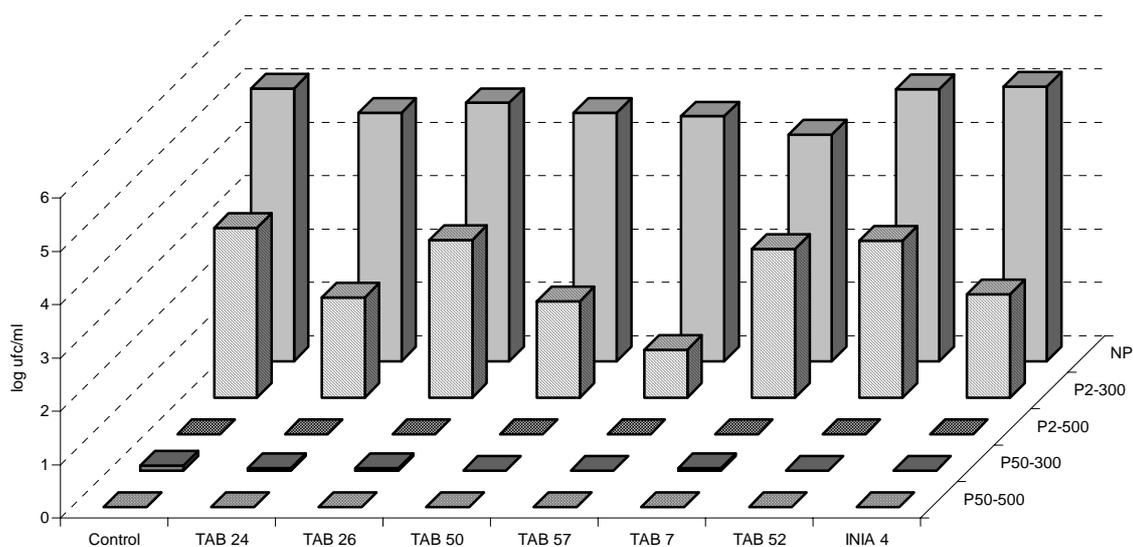


Figura 7. Supervivencia de *E. coli* O157:H7 (log ufc/g) a los 60d de maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 2 d y 50 d

NP: No presurizados. **P2-300:** Presurizados a los 2 d con 300 MPa/10°C/10 min. **P2-500:** Presurizados a los 2 d con 500 MPa/10°C/5 min. **P50-300:** Presurizados a los 50 d con 300 MPa/10°C/10 min. **P50-500:** Presurizados a los 50 d con 500 MPa/10°C/5 min.

En leche de oveja tratada con 300 MPa/10°C/15 min Gervilla *et al.* (1999b) obtuvieron reducciones de *E. coli* de 2 unidades logarítmicas. Vachon *et al.* (2002) observaron reducciones de *E. coli* O157:H7 de 8,3 log ufc/ml en leche cruda sometida a 5 ciclos en continuo de 200 MPa/25°C.

En queso fresco de cabra con 10^6 ufc/ml presurizado con 450 MPa/5 min a 2°C, 10°C ó 25°C, *E. coli* resultó completamente inhibido. Al reducir la presión a 400 MPa/5 min esta misma inhibición se consiguió únicamente a 2°C y 10°C (Capellas *et al.*, 1996).

En un queso modelo Cheddar inoculado con 10^7 ufc/ml de *E. coli* se observaron reducciones de 5 unidades logarítmicas al aplicar 400 MPa/30°C/20 min y de más de 6 unidades logarítmicas al aplicar 500 MPa/20°C/20 min (O'Reilly *et al.*, 2000).

De acuerdo con diversos autores, la grasa (Gervilla *et al.*, 1999b) o el calcio (Hauben *et al.*, 1998) de la leche, pueden disminuir el efecto de las altas presiones frente a *E. coli*.

Por otra parte, los tratamientos con altas presiones podrían provocar daños en la membrana celular de *E. coli* (Pagán y Mackey, 2000) y sensibilizarlo a la acción de las bacteriocinas (Kalchayanand *et al.*, 1994; Hauben *et al.*, 1996).

Cuando se añadió nisina, Masschalck *et al.*, (2001a) observaron un incremento en la actividad inhibitoria del tratamiento de 300 MPa/20°C/15 min sobre *E. coli* O157:H7 en tampón fosfato de una unidad logarítmica. En agua peptonada, el efecto inhibitorio del tratamiento 345 MPa/25°C/5 min aumentó en 0,6 unidades logarítmicas en presencia de pediocina PA-1 (Kalchayanand *et al.*, 1998).

En huevo líquido mantenido a 4°C durante 15 d, Ponce *et al.* (1998) observaron reducciones de *E. coli* una unidad logarítmica superiores con nisina y tratamientos de 300 ó 450 MPa/20°C/10 min respecto de los mismos tratamientos sin bacteriocina.

En cuanto a la temperatura del tratamiento, Ter Steeg *et al.* (1999) obtuvieron mayores reducciones de *E. coli* en BHI al presurizar las muestras con 200 MPa/10 min en combinación con nisina a 10°C que con los tratamientos a 25°C ó 40°C. El empleo de 3 ciclos de 550 MPa/20°/10 min junto con nisina en leche desnatada, redujo los niveles de *E. coli* en 8 unidades logarítmicas. Este efecto inhibitorio sinérgico fue de 5 unidades logarítmicas cuando el tratamiento de presión se aplicó en una sola vez (García-Graells *et al.*, 1999).

3.4.2.4. pH

El análisis de varianza reveló la influencia significativa ($P < 0,001$) del cultivo bacteriocinogénico adicionado, el tratamiento de altas presiones y el momento de su aplicación, y el tiempo de maduración de los quesos sobre los valores de pH del queso (Tablas 76 y 77).

Tabla 76. Valores de pH durante la maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 2 d

Tratamiento	3 d	20 d	60 d
Control	5,07 ^{abc}	5,04 ^{abc}	5,22 ^{abcdef}
<i>Lc. lactis</i> TAB 24	5,04 ^{ab}	5,04 ^{abc}	5,25 ^{bcdef}
<i>Lc. lactis</i> TAB 26	5,08 ^{abcd}	5,04 ^{abc}	5,24 ^{abcdef}
<i>Lc. lactis</i> TAB 50	5,08 ^{abcd}	5,01 ^a	5,22 ^{abcdef}
<i>Lc. lactis</i> TAB 57	5,09 ^{abcde}	5,05 ^{abc}	5,28 ^{bcdef}
<i>Ec. faecium</i> TAB 7	5,00 ^a	5,03 ^{ab}	5,23 ^{abcdef}
<i>Ec. faecalis</i> TAB 52	5,10 ^{abcdef}	5,12 ^{bcd}	5,24 ^{abcdef}
<i>Ec. faecalis</i> INIA 4	5,07 ^{abc}	5,06 ^{abc}	5,15 ^{abc}
P2-300	5,15 ^{abcdefg}	5,17 ^{de}	5,34 ^{ef}
P2-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 24	5,16 ^{bcdefg}	5,20 ^{def}	5,30 ^{def}
P2-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 26	5,21 ^{cdefg}	5,28 ^{fghi}	5,31 ^{def}
P2-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 50	5,18 ^{bcdefg}	5,32 ^{ghi}	5,31 ^{def}
P2-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 57	5,20 ^{cdefg}	5,26 ^{efgh}	5,35 ^f
P2-300 + <i>Ec. faecium</i> TAB 7	5,17 ^{bcdefg}	5,18 ^{de}	5,30 ^{def}
P2-300 + <i>Ec. faecalis</i> TAB 52	5,20 ^{cdefg}	5,35 ^{hi}	5,26 ^{bcdef}
P2-300 + <i>Ec. faecalis</i> INIA 4	5,17 ^{bcdefg}	5,29 ^{ghi}	5,20 ^{abcd}
P2-500	5,23 ^{defg}	5,13 ^{dc}	5,09 ^a
P2-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 24	5,25 ^{fg}	5,13 ^{cd}	5,21 ^{abcde}
P2-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 26	5,27 ^g	5,27 ^{fghi}	5,26 ^{bcdef}
P2-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 50	5,23 ^{defg}	5,25 ^{efgh}	5,23 ^{abcdef}
P2-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 57	5,24 ^{efg}	5,24 ^{efg}	5,29 ^{bcdef}
P2-500 + <i>Ec. faecium</i> TAB 7	5,23 ^{defg}	5,12 ^{bcd}	5,15 ^{abc}
P2-500 + <i>Ec. faecalis</i> TAB 52	5,27 ^g	5,33 ^{hi}	5,34 ^{ef}
P2-500 + <i>Ec. faecalis</i> INIA 4	5,22 ^{cdefg}	5,24 ^{efgh}	5,27 ^{bcdef}

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

P2-300: Quesos presurizados a los 2 d con 300 MPa/10°C/10 min.

P2-500: Quesos presurizados a los 2 d con 500 MPa/10°C/5 min.

Tabla 77. Valores de pH durante la maduración de quesos elaborados con distintos fermentos y sometidos a altas presiones a los 50 d

Tratamiento	51 d	60 d
Control	5,16 ^{gh}	5,22 ^{ab}
<i>Lc. lactis</i> TAB 24	5,09 ^{def}	5,25 ^{ab}
<i>Lc. lactis</i> TAB 26	5,13 ^{fgh}	5,24 ^{ab}
<i>Lc. lactis</i> TAB 50	5,13 ^{fgh}	5,22 ^{ab}
<i>Lc. lactis</i> TAB 57	5,14 ^{gh}	5,28 ^b
<i>Ec. faecium</i> TAB 7	5,09 ^{def}	5,23 ^{ab}
<i>Ec. faecalis</i> TAB 52	5,09 ^{def}	5,24 ^{ab}
<i>Ec. faecalis</i> INIA 4	5,13 ^{fgh}	5,15 ^{ab}
P50-300	5,10 ^{efgh}	5,22 ^{ab}
P50-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 24	5,01 ^{ab}	5,17 ^{ab}
P50-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 26	5,07 ^{de}	5,21 ^{ab}
P50-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 50	4,99 ^{ab}	5,18 ^{ab}
P50-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 57	4,98 ^a	5,20 ^{ab}
P50-300 + <i>Ec. faecium</i> TAB 7	5,07 ^{de}	5,21 ^{ab}
P50-300 + <i>Ec. faecalis</i> TAB 52	5,02 ^{abc}	5,20 ^{ab}
P50-300 + <i>Ec. faecalis</i> INIA 4	4,97 ^a	5,14 ^{ab}
P50-500	5,10 ^{efgh}	5,28 ^b
P50-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 24	5,04 ^{bcd}	5,21 ^{ab}
P50-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 26	5,09 ^{def}	5,21 ^{ab}
P50-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 50	4,99 ^{ab}	5,17 ^{ab}
P50-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 57	4,99 ^{ab}	5,25 ^{ab}
P50-500 + <i>Ec. faecium</i> TAB 7	5,07 ^{de}	5,24 ^{ab}
P50-500 + <i>Ec. faecalis</i> TAB 52	5,02 ^{abc}	5,23 ^{ab}
P50-500 + <i>Ec. faecalis</i> INIA 4	4,96 ^a	5,12 ^a

Medias de la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,01$)

P50-300: Quesos presurizados a los 50 d con 300 MPa/10°C/10 min.

P50-500: Quesos presurizados a los 50 d con 500 MPa/10°C/5 min.

El pH de los quesos sometidos a altas presiones fue inferior a los 51 d que a los 3 d, lo que coincide con una mayor efectividad frente a los patógenos de los tratamientos de altas presiones a los 50 d respecto de los 2 d. Además, los quesos sin presurizar

presentaron unos valores de pH muy similares a los 3 d y los 51, lo que sugiere que la disminución del pH se produce durante el tratamiento de presurización.

Al final de la maduración la mayor diferencia de pH entre todos los quesos fue de 0,22 unidades.

Alpas *et al.* (2000) observaron como con tratamientos con altas presiones aumentó la inhibición de *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli* O157:H7 en presencia de ácido láctico a pH 4,5 en comparación con un pH de 6,5. En queso Cheddar, la aplicación de 200 MPa/20°C/20 min dio lugar a reducciones de *E. coli* 2 unidades logarítmicas superiores a las obtenidas en un queso modelo, que atribuyeron al pH ácido del queso (O'Reilly *et al.* 2000).

3.4.2.5. Actividad bacteriocina

Se detectó actividad bacteriocina en todos los quesos inoculados con los cultivos productores de bacteriocinas durante todo el periodo de maduración, tanto en los quesos no presurizados como en los presurizados a 300 MPa (Tabla 78). Como se ha comentado anteriormente, la presencia de esta actividad en los quesos indicaría la capacidad de los cultivos bacteriocinogénicos de crecer en competición con la flora nativa de la leche durante la fabricación y maduración del queso.

En los quesos presurizados a los 2 d con 500 MPa no se detectó dicha actividad ni a los 3 d ni a los 20 d, excepto con los productores de nisina A y Z a los 3 d. Sin embargo, a los 60 d todos los quesos elaborados con cultivos bacteriocinogénicos presentaron actividad bacteriocina. Estos resultados sugieren una pérdida de actividad de las bacteriocinas como consecuencia del tratamiento a los 2 d con 500 MPa/10°C/5 min. A los 60 d, los microorganismos bacteriocinogénicos habrían podido recuperarse y producir una cantidad de bacteriocina suficiente para permitir su detección en el queso.

En los quesos presurizados a los 50 d con 500 MPa no se detectó actividad bacteriocina a los 51 y 60 d en presencia de los productores de las bacteriocinas lacticina 481 ó TAB 7, mientras que sí se detectó en el resto.

Morgan *et al.* (2000) observaron un aumento en la actividad de la lacticina 3147 al ser sometida a presiones superiores a 400 MPa/25°C/30 min. En cambio, con la enterocina 1146 y la pediocina PA-1 no se observó este tipo de efecto.

La elaboración de queso de leche cruda es una práctica frecuente en numerosos países europeos y en España representa una parte importante de la producción quesera, que en su mayoría se corresponde a quesos con Denominación de Origen. Además, las superiores características organolépticas de los quesos de leche cruda han sido puestas de manifiesto por diversos autores (Gaya *et al.*, 1990; Grappin y Beuvier, 1997). El uso de las altas presiones junto con el empleo de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas como cultivo iniciador o como adjunto en la elaboración del queso se presenta como una alternativa para eliminar la presencia potencial de dichos patógenos sin alterar las características organolépticas.

Tabla 78. Actividad bacteriocina* a lo largo de la maduración de queso tipo Hispánico elaborado con distintos fermentos

Tratamiento	Bacteriocina	3 d	20 d	51 d	60 d
Control	-	0	0	0	0
<i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	7,8	7,0	7,0	8,4
<i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	9,5	7,0	9,5	7,5
<i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	15,0	15,0	18,5	16,5
<i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	6,3	5,0	7,0	8,1
<i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	8,3	7,0	6,5	7,0
<i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	16,0	16,5	14,3	9,8
<i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	8,5	9,0	9,3	7,3
P2-300	-	0	0	-	0
P2-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	8,5	5,0	-	8,0
P2-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	6,5	0,7	-	8,0
P2-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	9,3	15,5	-	7,0
P2-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	5,0	5,0	-	8,0
P2-300 + <i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	7,3	0,7	-	8,0
P2-300 + <i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	15,8	17,5	-	7,0
P2-300 + <i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	10,8	11,5	-	10,0
P50-300	-	-	-	0	0
P50-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	-	-	7,0	7,0
P50-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	-	-	6,5	6,5
P50-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	-	-	6,5	7,1
P50-300 + <i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	-	-	6,0	7,0
P50-300 + <i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	-	-	6,5	7,0
P50-300 + <i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	-	-	13,5	7,6
P50-300 + <i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	-	-	8,8	5,8
P2-500	-	0	0	-	0
P2-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	0	0	-	6,0
P2-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	10	0	-	6,5
P2-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	7,5	0	-	7,5
P2-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	0	0	-	6,0
P2-500 + <i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	0	0	-	6,5
P2-500 + <i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	0	0	-	6,0
P2-500 + <i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	0	0	-	7,0
P50-500	-	-	-	0	0
P50-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 24	Lacticina 481	-	-	0	0
P50-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	-	-	7,0	5,0
P50-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 50	Nisina A	-	-	7,0	6,0
P50-500 + <i>Lc. lactis</i> TAB 57	TAB 57	-	-	6,0	6,0
P50-500 + <i>Ec. faecium</i> TAB 7	TAB 7	-	-	0	0
P50-500 + <i>Ec. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	-	-	6,0	6,0
P50-500 + <i>Ec. faecalis</i> INIA 4	Enterocina AS-48	-	-	6,0	6,0

*Expresada como diámetro en mm del halo de inhibición frente a *C. tyrobutyricum* NZ8

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se han extraído las siguientes conclusiones:

1. La producción de reuterina se confirmó en 28 aislados de heces de cerdo. Seis aislados seleccionados se identificaron como *Lb. reuteri* por técnicas convencionales y PCR y se confirmó la presencia del gen de la glicerol deshidratasa. La producción y purificación de la reuterina se realizó a partir del aislado *Lb. reuteri* PRO 137.
2. La combinación de nisina con enterocina AS-48 dio lugar a un efecto inhibitorio superior al de las bacteriocinas aplicadas individualmente sobre *L. monocytogenes* en leche a 37°C. La aplicación de las bacteriocinas individualmente o en combinación no inhibió a ninguno de los patógenos Gram-negativos estudiados.
3. Con el sistema LP en combinación con nisina o con enterocina AS-48 se observó un potente efecto sinérgico frente a *L. monocytogenes* en leche a 37°C, consiguiéndose reducciones superiores a 8 unidades logarítmicas. A temperaturas de refrigeración con la combinación sistema LP-nisina no se detectó *L. monocytogenes* a partir de los 3-5 d.
4. La aplicación de citrato en combinación con nisina no dio lugar a mayores inhibiciones que las detectadas con citrato individualmente sobre los patógenos Gram-negativos en leche refrigerada. El tratamiento sistema LP-citrato mostró un efecto inhibitorio sinérgico frente a *E. coli* O157:H7 y *Sal. choleraesuis*. Con el sistema LP aplicado individualmente se comprobó una inhibición considerable de *C. jejuni* y *A. hydrophila* que se incrementó en combinación con nisina. El tratamiento más eficaz frente a *Y. enterocolítica* fue el sistema LP aplicado individualmente.
5. La reuterina mostró un efecto bactericida frente a todos los patógenos investigados excepto frente a *L. monocytogenes*, con un efecto bacteriostático. La combinación con nisina, lacticina 481 o enterocina AS-48 inhibió completamente a *L. monocytogenes* en 24 h a 37°C, así como con la combinación con nisina en leche refrigerada. La aplicación con bacteriocinas no incrementó el efecto bactericida de la reuterina frente a los patógenos Gram-negativos. Con el sistema LP-reuterina se confirmó la inhibición completa de todos los patógenos Gram-negativos en leche refrigerada, excepto *E. coli* O157:H7 que presentó valores inferiores a 10 ufc/ml.

6. En cuajadas mantenidas a 10°C durante 12 d, el tratamiento sistema LP-nisina inhibió totalmente la población de *L. monocytogenes*. La combinación sistema LP-reuterina-nisina permitió el control de los niveles de *S. aureus* a lo largo del periodo de refrigeración. La combinación sistema LP-reuterina dio lugar a cuajadas libres de *E. coli* O157:H7, *Sal. choleraesuis* y *A. hydrophila* durante todo el periodo de refrigeración a 10°C.
7. En queso elaborado a partir de leche cruda se confirmó la inhibición de *L. monocytogenes* por diversos productores de bacteriocinas utilizados como adjuntos al fermento comercial, con una diferencia de aproximadamente 3 unidades logarítmicas respecto del control en los quesos elaborados con el productor de enterocina AS-48. Frente a *S. aureus* el mayor efecto inhibitorio de los cultivos adjuntos se observó con los productores de bacteriocina TAB 57, enterocina I y enterocina AS-48, con diferencias de aproximadamente 1,5 unidades logarítmicas respecto del control. En quesos con el productor de nisina Z se observaron niveles 0,7 unidades logarítmicas más bajos de *E. coli* O157:H7 que en el queso control. Los niveles de *B. cereus* descendieron drásticamente desde las 6 h de fabricación del queso, sin apenas detectarse efecto inhibitorio de las bacteriocinas.
8. La presurización de los quesos con 500 MPa a 10°C durante 5 min tanto a los 2 d como a los 50 d dio lugar a la inhibición total de *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli* O157:H7 a lo largo de la maduración.
9. La presurización con 300 MPa a 10°C durante 10 min a los 2 d en quesos elaborados con los productores de lacticina 481, nisina A, bacteriocina TAB 57 o enterocina AS-48 dio lugar a un efecto inhibitorio sinérgico frente a *L. monocytogenes*. Al aplicar este tratamiento a quesos de 50 d, se comprobó la inhibición total del microorganismo.
10. La presurización con 300 MPa a 10°C durante 10 min en quesos de 50 d con los cultivos adjuntos productores de enterocina I y enterocina AS-48 tuvo un efecto inhibitorio sinérgico frente a *S. aureus* que dio lugar a la inhibición total de este microorganismo en queso de 60 d.
11. La presurización con 300 MPa a 10°C durante 10 min en quesos de 2 d elaborados con el adjunto productor de bacteriocina TAB 57 dio lugar a valores de *E. coli* O157:H7 inferiores a 10 ufc/g en queso de 60 d de maduración. En quesos presurizados a los 50 d y en presencia de los cultivos bacteriocinogénicos la inhibición fue superior.

- Abdalla, O.M., Davidson, P.M., Christen, G.L. (1993). Survival of selected pathogenic bacteria in white pickled cheese made with lactic acid bacteria or antimicrobials. *J. Food Protect.* 56: 972-976.
- Abee, T. (1995). Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanism of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 129: 1-10.
- Abee, T., Krockel, L., Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 28: 169-185.
- Abriouel, H., Valdivia, E., Gálvez, A., Maqueda, M. (1998). Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 spheroplasts and permeabilized cells to the bacteriocin AS-48. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4623-4626.
- Accolas, J.P., Hemme, D., Desmazeaud, M.J., Vassal, L., Bouillanne, C., Veaux, M. (1980). Les levains lactiques thermophiles: propriétés et comportement en technologie laitière. Une revue. *Lait* 60: 487-524.
- Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I. (1994). A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 121: 31-34.
- Aguilar, A., Merino, S., Rubires, X., Tomas, J.M. (1997). Influence of osmolarity on lipopolysaccharides and virulence of *Aeromonas hydrophila* serotype O:34 strains grown at 37 degree C. *Infect. Immunity* 65: 1245-1250.
- Alakomi, H.L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., Helander, I.M. (2000). Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2001-2005.
- Ali-Vehmas, T., Westhalen, P., Myllys, V., Sandholm, M. (1997). Binding of *Staphylococcus aureus* to milk fat globules increases resistance to penicillin-G. *J. Dairy Res.* 64: 253-260.
- Allison, G.E., Worobo, R.W., Stiles, M.E., Klaenhammer, T.R. (1995). Heterologous expression of the lactacin F peptides by *Carnobacterium piscicola* LV17. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1371-1377.
- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, C.P., Ray, B. (1999). Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4228-4251.
- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Ray, B. (2000). Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure sensitive strains of food borne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 60: 33-42.
- Altena, K., Guder, A., Cramer, C., Bierbaum, G. (2000). Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2565-2571.
- Alvarez, I., Raso, J., Pagán, R., Sala, F.J. (2000). La conservación de los alimentos mediante pulsos eléctricos de alto voltaje. *Alimentación, equipos y tecnología* 8: 143-150.

- Ananthaswamy, H.N., Eisenstark, A. (1977). Repair of hydrogen peroxide-induced single strand breaks in *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 130: 187-191.
- Anderson, A.K., Finkelstein, R. (1919). A study of the electropure process of treating milk. *J. Dairy Sci.* 2: 374-408.
- Arocha, M.M., McVey, M., Loder, S.D., Rupnow, J.H., Bullerman, L. (1992). Behavior of hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of Cottage cheese. *J. Food Protect.* 55: 379-381.
- Atamer, M., Korac, C., Cimer, A., Odabasi, S., Tamucay, B., Yamaner, N. (1999). Some quality characteristics of Kasar cheese manufactured from milk preserved by activation of lactoperoxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide (LP) system. *Milchwissenschaft* 54: 553-556.
- Aune, T.M., Thomas, E.L. (1978). Oxidation of protein sulfhydryls by products of peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion. *Biochemistry* 17: 1005-1010.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (eds) (1994). Preparation of genomic DNA from bacteria: miniprep of bacterial genomic DNA. En: *Current protocols in molecular biology*. New York, John Wiley & Sons Inc., págs. 241-242.
- Axelsson, L.T., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J., Lindgren, S.E. (1989). Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2: 131-136.
- Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M., Nes, I.F. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1676-1682.
- Bacus, J.N., Brown, W.L. (1981). Use of microbial cultures: meat products. *Food Technol.* 35: 74-78.
- Baird-Parker, A.C. (1980). Organic acids. En: *Microbial ecology of foods*. Silliker, J.H., Elliot, R.P., Braid-Parker, A.C., Bryan, F.L., Christian, J.H.B., Clark, D.S., Olson, Jr., Roberts, T.R. (eds). New York, Academic Press, págs. 126-135.
- Banwart, G.J. (1979). *Basic Food Microbiology*, AVI Publishing, Westport, CT.
- Barton, M.D. (2001). Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutr. Res. Rev.* 13: 279-299.
- Bastian, S.N., Sivelä, S.K. (2000). *Escherichia coli* O157: H7: Aspects of concern to the dairy industry. *Bull. IDF* 357: 58-62.
- Bautista, L., Bermejo, M., Nuñez, M. (1986). Seasonal variation and characterization of Micrococcaceae present in ewes' raw milk. *J. Dairy Res.* 53: 1-5.
- Bean, N.H., Griffin, P.M., Goulding, J.S., Ivey, C.B. (1990). Foodborne disease outbreaks, 5-year summary, 1983-1987. *J. Food Protect.* 53: 711-728.
- Beard, B.M., Sheldon, B.W., Foegeding, P.M. (1999). Thermal resistance of bacterial spores in milk-based beverages supplemented with nisin. *J. Food Protect.* 62: 484-491.

- Bechinger, B. (1997). Structure and function of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *J. Membrane Biol.* 156, 197-211.
- Beecher, D.J., Wong, A.C.L. (1994). Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic demonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 62: 980-986.
- Bell, R.G., De Lacy, K.M. (1985). The effect of nisin-sodium chloride interactions on the outgrowth of *Bacillus licheniformis* spores. *J. Appl. Bacteriol.* 59: 127-132.
- Benkerroum, N., Oubel, H., Mimoun, L. B. (2002). Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in yogurt fermented with a bacteriocin-producing thermophilic starter. *J. Food Protect.* 799-805.
- Benz, R., Jung, G., Sahl, H.-G. (1991). Mechanism of channel formation by lanthibiotics in black lipid membranes. En: Nisin and novel lantibiotics. Jung, E. y Sahl, H-G. (eds). Escom, Leiden, págs. 359-372.
- Beumer, R.R., Noomen, A., Marijjs, J.A., Kampelmacher, E.H. (1985). Antibacterial action of the lactoperoxidase system in cow's milk. *Neth. Milk Dairy J.* 39: 107-114.
- Bhat, A., Joshi, V.K. (1998). Ohmic processing of foods, the concept, application, present status and future outlook. *Alimentaria* 289: 83-88.
- Bibi, W., Bachman, M.R. (1990). Antibacterial effect of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system on the growth of *Listeria* spp. in skim milk. *Milchwissenschaft* 45: 26-28.
- Bierbaum, G., Sahl, H.-G. (1987). Autolytic system of *Staphylococcus simulans*: influence of cationic peptides on activity of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *J. Bacteriol.* 169: 5452-5458.
- Biswas, S.R., Purbita, R., Johnson, M. C., Ray, B. (1991). Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1265-1267.
- Blanco, J. (1993). *Escherichia coli* enterotoxigénicos, necrotoxigénicos y verotoxigénicos de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. Servicio de Publicaciones de la Diputación Provincial de Lugo, págs.1-361.
- Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco, J. (1997). Brote epidémico masivo causado por *Escherichia coli* verotoxigénico (ECVT) en Japón. *Alimentaria* 282: 47-52.
- Block, S.S. (1991). Peroxygen compounds. En: Disinfection, sterilization and preservation. Block, S.S. (ed). Lea and Febiger, Philadelphia, págs. 167-181.
- Blom, H., Mortvedt, C. (1991). Anti-microbial substances produced by food-associated microorganisms. *Biochem. Soc. Trans.* 19: 694-698.
- Board, R.G. (1969). The microbiology of the hen's egg. *Adv. Appl. Microbiol.* 11: 245-254.
- Boggs, J.D., Whitwam, R.E., Hale, L.M., Briscoe, R.P., Kahn, S.E., McCormack, J.N., Maillard, J.M., Grayson, S.C., Sigmon, K.S., Reardon, J.W., Saah, J.R. (2001). Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese – North Carolina, October 2000 – January 2001. *JAMA* 286: 664-665.

- Bonsu, O.A., Laing, E., Akanmori, B.D. (2000). Prevalence of tuberculosis in cattle in the Dangme-West district of Ghana, public health implications. *Acta Trop.* 76: 9-14.
- Booth, M.C., Bogie, C.P., Sahl, H.-G., Siezen, R.J., Hatter, K.L., Gilmore, M.S. (1996). Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. *Mol. Microbiol.* 21: 1175-1184.
- Borch, E.W., Rosén, M., Björk, L. (1989). Antibacterial effect of the lactoperoxidase/thiocyanate/ hydrogen system against strains of *Campylobacter* isolated from poultry. *J. Food Protect.* 52: 638-641.
- Bougle, D.L., Stahl, V. (1994). Survival of *Listeria monocytogenes* after irradiation treatment of Camembert cheeses made from raw milk. *J. Food Protect.* 57: 811-813.
- Boussouel, N., Mathieu, F., Benoit, V., Linder, M., Revol-Junelles, A.M., Milliere, J.B. (1999). Response surface methodology, an approach to predict the effects of a lactoperoxidase system, nisin, alone or in combination, on *Listeria monocytogenes* in skim milk. *J. Appl. Microbiol.* 86: 642-652.
- Boussouel, N., Mathieu, F., Revol-Junelles, A.M., Milliere, J.B. (2000). Effects of combination of lactoperoxidase system and nisin on the behaviour of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in skim milk. *Int. J. Food Microbiol.* 61: 169-175.
- Bouttefroy, A., Millière, J.B. (2000). Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 65-75.
- Boziaris, I.S., Humpheson, L., Adams, M.R. (1998). Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella enteritidis* PT4. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 7-13.
- Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Sahl, H., de Kruijff, B. (1999). Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286: 2361-2364.
- Brewer, R., Adams M.R., Park, S.F. (2002). Enhanced inactivation of *Listeria monocytogenes* by nisin in the presence of ethanol. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 18-21.
- Bridgeman, T.A., Zottola, E.A. (1994). Use of naturally occurring inhibitors to suppress the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Dairy Sci* 77, Suppl 1.
- Brötz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, P.E., Sahl, H.-G. (1998a). The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis by targeting lipid II. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 154-160.
- Brötz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Schneider, U., Götz, F., Bierbaum, G., Sahl, H.-G. (1998b). Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol. Microbiol.* 30: 317-327.
- Bruno, M. E. C., Kaiser, A., Montville, J.T. (1992). Depletion of proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2255-2259.
- Buchanan, R.L., Deroever, C.M. (1993). Limits in assessing microbiological food safety. *J. Food Protect.* 56: 725-729.
- Budde, B.B., Rasch, M. (2001). A comparative study on the use of flow cytometry and colony forming units for assessment of the antibacterial effect of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.* 63: 65-72.

- Burgos, J., Ordóñez, J.A., Sala, F.J. (1972) Effect of ultrasonic waves on the heat resistance of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* spores. *Appl. Microbiol.* 24: 497-498.
- Cahill, M.M. (1990). Virulence factors in motile *Aeromonas* specie. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 1-16.
- Calderón-Miranda, M.L., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. (1999). *Int. J. Food Microbiol.* 51: 19-30.
- Capellas, M., Mor-Mur, M., Sendra, E., Pla, R., Guamis, B. (1996). Populations of aerobic mesophils and inoculated *E. coli* during storage of fresh goat's milk cheese treated with high pressure. *J. Food Protect.* 59: 582-587.
- Caplice, E., Fitzgerald, G.F. (1999). Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 131-149.
- Carlsson, J., Iwami, Y., Yamada, T. (1983). Hydrogen peroxide excretion by oral streptococci and effect of lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. *Infec. Immunity* 40: 70-80.
- Carneiro de Melo, A.M.S., Cook, G.M., Miles, R.J., Poole, R.K. (1996). Nisin stimulates oxygen consumption by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1831-1834.
- Carneiro de Melo, A.M.S., Cassar, C.A., Miles, R.J. (1998). Trisodium phosphate increases sensitivity of Gram-negative bacteria to lysozyme and nisin. *J. Food Protect.* 61: 839-844.
- Casas-Perez, L.A. (1996). Feed additive which consist of whey and *Lactobacillus reuteri* and a method of delivering *Lactobacillus reuteri* to the gastrointestinal tract. US Patent: 5,480,641.
- Casaus, P. (1998). Aislamiento e identificación de bacterias lácticas de origen cárnico productoras de bacteriocinas. Caracterización bioquímica y genética de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13 y de la enterocina B de *Enterococcus faecium* T136. Tesis Doctoral. Universidad Complutense, Madrid, España.
- Casey, P.G., Condon, S. (2002). Sodium chloride decreases the bacteriocidal effect of acid pH on *Escherichia coli* O157: H45. *Int. J. Food Microbiol.* 76: 199-206.
- Cecchi, L., Lodi, R., Battelli, G., Brasca, M., Sangalli, D., Soldini, G. (1995). Irradiation of dairy products: a real alternative to heat treatment? *Heat Treatments & Alternative Methods, Proceedings of the IDF Symposium held in Viena Austria*, págs. 277-282.
- Cecchi, L., Brasca, M., Lodi, R., Battelli, G., Nicosia, P., Soldini, G. (1996). Irradiation of dairy products. Sensitivity of different microorganisms. *Latte* 8: 84-92.
- Cenatiempo, Y., Berjeaud, J.M., Biet, F., Fremaux, C., Héchard, Y., Robichon, D. (1996). Bactériocines de bactéries lactiques: données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques. *Lait* 76: 169-177.
- Cheftel, J.Cl. (1995). Review: High pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Sci. Technol. Int.* 1: 75-90.

- Chen, Y., Ludescher, R.D., Montville, T.J. (1997a). Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4770-4777.
- Chen, Y., Shapira, R., Eisenstein, M., Montville, T.J. (1997b). Functional characterization of Pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predictive tertiary structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 524-531.
- Chikindas, M.L., García-Garcerá, M.J., Driessen, A.M., Ledebøer, A.M., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Abee, T., Konings, W.N., Venema, G. (1993). Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3577-3584.
- Chiu, C.P., Tateishi, K., Kosikowski, F.V. and Armbruster, G. (1984). Microwave treatment of pasteurized milk. *J. Microwave Power.* 19: 269-272.
- Choi, K., Math, E.H., Vasavada, P.C. (1993). Use of microwave energy to inactivate *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter jejuni* in milk. *Milchwissenschaft* 48: 134-136.
- Christian, J.H.B. (1955). The water relations of growth and respiration of *Salmonella oranienberg* at 30°C. *Aus. J. Biol. Sci.* 8: 490-497.
- Christian, J.H.B. (1980). Reduced water activity. En: *Microbial Ecology Foods*. Vol. 1, Factors affecting the life and death of microorganism. International Commission on Microbial Specifications for Foods. Academic Press, New York., págs. 70-91
- Cintas, L.M., Casaus, P. (1998). La necesidad de conservar los alimentos. *Bioconservación. Alimentación, equipos y tecnología* 10: 89-95.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F., Havarstein, L.S. (1998a). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180: 1988-1994.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Fernández, M.F., Hernández, P.E. (1998b). Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 15: 289-298.
- Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F., Hernández, P.E. (2001). Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* 7: 281-305.
- Circle, S.J., Stone, L., Boruff, C.S. (1945). Acrolein determination by means of tryptophane. *Ind. Eng. Chem., Analytical Ed.* 17: 259-262.
- Claissé, O., Lonvaud-Funel, A. (2001). Primers and a specific DNA probe for detecting lactic acid bacteria producing 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol in spoiled ciders. *J. Food Protect.* 64: 833-837.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 1-20.
- Cody, S.H., Abbott, S.L., Marfin, A.A., Schulz, B., Wagner, P., Robbins, K., Mohle-Boetani, J.C., Vugia, D.J. (1999). Two outbreaks of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT104 infections linked to raw-milk cheese in northern California. *JAMA* 281: 1805-1810.
- Cogan, T.M. (1980). Les levains lactiques mesophiles. *Une revue. Lait* 60: 397-425.

- Cogan, T.M., Hill, C. (1993). Cheese starter cultures. En: Cheese: chemistry, physics and microbiology - volumen 1, Fox, P.F. (ed). Chapman and Hall, London, págs. 193-255.
- Cogan, T.M. (1996). History and taxonomy of starter cultures. En: Dairy starter cultures. Cogan, T.M., Accolas, J.P. (eds) VCH Publishers, Cambridge, págs. 1-25.
- Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS Microbiol. Rev. 46: 269-280.
- Conner, D.E. (1993). Naturally occurring compounds. En: Antimicrobials in foods. Branen, A.L., Davidson, P.M. (ed). Marcel Dekker, Inc. New York, págs. 441-468.
- Conner, D.E., Kotrola, J.S. (1995). Growth and survival of *Escherichia coli* O157: H7 under acidic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 61: 382-385.
- Cords, B.R., Dychdala, G.R. (1993). Sanitizers: halogens, surface-active agents and peroxides. En: Antimicrobials in foods. Davinson, P.M., Branen, A.L. (eds). Marcel Dekker, New York, págs. 469-537.
- Cornelis, G., Laroche, Y., Balligand, G., Sory, M.P., Wauters, G. (1987). *Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness. Rev. Infect. Dis. 9: 64-87.
- Cover, T.L., Aber, R.C. (1989). *Yersinia enterocolitica*. N. Engl. J. Med. 321: 16-24.
- Cutter, C.N., Siragusa, G.R. (1995a). Population reductions of gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. J. Food Protect. 58: 977-983.
- Cutter, C.N., Siragusa, G.R. (1995b). Treatments with nisin and chelators to reduce *Salmonella* and *Escherichia coli* on beef. J. Food Protect. 58: 1028-1030.
- Cutter, C.N., Siragusa, G.R. (1996). Reduction of *Brochothrix thermosphacta* on beef surfaces following immobilization of nisin in calcium alginate gels. Lett. Appl. Microbiol. 23: 9-12.
- Cutter, C.N., Willett, J.L., Siragusa, G.R. (2001). Improved antimicrobial activity of nisin-incorporated polymer films by formulation change and addition of food grade chelator. Lett. Appl. Microbiol. 33: 325-328.
- D'Áoust, J.Y., Warburton, D.W., Sewell, A.M. (1985). *Salmonella typhimurium* phage-type 10 from Cheddar cheese implicated in a major Canadian foodborne outbreak. J. Food Protect. 48: 1062-1066.
- Daeschel, M.A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol. 43: 164-167.
- Dalh, T.A., Midden, W.R., Hartman, P.E. (1989). Comparison of killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. J. Bacteriol. 171: 2188-2194.
- Daly, C., Davis, R. (1998). The biotechnology of lactic acid bacteria with emphasis on applications in food safety and human health. Agr. Food Sci. Finland 7: 251-265.

- Daly, M., Buckley, J., Power, E., O'Hare, C., Cormican, M., Cryan, B., Wall, P.G., Fanning, S. (2000). Molecular characterization of Irish *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: detection of class I integrons and assessment of genetic relationship by DNA amplification fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 614-619.
- Daniel, R., Gottschalk, G. (1992). Growth temperature-dependent activity of glycerol dehydratase in *Escherichia coli* expressing the *Citrobacter freundii* *dha* regulon. *FEMS Microbiol. Lett.* 100: 281-286.
- Davies, E. A. Adams, M.R. (1994). Resistance of *Listeria monocytogenes* to the bacteriocin nisin. *Int. J. Food Microbiol.* 21: 341-347.
- Davies, E.A., Bevis, H.E., Delves-Broughton, J. (1997). The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in Ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 343-346.
- De Boever, P., Wouters, R., Verstraete, W. (2001). Combined use of *Lactobacillus reuteri* and soygerm powder as food supplement. *Lett. Appl. Microbiol.* 33: 420-424.
- De Buyser, M.L., Dufour, B., Maire, M., Lafarge, V. (2001). Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.* 67: 1-17.
- De Martinis, E.C.P., Crandall, A.D., Mazzotta, A.S., Montville, T.J. (1997). Influence of pH, salt, and temperature on nisin resistance in *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 60: 420-423.
- De Giusti, M., de Vito, E. (1992). Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by nitrite and nitrate in food. *Food Addit. Contam.* 9: 405-408.
- De Vos, W.M., Jung, G., Sahl, H.-G. (1991). Appendix: definitions and nomenclature of lantibiotics. En: Nisin and novel lantibiotics. Jung G, Sahl H.-G. (eds). Escom, Leiden, págs. 457-463.
- De Vuyst, L., Vandame, E.J. (1994). Antimicrobial potencial of lactic acid bacteria. En: Bacteriocins of lactic acid bacteria. De Vuyst, L., Vandame, E.J. (eds). Blackie Academic and professional, London, págs. 91-149.
- De Wit, J.N., Van Hooydonk, A.C.M. (1996). Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. *Neth. Milk Dairy J.* 50: 227-244.
- Degnan, A.J., Luchansky, J.B. (1992). Influence of beef allow and muscle on the antilisterial activity of pediocin AcH and liposome-encapsulated pediocin AcH. *J. Food Protect.* 55: 552-554.
- Degnan, A.J., Buyong, N., Luchansky, J.B. (1993). Antilisterial activity of pediocin AcH in model food systems in the presence of an emulsifier or encapsulated within liposomes. *Int. J. Food. Microbiol.* 18: 127-138.
- Delespaul, G., Leclere, G., Lepeltier, M., Chassagne, M.H. (1994). Cheesemaking process and the cheese obtained. French Patent FR: 2,696,620.
- Delgado da Silva, M.C., Hofer, E., Tibana, A. (1998). Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Food Protect.* 61: 354-356.

- Delor, I., Kaekenbeck, A., Wanters, G., Cornelis, G.R. (1990). Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic yersiniae. *Infect. Immunity* 58: 2983-8.
- Delves-Broughton, J. (1990). Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 44: 100-117.
- Delves-Broughton, J. (1993). The use of EDTA to enhance the efficacy of nisin towards Gram-negative bacteria. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 32: 87-97.
- Denis, F., Ramet, J.P. (1989). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in trypticase soy broth, UHT milk and french soft cheese. *J. Food Protect.* 52: 706-711.
- Diaz-Cinco, M., Martinelli, S. (1991). The use of microwaves in sterilization. *Environmental Sanitation* 11: 722-724.
- Diep, D.B., Havarstein, L.S., Nes, I.F. (1996). Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.* 178: 4472-4483.
- Dobrogosz, W.J., Casas, I.A., Pagano, G.A., Talarico, T.L., Sjoberg, D., Karlson, K. (1989). *Lactobacillus reuteri* and enteric microbiota. En: The regulatory and protective role of the normal flora. Grub, R., Midtvedt, T., Norin, E. (eds). A Wenner-Gren International Symposium. The Macmillan Press Ltd., London.
- Domínguez, L., Garayzábal, J.F.F., Vázquez, J.A., Blanco, J.L., Suárez, G. (1987). Fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of semi-hard cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 4: 125-127.
- Doyle, M.P. (1990). Pathogenic *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, and *Vibrio parahemolyticus*. *Lancet* 336: 1111-1115.
- Doyle, M.P., Zhao, T., Meng, J., Zhao, S. (1997). *Escherichia coli* O157:H7. En: Food microbiology. Fundamentals and frontiers. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (eds). American Society for Microbiology, Washington, D.C., págs. 171-191.
- Dutreux, N., Notermans, S., Wijtzes, T., Gongora-Nieto, M.M., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. (2000). Pulsed electric fields inactivation of attached and free-living *Escherichia coli* and *Listeria innocua* under several conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 54: 91-98.
- Dykes, G.A., Hastings, J.W. (1998). Fitness cost associated with class II bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* B73. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 5-8.
- Earnshaw, R.G., Banks, J.G., Defrise, D., Francotte, C. (1989). The preservation of Cottage cheese by activated lactoperoxidase system. *Food Microbiol.* 6: 285-288.
- Earnshaw, R.G., Banks, J.G., Francotte, C., Defrise, D. (1990). Inhibition of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in an infant milk formula by activated lactoperoxidase system. *J. Food Protect.* 53: 170-172.
- Elliason, D.J., Tatini, S.R. (1999). Enhanced inactivation of *Salmonella typhimurium* and verotoxigenic *Escherichia coli* by nisin at 6.5°C. *Food Microbiol.* 16: 257-267.
- El-Shenawy M.A., Garcia H.S., Marth E.H. 1990. Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* by the lactoperoxidase system in raw milk, buffer or a semi-synthetic medium. *Milchwissenschaft* 45: 638-641.

- El-Zinney, M.G., Uyttendaele, M.R., Debevere, J.M. (1996). The production and application of reuterin from *Lactobacillus reuteri* 12002. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 61/4^a: 1573-1583.
- El-Ziney, M.G., Debevere, J.M. (1998). The effect of reuterin on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk and cottage cheese. J. Food Protect. 61: 1275-1280.
- El-Ziney, M.G., van den Tempel, T., Debevere, J., Jakobsen, M. (1999). Application of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* 12002 for meat decontamination and preservation. J. Food Protect. 62: 257-261.
- Eneroth, A., Svensson, B., Molin, G., Christiansson, A. (2001). Contamination of pasteurized milk by *Bacillus cereus* in the filling machine. J. Dairy Res. 68: 189-196.
- Ennahar, S., Kuntz, F., Strasser, A., Bergaentzle, M., Hasselmann, C., Stahl, V. (1994). Elimination of *Listeria monocytogenes* in soft and red smear cheeses by irradiation with low energy electrons. Int. J. Food Sci. Technol. 29: 394-403.
- Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Sorokine, O., van Dorsselaer, A., Bringel, F., Hubert, J.C., Hasselmann, C. (1996). Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4381-4387.
- Ennahar, S., Assobhei, O., Hasselmann, C. (1998). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. J. Food Protect. 61: 186-191.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiol. Rev. 24: 85-106.
- Erkmen, O. (1996). Survival of virulent *Yersinia enterocolitica* during the manufacture and storage of Turkish Feta cheese. Int. J. Food Microbiol. 33: 285-292.
- Evans, M.R., Roberts, R.J., Ribeiro, C.D., Gardner, D., Kembrey, D. (1996). A milk-borne *Campylobacter* outbreak following an educational farm visit. Epidemiol. Infect. 117: 357-462.
- Evrendilek, G.A., Dantzer, W.R., Streaker, C.B., Ratanatriwong, P., Zhang, Q.H. (2001). Self-life evaluations of liquid foods treated by pilot plant pulsed electric field system. J. Food Process Preserv. 25: 283-297.
- Ewings, K.N., O'Conner, R.E., Mitchell, G.E. (1984). Proteolytic microflora of refrigerated raw milk in South East Queensland. Aust. J. Dairy Technol. 39: 65-68.
- Faille, C., Fontaine, F., Benezech, T. (2001). Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. J. Appl. Microbiol. 90: 892-900.
- Falkinham, J.O. (1996). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. 9: 177-215.
- Farber, J.M., Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food borne pathogen. Microbiol. Rev. 55: 476-511.
- Farcas, J. (1997). Physical methods of food preservation. En: Food microbiology. Fundamentals and frontiers. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (eds). American Society for Microbiology, Washington, D.C., págs. 497-519.

- Farrag, SA., El-Gazzar, F.E., Marth, E.H. (1992a). Use of the lactoperoxidase system to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in a semi-synthetic medium and in raw milk. *Milchwissenschaft* 47: 15-17.
- Farrag, SA., El-Gazzar, F.E., Marth, E.H. (1992b). Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by the lactoperoxidase system in a semi-sintetic medium and in raw milk. *Milchwissenschaft* 47: 95-98.
- Fedio, W.M, Jackson, H. (1992). On the origin of *Listeria monocytogenes* in raw bulk tank milk. *Int. Dairy J.* 2: 197-208.
- Feng, P., Weagant, S.D. (1993). *Yersinia*. En: Foodborne disease handbook, vol. 1. Hui, Y.H., Gorham, J.R., Murrel, K.D., Cliver, D.O. (eds). Marcel Dekker, New York, págs. 427-460.
- Ferreira, M.A., Lund, B.M. (1996). The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and in long-life cottage cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 22: 433-438.
- Ferrer, M.D., de Simón, M. (2002). Importancia de *E. coli* O157: H7 como patógeno emergente de transmisión alimentaria. XIII Congreso de Microbiología de los Alimentos de la SEM. Libro de ponencias, comunicaciones y posters, págs. 203-208.
- Fernandez, C.F., Shahani, K.M. (1990). Anticarcinogenic and immunological properties of dietary lactobacilli. *J. Food Protect.* 53: 704-710.
- Fleming, D.W., Cochi, S.L., MacDonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V., Reingold, A.L. (1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N. Engl. J. Med.* 312: 404-407.
- Floriano, B., Ruiz-Barba, J.L., Jiménez-Díaz, R. (1998). Purification an genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin wich does not belong to the pediocin family bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4883-4890.
- Fontaine, R.E., Cohen, M.L., Martin, W.T., Vernon, T.M. (1980). Epidemic salmonellosis from cheddar cheese: surveillance and prevention. *Am. J. Epidemiol.* 111: 247-253.
- Food Safety Network (2000). Fsnetwork archives. [www. Foodsafetynetwork.ca](http://www.Foodsafetynetwork.ca).
- Fox, L.K. (1997). Recovery of mastitis pathogens from udder cloths following several laundering methods. *Dairy, Food and Enviromental Sanitation* 17: 210-215.
- Fox, P.F. (1993). Cheese: An overview. En: Cheese: chemistry, physics and microbiology - volumen 1, Fox, P.F. (ed). Chapman and Hall, London, págs. 1-36.
- Frankenberg, D., Frankenberg-Schwagner, M., Harbich, R. (1993). Mechanisms of oxigen radiosensitization in irradiated yeast. I. DNA duoble-strand breakage. *Int. J. Radiat. Biol.* 64: 511-521.
- Fredenhagen, A., Märki, F, Fendrich, G., Märki, W., Gruner, J. (1991). Duramycin B and C, two new lanthionine containing antibiotics as inhibitors of phospholipase A2 and structural revision of duramycin and cinnamycin. En: Nisin and novel lantibiotics. Jung, G., Sahl, H.-G. (eds). Escom. Leider, págs. 131-140.
- Freitas, A.C., Nunes, A.M., Milhomen, A.M., Ricciardi, I.D. (1993). Ocurrence and caracterizacion of *Aeromonas* species in pasteurized milk and white cheese in Rio de Janeiro, Brasil. *J. Food Protect.* 56: 62-65.

- Froseth, B.R., McKay, L.L. (1991). Molecular characterization of the nisin resistance region of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis DRC3. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 804-811.
- Gallot-Lavallée, T. (1998). Efficacité du traitement par les hautes pressions sur la destruction de *Listeria monocytogenes* dans des fromages de chèvre au lait cru. *Sci. des Aliment* 18: 647-656.
- Gálvez, A., Valdivia, E., Martínez, M., Maqueda, M. (1988). Bactericidal action of peptide antibiotic AS-48 against *E. coli* K12. *Can. J. Microbiol.* 35: 318-321.
- Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E. (1989). Bactericidal and bacteriolitic action of peptide antibiotic AS-48 against Gram positive and Gram negative bacteria and other organisms. *Res. Microbiol.* 140: 57-68.
- Gálvez, A., Valdivia, E., Martínez, M., Maqueda, M. (1989). Effect of peptide antibiotic AS-48 on *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-47. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 641-645.
- Gálvez A., Valdivia E., Martínez-Bueno M. y Maqueda M. (1990). Induction of autolysis in *Enterococcus faecalis* S-47 by peptide AS-48. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 406-413.
- Gänzle, M.G., Weber, S., Hammes; W.P. (1999). Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.* 46: 207-217.
- García, M.L., Burgos, J., Sanz, B., Ordoñez, J.A. (1989). Effect of heat and ultrasonic waves on the survival of two strains of *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.* 67: 619-628.
- García-Graells, C., Masschalck, B., Michiels, C. (1999). Inactivation of *Escherichia coli* in milk by high-hydrostatic-pressure treatment in combination with antimicrobial peptides. *J. Food Protect.* 62: 1248-1254.
- García-Graells, C., Valckx, C., Michiels, C.W. (2000). Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in milk by combined treatment with high hydrostatic pressure and the lactoperoxidase system. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4173-4179.
- Gaya, P., Medina, M., Bautista, L., Nuñez, M. (1988). Influence of lactic starter inoculation, curd heating and ripening temperature on *Staphylococcus aureus* behaviour in Manchego cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 6: 249-257.
- Gaya, P., Medina, M., Rodríguez-Marín, M.A., Nuñez, M. (1990). Accelerated ripening of ewes' milk Manchego cheese: effect of elevated ripening temperature. *J. Dairy Sci.* 73: 26-32.
- Gaya, P., Medina, M., Nuñez, M. (1991). Effect of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* behavior in raw milk at refrigeration temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3355-3360.
- Gaya, P., Saralegui, C., Medina, M., Nuñez, M. (1996). Occurrence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in raw caprine milk. *J. Dairy Sci.* 79: 1936-1941.
- Gaya, P., Sánchez, J., Medina, M., Nuñez, M. (1998). Incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in raw milk produced in Spain. *Food Microbiol.* 15: 551-555.

- George, S.M., Lund, B.M., Brocklehurst, T.T. (1988). The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 6: 153-156.
- Gervilla, R., Capellas, M., Ferragut, V., Guamis, B. (1997a). Effect of high hydrostatic pressure on *Listeria innocua* 910 CECT inoculated into ewe's milk. J. Food Protect. 60: 33-37.
- Gervilla, R., Felipe, X., Ferragut, V., Guamis, B. (1997b). Effect of high pressure on *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* strain in ovine milk. J. Dairy Sci. 80: 2297-2303.
- Gervilla, R., Sendra, E., Ferragut, V., Guamis, B. (1999a). Sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus helveticus* in ovine milk subjected to high hydrostatic pressure. J. Dairy Sci. 82: 1009-1107.
- Gervilla, R., Mor-Mur, M., Ferragut, V., Guamis, B. (1999b). Kinetics of destruction of *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* inoculated in ewe's milk by high hydrostatic pressure. Food Microbiol. 16: 173-184.
- Gilliland, S.E. (1985). Concentrated starter cultures. En: Bacterial starter cultures for food. Gilliland S.E. (ed.). CRC Press. Inc. Boca Ratón, págs. 145-157.
- Gilliland, S.E. (1990) Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 87: 175-188.
- Giraffa, G., Carminati, D. (1997). Control of *Listeria monocytogenes* in the rind of Taleggio, a surface-smear cheese, by a bacteriocin from *Enterococcus faecium* 7C5. Scien. Aliment. 17: 383-391.
- Glass, K., Granberg, D., Larson, A., Johnson, E. (2001). Inhibition of pathogens on process cheese slices at abuse temperature. 88th Annual Meeting for Food Protection. Minneapolis 5-8 August 2001. Program Abstracts, págs. 135.
- González, C.F., Kunka, B.S. (1987). Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. Appl. Environ. Microbiol. 53: 2534-2538.
- Gould, G.W. (1996). Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. J. Food Protect. Supplement: 82-86.
- Goulet, V., Jaquet, C., Vaillant, V., Rebière, I., Mouret, E., Lorente, E., Steiner, F., Rocourt, J. (1995). Listeriosis from consumption of raw milk cheese. Lancet 345: 1581-1582.
- Granum, P.E. (1994). *Bacillus cereus* and its toxins. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. 76: 61S-66S.
- Granum, P.E. (1997). *Bacillus cereus*. En: Food microbiology. Fundamentals and frontiers. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (eds). AMS Press. Washington D.C., págs. 327-336.
- Grappin, R., Beuvier, E. (1997). Possible implication of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese: a review. Bull. Int. Dairy Fed. 237: 16-19.
- Gratia, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. C.R.Soc. Biol. Fill. 93: 1040-1041.

- Guamis, B. (2000). Utilización de altas presiones para la conservación de alimentos. En: XII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Sociedad Española de Microbiología. Oviedo, págs. 79-82
- Gutierrez, F., Albi, M.A., Palma, R., Rios, J.J., Olias, J.M. (1989). Bitter taste of virgin olive oil: Correlation of sensory evaluation and instrumental HPLC analysis. *J. Food Sci.* 54(1): 68-70.
- Hamid, M.A.K., Boulanger, R.J., Tong, S.C., Gallop, R.A., Pereira, R.R. (1969). Microwave pasteurization of raw milk. *J. Microwave Power* 4: 272-274.
- Hammer, P. (1999). *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle and food hygiene. *Bull. Int. Dairy Federation* 345: 19-22.
- Hanlin, M.B., Kalchayanand, N., Ray, P., Ray, B. (1993). Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. *J. Food Protect.* 56: 252-255.
- Harris, N.V., Kimball, T., Weiss, N.S., Nolan, C. (1986). Dairy products, produce and other non-meat foods as possible sources of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* enteritis. *J. Food Protect.* 49: 347-51.
- Harris, L.J., Flemig, H.P., Klaenhammer, T.R. (1991). Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A and UAL 500 to nisin. *J. Food Protect.* 54: 836-840.
- Harvey, E., Loomis, A. (1929). The destruction of luminous bacteria by high frequency sound waves. *J. Bacteriol.* 17: 314-318.
- Hastings, J.W., Sailer, M., Johnson, K., Roy K.L., Vederas J.C., Stiles M.E. (1991). Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.* 173: 7491-7500.
- Hauben, K.J.A., Wuytack, E.Y., Soontjens, C.C.F., Michiels, C.W. (1996). High-pressure transient sensibilization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer-membrane permeability. *J. Food Protect.* 59: 350-355.
- Hauben, K.J.A., Bernaerts, K, Michiels, C.W. (1998). Protective effect of calcium on inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure. *J. Appl. Microbiol.* 85: 678-684.
- Heddleson, R.A. and Doores, S. (1994). Factors affecting microwave heating of foods and microwave induced destruction of foodborne pathogens - a review. *J. Food Protect.* 57: 1025-1037.
- Heddleson, R.A., Doores, S., Ananthewaran, R.C., Kuhn, G.D. (1996). Viability loss of *Salmonella* species, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes* in complex foods heated by microwave energy. *J. Food Protect.* 59: 813-818.
- Heeschen, W.H. (1998). Milk hygiene and milk safety in European and international markets. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 50: 53-77.
- Henderson, J.T., Chopko, A.L., Van Wassenaar, P.D. (1992). Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch. Biochem. Biophys.* 295: 5-12.

- Heyndricks, M., de Vos, P., Vacanneyt, M., de Ley, J. (1991). The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212t2 and 1213t1 and *Clostridium pasteurianum* LMG 3285. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 637-642.
- Hirsch, A. (1951). Growth and nisin production of strain of *Streptococcus lactis*. *J. Gen. Microbiol.* 5: 208-221.
- Hird, D.W., Genigeorgis, C. (1990). Listeriosis in food animals: clinical signs and livestock as a potential source of direct (nonfoodborn) infection for humans. En: *Foodborne listeriosis*. Miller, A. J., Smith, J.L., Somkuti, G.A. (eds). Elsevier Science Publishers. Amsterdam, págs. 31-39.
- Hobbs, B.C., Gilbert, R.J. (1974). Microbials counts in relation to food poisoning. *Proceedings of the IV Internacional Congress of Food Science Technology* 3: 159.
- Holck, A., Axelsson, L., Birkeland, S.E., Aukrust, T., Blom, H. (1992). Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2715-2720.
- Holck, A., Axelsson, L., Hühne, K., Kröckel, L. (1994). Purification and cloning of sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb647. *FEMS Microbiol. Lett.* 115: 143-150.
- Holo, H., Nissen, O., Nes, I.F. (1991). Lactococin A a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subs. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* 173: 3879-3887.
- Holzappel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 343-363.
- Hosoda, M., Hashimoto, H., Morita, H., Chiba, M. (1992). Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria against N-methyl-N'-nitroso-N-nitrosoguanidine. *J. Dairy Sci.* 75: 976-981.
- Hosoda, K., Ohya, M., Kohno, T., Maeda, T., Endo, T., Wakamatsu, K. (1996). Structure determination of an immunopotentiator peptide, cinnamycin, complexed with lysophosphatidylethanolamide by H-NMR. *J. Biochem.* 119: 226-230.
- Huang, J., Lacroix, C., Daba, H., Simard, R.E. (1994). Growth of *L. monocytogenes* in milk and its control by pediocin 5 produced by *Pediococcus acidilacti* UL5. *Int. Dairy J.* 4: 429-443.
- Hudson, L.M., Chen, J., Hill, A.R., Griffiths, M.W. (1997). Bioluminescence: A rapid indicator of *Escherichia coli* O157: H7 in selected yogurt and cheese varieties. *J. Food Protect.* 60: 891-897.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T. (2001). Bioprotección en carne y productos cárnicos. En: *Bacteriocinas producidas por bacterias lácticas y su aplicación en la industria alimentaria*. 1ª Acción especial. Granada, págs. 41-53.
- Hugenholtz, J. (1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Micro. Rev.* 12: 165-178.
- Hülshberger, H., Potel, J., Niemann, E.G. (1983). Electric fields effects on bacteria and yeast cell. *Radiat. Environ. Biophys.* 22: 149-162.
- Hurst, A. (1981a). Nisin. *Adv. J. Appl. Microbiol.* 27: 85-123.

- Hurst, A. (1981b). Nisin: its preservative effect and function in the growth cycle of the producer organism. En: Streptococci. Academic Press. London.
- Imlay, J.A., Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240: 1302-1309.
- Ingram, L.C. (1970). A ribosomal mechanism of synthesis for peptides related to nisin. *Biochim. Biophys. Acta* 224: 263-265.
- Jablonski, L.M., Bohach, G.A. (1997). *Staphylococcus aureus*. En: Food microbiology. Fundamentals and frontiers. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (eds). American Society for Microbiology, Washington, D.C., págs. 356-375.
- Jacobs, S.E., Thornley, M.J. (1954). The letal action of ultrasonic waves on bacteria suspended in milk and other liquids. *J. Appl. Bacteriol.* 17: 38-56.
- Jaquette, C.B., Beuchat, L.R. (1998). Combined effects of pH, nisin and temperature on growth and survival of psychrotrophic *Bacillus cereus*. *J. Food. Protect.* 61: 563-570.
- Jarvis, B. (1967). Resistance to nisin and production of nisin-inactivating enzymes by several *Bacillus* species. *J. Gen. Microbiol.* 47: 33-48.
- Jay, J.M. (1982) Antimicrobial activity of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 525-532.
- Jensen, J., Larsen, P.H., Pannetier, E. (1992). El proceso “Bactocatch” para la fabricación de quesos sin nitratos”. *I.L.E.* 166: 60-63.
- Jiménez Díaz, R., Ruíz Barba, J.L., Cathart, D.P., Holo, H., Nes, I.F., Sletten, K.H., Warner, P.J. (1995). Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4459-4463.
- Johnston, D.E. (1995). High pressure effects on milk and meat. En: High pressure processing of foods. Ledward, L.A., Johnston, D.E., Earnshaw, R.G., Hasting, A.P.M. (eds). Nottingham University Press, Leicestershire, págs. 99-122.
- Johnson, R.P., Durham, R.J., Johnson, S.T., McDonald, L.A., Jeffrey, S.R., Butman, B.T. (1995). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat by an enzyme-linked immunosorbent assay, EHEC-Tec. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 386-388.
- Jones, E.M., Smart, A., Bloomberg, G., Burgess, L., Millar, M.R. (1994). Lactoferricin, a new antimicrobial peptide. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 208-214.
- Joosten H.M.L.J., Nuñez M., Devreese, B., van Beeumen, J., Marugg, J.D. (1996). Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4220-4223.
- Joosten, H.M.L.J., Rodríguez, E., Nuñez, M. (1997). PCR detection of sequences similar to the AS-48 structural gene in bacteriocin-producing enterococci. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 40-42.
- Jung, G. (1991). Lantibiotics ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and α,β -didehydroaminoacids. *Angew. Chem. Int. Ed.* 30: 1051-1068.

- Jung, D.S., Bodyfelt, F., Daeschell, M.A. (1992). Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *J. Dairy Sci.* 75: 387-393.
- Juven, B.J., Pierson, M.D. (1996). Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantification. *J. Food Protect.* 59: 1233-1241.
- Kaiser, A.L., Montville, T.J. (1996). Purification of the bacteriocin Bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4529-4535.
- Kalchayanand, N., Hanlin, M.B., Ray, B. (1992). Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.* 15: 239-243.
- Kalchayanand, N., Sikes, T., Dunne, C.P., Ray, B. (1994). Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4174-4177.
- Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunne, C.P., Ray, B. (1998). Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. *J. Food Protect.* 61: 425-431.
- Kamat, A., Warke, R., Kamat, M., Thomas, P. (2000). Low-dose irradiation as measure to improve microbial quality of ice cream. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 27-35.
- Kamau, D.N., Kroger, M. (1984). Preservation of raw milk by treatment with hydrogen peroxide and by activation of the lactoperoxidase system. *Milchwissenschaft* 39: 658-661.
- Kamau, D.N., Doore, S., Pruitt, K.M. (1990a). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk. *J. Food Protect.* 53: 1010-1014.
- Kamau, D.N., Doore, S., Pruitt, K.M. (1990b). Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2711-2716.
- Kamau, D.N., Doores, S., Pruitt, K.M. (1991). Activation of the lactoperoxidase system prior to pasteurization for the shelf-life extension of milk. *Milchwissenschaft* 46: 213-214.
- Kanatani, K., Oshimura, M., Sano, K. (1995). Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1061-1067.
- Kanddler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 209-224.
- Karmali, M.A., Steele, B.T., Petric, M., Lim, C. (1983). Sporadic cases of hemolytic uremic syndrome associated with faecal cytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Lancet* 1: 619-620.
- Kasrazadeh, M., Genigeorgis, C. (1995). Potential growth of *Escherichia coli* O157:H7 in soft hispanic type cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 25: 289-300.

- Kessler, H.G. (1997). Engineering aspects of currently available technological processes. *Bull. IDF* 320: 16-25.
- Khan, A.A., Eungbin, K., Cerniglia, C.E. (1998). Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of a hemolytic toxin (aerolysin) gene from *Aeromonas trota*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2473-2478.
- Kheadr, E.E., Vachon, J.F., Paquin, P., Fliss, I. (2002). Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 12: 435-446.
- Kirov, S.M. (1997). *Aeromonas* and *Plesiomonas* Species. En: Food microbiology. Fundamentals and frontiers. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (eds). AMS Press. Washington D.C., págs. 265-287
- Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39-86.
- Klebanoff, S.J., Clem, W.H., Luebke, R.G. (1966). The peroxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide antimicrobial system. *Biochim. Biophys. Acta* 117: 63-72.
- Kolter, R., Moreno, F. (1992). Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 141-163.
- Kramer, J.M., Gilbert, R.J. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. En: Foodborne bacterial pathogens. Doyle, M.P. (ed). Marcel Dekker, New York, págs. 21-70.
- Kudra, T., Van De Voort, F.R., Raghavan, G.S.V. and Ramaswamy, H.S. (1991). Heating characteristics of milk constituents in a microwave pasteurization system. *J. Food Sci.* 56: 931-934
- Larson, J.H. (1979). The spectrum of clinical manifestations of infections with *Yersinia enterocolitica* and their pathogenesis. En: Contributions to Microbiology and Immunology, vol. 5. Basel: Karger, págs. 257-269
- Lauková, A. (1995). Inhibition of ruminal staphylococci and enterococci by nisin *in vitro*. *Lett. Appl. Microbiol.* 20: 34-36.
- Lazdunski, C.J. (1988). Pore-forming colicins: synthesis, extracellular release, mode of action, immunity. *Biochimie* 70: 1291-1296.
- Lee, B.H., Kermasha, S., Baker, B.E. (1989). Thermal, ultrasonic and ultraviolet inactivation of *Salmonella* in thin films of aqueous media and chocolate. *Food Microbiol.* 6: 143-152.
- Leer, R.L., van der Vossen, J.M.B.M., van Giezen, M., van Noort, J.M., Pouwels, P.H. (1995) Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology* 141: 1629-1635.
- Leistner, L. (1995) Principles and applications of hurdle technology. En: New methods of food preservation. Gould, G.W. (ed).. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK, págs. 1-21.
- Leyer, G.J., Johnson, E.A. (1992). Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2075-2080.

- Leyer, G.J., Johnson, E.A. (1993). Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1842-1847.
- Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 149-164.
- Little, C.L., Knochel, S. (1994). Growth and survival of *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* and *Bacillus cereus* in Brie stored at 4, 8 and 20 degree C. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 137-145.
- Little, C.L., Louvois, J. (1999). Health risks associated with unpasteurized goats' and ewes' milk on retail sale in England and Wales. *Epidemiol. Infect.* 122(3): 403-408.
- Liu, W., Hansen, J.N. (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 5: 2551-2558.
- Lonnerdal, B.O. (1985). Biochemistry and physiological function of human milk. *Am. J. Clin. Nutri.* 42: 1299-1317.
- López-Fandiño, R., Carrascosa, A.V., Olano, A. (1996). The effects of high pressure on whey protein denaturation and cheese-making properties of raw milk. *J. Dairy Sci.* 79: 929-936.
- Ludwig, H., Schreck, Ch. (1997). The inactivation of vegetative bacteria by pressure. En: High pressure research in the biosciences and biotechnology. Heremans, K., Ludwig H., Leuven, T. (eds). Leuven University Press, págs. 221-224.
- Maisnier-Patin, S., Deschamps, S.N., Tatini, S.R., Richard, J. (1992). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait* 72: 249-263.
- Maisnier-Patin, S., Richard, J. (1996). Cell wall changes in nisin-resistant variants of *Listeria innocua* grown in presence of high nisin concentrations. *FEMS Microbiol. Lett.* 140: 29-35.
- Maisnier-Patin, S., Tatini, S.R., Richard, J. (1995). Combined effect of nisin and moderate heat on destruction of *Listeria monocytogenes* in milk. *Lait* 75: 81-91.
- Mancini, L. (1997). Dairy processing becomes dynamic. *Food Eng.* 69: 165-168, 170.
- Mandel, I.D., Ellison, S.A. (1985). The biological significance of the nonimmunoglobulin defense factors. En: The lactoperoxidase system: Its chemistry and biological significance. Pruitt, K.M, Tenovuo, J.O., págs. 1. Marcel Dekker, New York.
- Marco, J.C., De Pablo, B., Coll, D., Valcárcel, S., Escudero, J.M. (2002). *Listeria monocytogenes* en cuajada de leche de oveja. XIII Congreso de Microbiología de los Alimentos de la SEM. Libro de ponencias, comunicaciones y posters, págs. 264.
- Marks, N.E., Grandison, A.S., Lewis, M.J. (2001). Challenge testing of the lactoperoxidase system in pasteurized milk. *J. Appl. Microbiol.* 91: 735-741.
- Marshall, B.J., Ohye, D.F., Christian, J.H.B. (1971). Tolerance of bacteria to high concentrations of NaCl and glycerol in the growth medium. *Appl. Microbiol.* 21: 363-364.

- Marshall, V.M.E. 1978. In vitro and in vivo studies on the effect of the lactoperoxidase-thiocyanato-hydrogen peroxide system on *Escherichia coli*. Ph.D. thesis, Reading University.
- Marshall, V.M., Reiter, B. (1980). Comparison of the antibacterial activity of the hypothiocyanite anion towards *Streptococcus lactis* and *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 120: 513-516.
- Martín, O., Qin, B.L., Chang, F.J., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. (1997). Inactivation of *Escherichia coli* in skim milk by high intensity pulsed electric fields. J. Food Process Eng. 20: 317-336.
- Martínez, C.E., Mendoza, P.G., Alacron, F.J., Garcia, H.S. (1988). Reactivation of the lactoperoxidase system during raw milk storage and its effect on the characteristic of pasteurized milk. J. Food Protect. 51: 558-561.
- Martínez, B., Suárez, J. E., Rodríguez, A. (1995). Antimicrobials produced by wild lactococcal strains isolated from homemade cheese. J. Food Protect. 58: 1118-1123.
- Martínez, M.I., Martínez, J.M., Herranz, C., Suarez, A.M., Rodríguez, J.M. (2000). Las bacteriocinas de las bacterias lácticas. Alimentaria 314: 59-66.
- Marugg, J.D., González, C.F., Kunka, B.S., Ledebøer, A.M., Pucci, M.J., Toonen, M.Y., Walker, S.A., Zoetmulder, L.C.M., Vandenberg, P.A. (1992). Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2360-2367.
- Massa, S., Atieri, C., Quaranta, V., De Pace, R. (1997). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yoghurt during preparation and storage at 4°C. Lett. Appl. Microbiol. 24: 347-350.
- Masschalck, B., Van Houdt, R., Michiels, C.W. (2001a). High pressure increases bactericidal activity spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. Int. J. Food Microbiol. 64: 325-332.
- Masschalck, B., Van Houdt, R., Van Haver, E.G.R., Michiels, C.W. (2001b). Inactivation of Gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. Appl. Environ. Microbiol. 67: 339-344.
- Masson, P.L., Heremans, J.F., Schonke, E. (1969). Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. J. Exp. Med. 130: 643-656.
- Mateos, D., Anguita, J., Naharro, G., Paniagua, C. (1993). Influence of growth temperature on the production of extracellular virulence factors and pathogenicity of environmental and human strains of *Aeromonas hydrophila*. J. Appl. Bacteriol. 74: 111-118.
- Mathieu, F., Michel, M., Lebrihi, A., Lefebvre, G. (1994). Effect of the bacteriocin carnocin CP5 and of the producing strain *Carnobacterium piscicola* Cp5 on the viability of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in salt solution, broth and skimmed milk, at various incubation temperatures. Int. J. Food Microbiol. 2: 155-172.
- Mattick, A.T.R., Hirsch A. (1947). Further observation on an inhibitor (nisin) from lactic streptococci. Lancet 2: 5-7.
- Matyas, Z., Fujikura, T. (1984). Brucellosis as a world problem. Dev. Biol. Standard. 56: 3-20.

- Mazzotta, A.S., Montville T.J. (1997). Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10° and 30°C. J. Appl. Bacteriol. 82: 32-38.
- Mazzotta, A.S., Montville T.J. (1999). Characterization of fatty acid composition, spore germination, and thermal resistance in a nisin-resistant mutant of *Clostridium botulinum* 169B and the wild-type strain. Appl. Environ. Microbiol. 65: 659-664.
- McAuliffe, O., Hill, C., Ross, R.P. (1999). Inhibition of *Listeria monocytogenes* manufactured with a lacticin 3147-producing starter culture. J. Appl. Microbiol. 86: 251-256.
- McClements, J.M.J., Patterson, M.F., Linton; M. (2001). The effect of growth stage and growth temperature on high hydrostatic pressure inactivation of some psychrotrophic bacteria in milk. J. Food Protect. 64: 514-522.
- McKay, A.M. (1990). Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* against *Listeria* spp. Lett. Appl. Microbiol. 11: 15-17.
- McLauchlin, J., Saunders, N.A., Taylor, A.G. (1988). Listeriosis and food-borne transmission. Lancet I: 177-178.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis. 5: 607-625.
- Meer, R.R., Baker, J., Bodyfelt, F.W., Griffiths, M.W. (1991). Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. J. Food Protect. 54: 969-979.
- Mephan, B. (1976). The secretion of milk. Edwar Arnol, Londres.
- Melas, D.S., Papageorgiou, D.K., Mantis, A.I. (1999). Enumeration and confirmation of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, and *Aeromonas sobria* isolated from raw milk and other milk products in northern Greece. J. Food Protect. 62: 463-466.
- Melas, D.S., Papageorgiou, D.K., Abraham, A., Mantis, A. (2001). Survival of *Aeromonas hydrophila* during the manufacture and ripening of Feta cheese. Milchwissenschaft 56: 257-261.
- Merin, U., Rosenthal, I. (1984). Pasteurization of milk by microwave irradiation. Milchwissenschaft: 39, 643-644.
- Meyrand, A., Boutrand-Loei S., Ray-Gueniot, S., Mazuy, C., Gaspard, C.E., Jaubert, G., Perrin, G., Lapeyre, C., Vernozy-Rozand, C. (1998). Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. J. Appl. Microbiol. 85: 537-544.
- Ming, X., Daeschel, M.A. (1993). Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance response to *Listeria monocytogenes* Scott A. J. Food Protect. 56: 944-948.
- Modi, K.D., Chikindas, M.L., Montville, T.J. (2000). Sensitivity of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* to heat and the synergistic action of heat and nisin. Lett. Appl. Microbiol. 30: 249-253.
- Moll, G.N., Konings, W.N., Driessen, A.J.M. (1998). The lantibiotic nisin induces transmembrane movement of a fluorescent phospholipid. J. Bacteriol. 180: 6565-6570.

- Moll, G.N., Roberts, G.C.K., Konings, W.N., Driessen, A.J.M. (1996). Mechanism of lantibiotic-induced pore-formation. *Anton. Leeuwenhoek Int. J. Gen. M.* 69: 185-191.
- Moll, G.N., Konings, W.N., Driessen, A.J. (1999). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Anton. Leeuwenhoek Int. J. Gen. M.* 76: 185-198.
- Montville, T.J., Bruno, M.E. (1994). Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 53-74.
- Morgan, S., Ross, R.P., Beresford, T., Hill, C. (2000). Combination of hydrostatic pressure and lacticin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*. *J. Appl. Microbiol.* 88: 414-420.
- Morgan, F., Bonnin, V., Mallereau, M.P., Perrin, G. (2001). Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. *Int. J. Food Microbiol.* 64: 217-221.
- Mortvedt, C.I., Nissen-Meyer, J., Jelle, J., Greenov, B., Skaugen, M., Nes, I.F. (1995). Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 175-179.
- Motlagh, A.M., Bhunia, A.K., Szostek, F., Hansen, T.R., Johnson, M.C., Ray, B. (1992a). Nucleotide and amino acid sequence of *pap*-gene (pediocin AcH production) in *Pediococcus acidilactici* H. *Lett. Appl. Microbiol.* 15: 45-48.
- Motlagh, A.M., Holla, S., Johnson, M.C., Ray, B., Field, R.A. (1992b). Inhibition of *Listeria* spp. in sterile food systems by pediocin AcH, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Food. Protect.* 55: 337-343.
- Mulet-Powell, N., Lacoste-Armynot, A.M., Viñas, M., De Buochberg, M.S. (1998). Interactions between pairs of bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Food. Protect.* 61: 1210-1212.
- Muriana, P.M. (1996). Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *J. Food Protect.* 1996 supplement, 54-63.
- Nagasawa, T., Kiyosawa, I., Kuwahara, K. (1972). Amounts of lactoferrin in human colostrum and milk. *J. Dairy Sci.* 55: 1651-
- Natrajan, N., Sheldon, B.W. (2000). Efficacy of nisin-coated polymer films to inactivate *Salmonella* Typhimurium on fresh broiled skin. *J. Food Protect.* 63: 1189-1196.
- Nes, I.F. (1996). Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *J. Bacteriol.* 178: 2232-2237.
- Nes, I.F., Havarstein, L.S., Holo, H. (1995). Genetics of non-lantibiotics bacteriocins. En: *Genetics of Streptococci, Enterococci and Lactococci*. Ferretti, J.J., Gilmore, M.S., Klaenhammer, T.R., Brown, F. (eds). Karger, New York, págs. 645-651.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Anton. Leeuwenhoek Int. J. Gen. M.* 70: 113-128.
- Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L.S., Sletten, K., Nes, I.F. (1992). A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* 174: 5686-5692.

- Nissen-Meyer, J., Havarstein, L.S., Holo, H., Sletten, K., Nes, I.F. (1993). Association of lactococcin A immunity factor with the cell membrane: purification and characterization of the immunity factor. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1503-1509.
- Nissen-Meyer, J., Nes, I.F. (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch. Microbiol.* 167: 67-77.
- Núñez, M., Bautista, L., Medina, M., Gaya, P. (1998). *Staphylococcus aureus*, thermostable nuclease and staphylococcal enterotoxins in raw ewes' milk Manchego cheese. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 29-34.
- Núñez, M., Rodríguez, J.L., García, E., Gaya, P., Medina, M. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *J. Appl. Microbiol.* 83: 671-677.
- Núñez, M., Tomillo, J., Rodríguez, E., Gaya, P., Medina, M. (1998). Exposure to nisin enhances *Escherichia coli* halotolerance. *Milchwissenschaft* 53: 69-73.
- Okereke, A., Thompson, S.S. (1996). Induced acid-tolerance response confers limited nisin resistance to *Listeria monocytogenes* ScottA. *J. Food Protect.* 9: 1003-1006.
- Opdebeeck, J.P., O'Boyle, D.A., Frost, A.J. (1988). Encapsulated *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 13: 225-234.
- Ordoñez, J.A., Aguilera, M.A., García M.L., Sanz, B. (1987). Effect of combined ultrasonic and heat treatment (thermoultrasonication) on the survival of a strain of *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Res.* 54: 61-67.
- O'Reill, L.M., Daborn, C.J. (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber. Lung Dis.* 76 Suppl. 1: 1-46.
- O'Reilly, C.E., O'Connor, P., Kelly, A., Beresford, T.P., Murphy, P.M. (1999a). Use of high hydrostatic pressure for inactivation of micro-organisms in a cheese system. *Iris J. Agr. Food Res.* 38: 181.
- O'Reilly, C.E., O'Connor, P., Kelly, A., Murphy, P.M., Beresford, T.P. (1999b). Inactivation of micro-organisms in Cheddar cheese by high pressure. *Iris J. Agr. Food Res.* 38: 169.
- O'Reilly, C.E., O'Connor, P., Kelly, A., Beresford, T.P., Murphy, P.M. (2000). Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4890-4896.
- Otero, A., García, M.C., García, M. L., Prieto, M., Moreno, B. (1988). Behaviour of *Staphylococcus aureus* strains, producers of enterotoxins C1 and C2, during the manufacture and storage of Burgos cheese. *J. Appl. Bacteriol.* 64: 117-122.
- Padhye, N.V., Doyle, M.P. (1992). *Escherichia coli* O157:H7: Epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. *J. Food Protect.* 55: 555-565.
- Pagán, R., Mañas, P., Raso, J., Condón, S. (1999a). Bacterial resistance to ultrasonic waves under pressure at not lethal (Manosonication) and lethal (Manothermosonication) temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 297-300.
- Pagán, R., Mañas, P., Alvarez, I., Condón, S. (1999b). Resistance of *Listeria monocytogenes* to ultrasonic waves under pressure at sublethal (Manosonication) and lethal (Manothermosonication) temperatures. *Food Microbiol.* 16: 139-148.

- Pagán, R., Mackey, B. (2000). Relationship between membrane damage and cell death in pressure-treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential and stationary-phase cells and variation among strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2829-2834.
- Palaniappa, S., Sastry, S.K., Richter, E.R. (1990). Effects of electricity on microorganisms: A review. *J. Food Process Preserv.* 14: 393-415.
- Palumbo, S.A. (1992). Injury in emerging foodborne pathogens and their detection. En: *Injured index and pathogenic bacteria*. Ray, B. (ed). CRC Press, Boca Raton, FL., págs. 115-131.
- Palumbo, S.A., Morgan, D.R., Buchanan, R.L. (1985). Influence of the temperature, NaCl, and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila*. *J. Food Sci.* 50: 1417-1421.
- Parente, E., Hill, C. (1992a). Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 55: 497-508.
- Parente, E., Hill, C. (1992b). Inhibition of *Listeria* in buffer, broth, and milk by enterocin 1146, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *J. Food Protect.* 55: 503-502.
- Parente, E., Hill, C. (1992c). A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 290-298.
- Parente, E., Giglio, M.A, Ricciardi, A., Clememti, F. (1998). The combined effect of nisin, Leucocin F10, pH, NaCl and EDTA on the survival of *Listeria monocytogenes* in broth. *Int. J. Food Microbiol.* 40: 65-75.
- Patterson, M.F., Quinn, M., Simpson, R., Gilmour, A. (1995). Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and food. *J. Food Protect.* 58: 524-529.
- Patterson, M.F., Kilpatrick, D.J. (1998). The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. *J. Food Protect.* 61: 432-436.
- Pawar, D.D., Malik, S.V.S., Bhilegaonkar, K.N., Barbuddhe, S.B. (2000). Effect of nisin and its combination with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. *Meat Sci.* 56: 215-219.
- Payne, K.D., Davidson, P.M., Oliver, S.P., Christen, G.L. (1990). Influence of bovine lactoferrin on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 53: 468-472.
- Pearson, A.D., Greenwood, M.H., Donaldson, J., Healing, T.D., Jones, D.M., Shahamat, M., Feltham, R.K.A., Colwell, R.R. (2000). Continuous source outbreak of campylobacteriosis traced to chicken. *J. Food Protect.* 63: 309-314.
- Pedersen, P.J. (1991). Microfiltration for the reduction of bacteria in milk and brine. *FIL-IDF special issue 9201*: 33-50.
- Pemberton, J.M., Kidd, S.P., Schmidt, R. (1997) Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol. Lett.* 152(1): 1-10.
- Piard, J.C., Desmazeaud, M. (1991). Inhibiting factors produced by latic acid bacteria. 1. Oxigen metabolites and catabolism end-products. *Lait* 71: 525-541.
- Piard, J.C., Desmazeaud, M. (1992). Inhibiting factors produced by latic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait* 72: 113-142.

- Piard, J.C., Muriana, P.M., Desmazeaud, M.J., Klaenhammer, T.R. (1992). Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 279-284.
- Pol, I.E., Mastwijk, H.C., Slump, R.A., Popa, M.E., Smid, E.J. (2001). Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment, and carvacrol. *J. Food Protect.* 64: 1012-1018.
- Ponce, E., Pla, R., Sendra, E., Guamis, B., Mor-Mur, M. (1998). Combined effect of nisin and high hydrostatic pressure on destruction of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* in liquid whole egg. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 15-19.
- Pothakamury, U.R., Monsalve-Gonzalez, A., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. (1995). Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in model foods by pulsed electric fields technology. *Food Res. Int.* 28: 167-171.
- Potter, M.E., Blaser, M.J., Sikes, R.K., Kaufmann, A.F., Wells, J.G. (1983). Human *Campylobacter* infection associated with certified raw milk. *Am. J. Epidemiol.* 117: 475-483.
- Powrie, W.D., Nakai, S. (1986). The chemistry of eggs and egg products. En: *Egg science and technology*. Stadelman, W.J., Catterill, O.J. (eds). AVI Publishing, Westport, CT., págs. 97.
- Prentice, G.A., Neaves, P. (1986). The role of microorganisms in the dairy industry. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.*, págs. 43S-57S.
- Pruitt, K.M., Tenovuo, J., Andrews, R.W., McKane, T. (1982). Lactoperoxidase-catalyzed oxidation products. *Biochemistry* 21: 562-67.
- Pucci, M.J., Vedamuthu, E.R., Sunka, B.S., Vanderbergh, P.A. (1988). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2349-2353.
- Qin, B.L., Pothakamury, U.R., Vega, H., Martín, O., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. (1995). Food pasteurization using high-intensity pulsed electric fields. *Food Technol.* 49: 55-60.
- Quadri, L.E.N., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E. (1994). Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J. Biol. Chem.* 269: 12204-12211.
- Quinto, E.J., Cepeda, A. (1997). Incidence of toxigenic *Escherichia coli* in soft cheese made with raw or pasteurized milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 291-295.
- Raccach, M., Geshell, D.J. (1993). The inhibition of *Listeria monocytogenes* in milk by pediococci. *Food Microbiol.* 10: 181-186.
- Rademacher B.; Kessler H.G. (1997). Inactivation of microorganisms and enzymes in pressure-treated raw milk. En: *High pressure research in the biosciences and biotechnology*. Heremans, K. (ed). Leuven University Press, Leuven, págs. 291-294.
- Radomyski, T., Murano, E.A., Olson, D.G., Murano, P.S. (1994). Elimination of pathogens of significance in food by low-dose irradiation: A review. *J. Food Protect.* 57: 73-86.

- Raffalli, J., Rosec, J.P., Carlez, A., Dumay, E., Richard, N., Cheftel, J.C. (1994). Stress et inactivation par haute pression de *Listeria innocua* introduites dans une crème laitière. *Sci. Aliment.* 14: 349-358.
- Ramsaran, H., Chen, J., Brunke, B., Hill, A., Griffiths, M.W. (1998). Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in soft cheeses. *J. Dairy Sci.* 81: 1810-1817.
- Rasch, M. (2002). The influence of temperature, salt and pH on the inhibitory effect of reuterin on *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 72: 225-231.
- Rasch, M., Knochel, S. (1998). Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin a. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 275-278.
- Raso, J. (2000). La conservación de los alimentos por ultrasonidos. En: XII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Sociedad Española de Microbiología, Oviedo, págs. 83-88.
- Ray, B. (1993). Sublethal injury, bacteriocins, and food microbiology. *ASM News* 59: 285-291.
- Reina, L.D., Jin, Z.T., Zhang, Q.H., Yousef, A.E. (1998). Inactivation of *Listeria monocytogenes* in milk by pulsed electric field. *J. Food Protect.* 61: 1203-1206.
- Reiter, B., Oram, J.B. (1967). Bacterial inhibitors in milk and other biological fluids. *Nature* 216: 328-332.
- Reiter, B. (1978). Review of the progress of dairy science: Antimicrobial systems in milk. *J. Dairy Res.* 45: 131-136.
- Reiter, B., Härnult, G. (1984). Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. *J. Food Protect.* 47: 724-732.
- Reitsma, C.J., Henning, D.R. (1996). Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of Cheddar cheese. *J. Food Protect.* 59: 460-464.
- Rekhif, N., Atrih, A., Lefebvre, G. (1994). Selection and properties of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains. *Curr. Microbiol.* 28: 237-241.
- Reps, A., Kolakowski, P., Dajnowiec, F. (1997). The effect of high pressure on microorganisms and enzymes of ripening cheeses. 35th meeting on High Pressure Food Science, Biocience and Chemistry of the EHPRG. Reading.
- Requena, T., Peláez, C. (1995). Revisión: Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* 35: 19-44.
- Ribero, A., Marquez, M., Santos, J., Pinedo, A., Sanchez, M.A., Esteve, A., Samper, S., Maertín, C. (2001). High rate of tuberculosis reinfection during a nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* strain B. *Clin. Infect Dis.* 32: 159-161.
- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Devis, B.R. (1982). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308: 681-685.
- Roberts, R.F., Zottola, E.A., McKay, L.L. (1992). Use of a nisin-producing starter culture suitable for Cheddar cheese manufacture. *J. Dairy Sci.* 75: 2353-2363.

- Roberts, T.A., Baird-Parker, A.C., Tompkin, R.B. (eds) (1996a). *Salmonellae*. En: Microorganisms in food 5. Microbiological specifications of food pathogens. Blackie Academic & Profesional. London, págs. 217-264.
- Roberts, T.A., Baird-Parker, A.C., Tompkin, R.B. (eds) (1996b). *Campylobacter*. En: Microorganisms in food 5. Microbiological specifications of food pathogens. Blackie Academic & Profesional. London, págs. 45-65.
- Roberts, T.A., Baird-Parker, A.C., Tompkin, R.B. (eds) (1996c). *Listeria monocytogenes*. En: Microorganisms in food 5. Microbiological specifications of food pathogens. Blackie Academic & Profesional. London, págs. 141-182.
- Roberts, T.A., Baird-Parker, A.C., Tompkin, R.B. (eds) (1996d). *Bacillus cereus*. En: Microorganisms in food 5. Microbiological specifications of food pathogens. Blackie Academic & Profesional. London, págs. 20-35.
- Robins-Browne, R.M. (1997). *Yersinia enterocolitica*. En: Food microbiology. Fundamentals and frontiers. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (eds). AMS Press. Washington D.C., págs. 192-215.
- Rocourt, J., Cossart, P. (1997). *Listeria monocytogenes*. En: Food microbiology. Fundamentals and frontiers. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (eds). AMS Press. Washington D.C., págs. 337-352
- Rodríguez, J.L., Gaya, P., Medina, M., Nuñez, M. (1994). Incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in ewes' raw milk. J. Food Protect. 57: 571-575.
- Rodríguez, J.M. (1996). Revisión: Espectro antimicrobiano, estructura, propiedades y modo de acción de la nisina, una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*. Food Sci. Technol. Int. 2: 61-68.
- Rodríguez, E., Tomillo, J., Nuñez, M., Medina, M. (1997). Combined effect of bacteriocin-producing lactic acid bacteria and lactoperoxidase system activation on *Listeria monocytogenes* in refrigerated raw milk. J. Appl. Bacteriol. 83: 389-395.
- Rodríguez, E., Gaya, P., Nuñez, M., Medina, M. (1998). Inhibitory activity of a nisin-producing starter culture on *Listeria innocua* in raw ewes milk Manchego cheese. Int. J. Food Microbiol. 39: 129-132.
- Rodríguez, E., Arqués, J.L., Gaya, P., Nuñez, M., Medina, M. (2000). Behaviour of *Staphylococcus aureus* in semi-hard cheese made from raw milk with nisin-producing starter cultures. Milchwissenschaft 55: 633-635.
- Rodríguez, E., Arqués, J.L., Gaya, P., Nuñez, M., Medina, M. (2001). Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocins and monitoring of bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization in semi-hard raw milk cheese. J. Dairy Res. 68: 131-137.
- Rogers, L.A. (1928). The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. J. Bacteriol. 16: 321-325.
- Ronner, A.B., Degnan, A.J., Jhnson, M.E., Luchansky, J.B., Wong, A.C.L. (1999). Growth and biocontrol of enterotoxigenic *Bacillus cereus* in infant milk formula and processed cheese prepared with milk powder. Annual Report of Food Reseach Institute 1999: 23-24.

- Ronk, R. (1988). Nisin preparation; affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Fed. Regist.* 53: 11247-11251.
- Rosenberg, U. and Bögl, W. 1987. Microwave pasteurization, sterilization, blanching, and pest control in the food industry. *Food Technol.* 41: 92-99.
- Rosso, L., Bajard, S., Flandrois, J.P., Lahellec, C., Fournaud, J., Veit, P. (1996). Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C: consequences for the shelf life of chilled products. *J. Food. Protect.* 9: 944-949.
- Roundy, Z.D. (1967). *Salmonella, Staphylococcus* and pathogens. In: Annual Marschall Italian. Specialty cheese seminars, Wisconsin, USA.
- Rowan, N.J., McGregor, S.J., Anderson, J.G., Cameron, D., Farish, O. (2001). Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* by pulsed electric fields. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2833-2836.
- Rudolf, M., Schered, S. (2001). High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *Int J. Food Microbiol.* 63: 91-98.
- Ruhr, E., Sahl, H.-G. (1985). Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on artificial membrane vesicles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27: 841-845.
- Ryser, E.T., Marth, E.H. (1987). Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *J. Food Protect.* 50: 7-13.
- Sahl, H.-G. (1985). Influence of the staphylococcin-like peptide Pep5 on membrane potential of bacterial cells and cytoplasmic membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 162: 833-836.
- Sahl, H.-G., Jack, R.W., Bierbaum, G. (1995). Biosynthesis and biological activities of lanthibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.* 230: 827-853.
- Sahl, H.-G., Bierbaum, G. (1998). Lanthibiotics: Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 41-79.
- Samyn, B., Martínez-Bueno, M., Devreese, B., Maqueda, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Coyette, J., Van Beeumen, J. (1994). The cyclic structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *FEBS Lett.* 352: 87-90.
- Sandblom, R.M. (Alfa Laval) (1974). Filtering process. Patent 2W 74 16 257.
- Sang, U.L., Quesnell, M., Fox, L.K., Jang, W.Y., Yong, H.P., Davis, W.C., Falk, D., Deobald, C.F., Bohach, G.A. (1998). Characterization of staphylococcal bovine mastitis isolates using the polymerase chain reaction. *J. Food Protect.* 61: 1384-1386.
- Santos, J.A., González, C., García -López, M.L., García-Fernández, M.C., Otero, A. (1994). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against *Aeromonas hydrophila* in broth, skim milk and ewes' milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 19: 161-164.
- Santos, J.A., López-Díaz, T.M., García-Fernández, M.C., García-López, M.L., Otero, A. (1995). Antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *Aeromonas hydrophila* and psychrotrophs during the manufacturing of Spanish sheep fresh cheese Villalón. *Milchwissenschaft* 50: 690-692.

- Santos, J.A., López-Díaz, T.M., García-Fernandéz, M.C., García -López, M.L., Otero, A. (1996). Villalón, a fresh, ewe's milk spanish cheese, as source of potentially pathogenic *Aeromonas* strains. *J. Food Protect.* 59: 1288-1291.
- Schiemann, D.A. (1980). *Yersinia enterocolitica*: observations on some growth characteristics and response to selective agents. *Can. J. Microbiol.* 26: 1232-1240.
- Schiemann, D.A. (1987). *Yersinia enterocolitica* in milk and dairy products. *J. Dairy Sci.* 70: 383-391.
- Schillinger, U., Cung, H.S., Keppler, K., Holzapfel, W.H. (1998). Use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria to inhibit spontaneous nisin-resistant mutants of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Appl. Microbiol.* 85: 657-663.
- Schillinger, U., Becker, B., Vignolo, G., Holzapfel, W.H. (2001). Efficacy of nisin in combination with protective cultures against *Listeria monocytogenes* Scott A in tofu. *Int J. Food Microbiol.* 71: 159-168.
- Schleifer, K.H., Ludwig, W. (1995). Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Syst. Appl. Microbiol.* 14: 461-467.
- Schmidt, K., Tirado, C. (eds). (2001). WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe. Seventh report 1993-1998. Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine (BgVV) FAO/WHO Collaborating Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses. Berlin, págs. 321-333.
- Schutz, H., Radler, F. (1984). Anaerobic reduction of glycerol to propanediol-1,3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *System. Appl. Microbiol.* 5: 169-178.
- Schedv, F., Henis, Y., Yuven, B.J. (1994). Response of spheroplasts and chelator-permeabilized cells of Gram-negative bacteria to the action of the bacteriocins pediocin SJ-1 and nisin. *Int. J. Food. Microbiol.* 21: 305-314
- Scott, D., Hammer, F.E., Szalkucki, T.J. (1987). Bioconversion: enzyme technology. En: *Food biotechnology*. Knorr, D. (ed). Marcel Dekker Inc., New York, págs. 413-442.
- Sensoy, I., Zhang, Q.H., Sastry, S.K. (1997). Inactivation kinetics of *Salmonella dublin* by pulsed electric field. *J. Food Process Eng.* 20: 367-381.
- Sepúlveda-Ahumada, D.R., Ortega-Rivas, E., Barbosa-Cánovas, G.V. (2000). *Food Bioproducts Processing* 78: 65-71.
- Shindler, J.S., Childs, R.E., Bardsley, W.G. (1976). Peroxidase from human cervical mucus. *Eur. J. Biochem.* 65: 325-331.
- Sierra, I., Vidal-Valverde, C. (2000a). Influence of heating conditions in continuous-flow microwave or tubular heat exchange system on the vitamin B1 and B2 content of milk: *Lait* 80: 601-608.
- Sierra, I., Vidal-Valverde, C. (2000b). Effect of storage on the vitamin B1 content of microwave and conventionally treated milk. *Milchwissenschaft* 55: 253-255.
- Sionneau, M., Vasseur, J., Bouix, M., Pontvianne, P.M. (1997). Continuous high pressure treatment of milk. En: *High pressure research in the biosciences and biotechnology*. Heremans, K. (ed). Leuven University Press, Leuven, págs. 451-454.

- Sisson, J.W. (1989). Potencial of probiotic organisms to prevent diarrhoea and promote digestion in farm animals - A review. *J. Sci. Food Agric.* 49: 1-13.
- Skirrow, M.B.(1977). *Campylobacter enteritis*: a "new" disease. *Brit. Med.* 2: 9-11.
- Skudder, P.J. (1989). Ohmic heating in food processing. *Asean Food J.* 4: 10-11.
- Slutsker, L., Ries, A., Greene, K.D., Wells, J.G., Hutwagner, L., Griffin, P.M. (1997). *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiologic features. *Ann. Intern. Med.* 126: 505-513.
- Smiley, K.L., Sobolov, M. (1962). A cobamine-requiring glycerol dehydrase from an acrolein-forming *Lactobacillus*. *Arch Biochem. Biophys.* 97: 538-543.
- Smith, H.R., Cheasty, T., Roberts, D., Thomas, A., Rowe, B. (1991). Examination of retail chickens and sausages in Britain for vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2091-2093.
- Solomon, E.B., Hoover, D.G. (1999). *Campylobacter jejuni*: a bacterial paradox. *J. Food Safety* 19: 121-136.
- Sommers, E.B., Taylor, S.L. (1987). Antibotulinal effectiveness of nisin in pasteurized process cheese spreads. *J. Food Protect.* 50: 842-848.
- Song, H.J., Richard, J. (1997). Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 155-161.
- Spahr, U., Url, B. (1994). Behaviour of pathogenic bacteria in cheese – a synopsis of experimental data. *Bull. IDF* 298: 2-16.
- Speck, M.L., Dobrogosz, W.J., Casas, I.A. (1993). *Lactobacillus reuteri* in food supplementation. *Food Technol.* 47: 90-94.
- Stabel, J.R. (2000). Johne´s disease and milk: do consumers need to worry? *J. Dairy Sci.* 83: 1659-1663.
- Stabel, J.R., Pearce, L., Chandle, R., Hammer, P., Klijn; N., Cerf, O., Collins, M.T., Heggum, C., Murphy, P. (2001). Destruction by heat of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk and milk products. *Bull. Int Dairy Federation* 362: 53-61.
- Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., Klaenhammer, T.R. (1991). Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3613-3615.
- Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., Klaenhammer, T.R. (1992). Effect of treatment conditions on nisin inactivation of Gram-negative bacteria. *J. Food Protect.* 55: 763-766.
- Stiles, M.E. (1989). Less recognized or presumptive foodborne pathogenic bacteria. En: *Foodborne bacterial pathogens*. Doyle, M.P. (ed). Marcel Dekker, New York, págs. 673-719.
- Stiles, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Anton. Leeuwenhoek Int. J. Gen. M.* 70: 331-345.
- Stiles, M.E., Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.

- Stoffels, G., Gudmundsdottir, A., Abee T. (1994). Membrane-associated proteins encoded by the nisin gene cluster may function as a receptor for the antibiotic carnocin UI49. *Microbiology* 140: 1443-1450.
- Styles, M.F., Hoover, D.G. and Farkas, D.F. 1991. Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *J. Food Sci.* 56: 1404-1407.
- Suslick, K.S. (1990). Sonochemistry. *Science* 247: 1439-1445.
- Tacket, C.O., Narain, J.P., Sattin, R., Lofgren, J.P., Konigsberg, C., Rendtorff, R.C., Rausa, A., Davis, B.R., Cohen, M.L. (1984). A multistate outbreak of infections caused by *Yersinia enterocolitica* transmitted by pasteurized milk. *JAMA* 251: 483-486.
- Talarico, T.L., Casas, I.A., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J. (1988). Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1854-1858.
- Talarico, T.L., Dobrogosz, W.J. (1989). Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 674-679.
- Talarico, T.L., Dobrogosz, W.J. (1990). Purification and characterization of glycerol dehydratase from *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1195-1197.
- Talarico, T.L., Axelsson, T.L., Novotny, J., Fiuzat, M., Dobrogosz, W.J. (1990). Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: purification of 1,3-propanediol: NAD⁺ oxidoreductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 943-948.
- Tauxe, R.V. (2001). Food safety and irradiation: Protecting the public from foodborne infections. *Emerg. Infect. Dis. Suppl.* 3: 516-521.
- Ter Steeg, F.P., Hellemons, J.C., Kok, A.E. (1999). Synergistic actions of nisin, sublethal ultrahigh pressure, and reduced temperature on bacteria and yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4148-4154.
- Terebiznik, M.R., Jagus, R.J., Cerrutti, P., de Huergo, M.S., Pilosof, A.M.R. (2000). Combined effect of nisin and pulsed electric fields on the inactivation of *Escherichia coli*. *J. Food Protect.* 63: 741-746.
- Tewari, G., Jayas, D.S., Holley, R.A. (1999). High pressure processing of foods: an overview. *Sci. Aliment.* 19: 619-661.
- Thomas, E.L., Aune, T.M. (1978). Lactoperoxidase, peroxide, thiocyanate antimicrobial system: correlation of sulfhydryl oxidation with antimicrobial action. *Infect. Immunity* 20: 456-463.
- Thomas, L.V., Wimpenny, J.W.T. (1996). Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2006-2012.
- Threlfall, E.J., Ward, L.R., Frost, J.A., Willshaw, G.A. (2000). The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 1-5.
- Tichaezek, P.S., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Vogel, R.F., Hammes, W.P. (1992). Characterization of the bacteriocin curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin from *L. sake* LTH673. *Syst. Appl. Microbiol.* 1: 460-468.

- Tong, I.T., Cameron, D.C. (1992). Enhancement of 1,3-propanediol production by cofermentation in *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* *dha* regulon genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 149-159.
- Toraya, T., Ushio, K., Fukui, S. (1980). Distribution of coenzyme B12-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase in selected genera of *Enterobacteriaceae* and *Propionibacteriaceae*. *J. Bacteriol.* 141: 1439-1442.
- Tran, T.T. (1998). A blood free enrichment medium for growing *Campylobacter* spp. under aerobic conditions. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 145-148.
- Tseng, C.P., Montville, T.J. (1993). Metabolic regulation of end product distribution in lactobacilli: causes and consequences. *Biotechnol. Prog.* 9: 113-121.
- Turnbull, P.C.B. (1986). *Bacillus cereus* toxins. En: Pharmacology of bacterial toxins. *Internacional encyclopedia of farmacology and therapeutics*, section 119. Doner, F., Drews, J. (ed). Pergamon Press, Oxford, págs. 397-448
- Ueckert, J.E., Steeg, P.F., Coote, P.J. (1998). Synergistic antibacterial action of heat in combination with nisin and magainin II amide. *J. Appl. Microbiol.* 85: 487-494.
- Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* 56: 395-411.
- Vachon, J.F., Kheard, E.E., Giasson, J., Paquin, P., Fliss, I. (2002). Inactivation of food borne pathogens in milk using dynamic high pressure. *J. Food Protect.* 65: 345-352.
- Valero, E., Villamiel, M., Sanz, J., Martinez-Castro, I. (2000). Chemical and sensorial changes in milk pasteurised by microwave and conventional systems during cold storage. *Food Chem.* 70: 77-81.
- Valero, E., Sanz, J., Martinez-Castro, I. (1999). Volatile components in microwave and conventionally heated milk. *Food Chem.* 66: 333-338.
- Van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Jeeninga, R.E., Kok, J., Venema, G. (1991). Organization and nucleotide sequences of two lactococcal bacteriocin operons. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 492-498.
- Van Belkum, M.J., Kok, J., Venema, G. (1992). Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of *lcnB*, a third bacteriocin determinant from the lactococcal bacteriocin plasmid p9B4-6. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 572-577.
- Van Demark, P.J., Batzing, B.L. (1987). *The microbes. An introduction to their nature and importance*, Benjamin-Cummings, Menlo Park, CA, págs. 118-136.
- Van den Hooven, H.W., Doeland, C.C.M., Van de Kamp, M., Konings, R.N.H., Hilbers, C.W., Van de Ven, F.J.M. (1996a). Three-dimensional structure of the lantibiotic nisin in the presence of membrane-mimetic micelles of dodecyl-phosphocholine and of sodium dodecylsulphate. *Eur. J. Biochem.* 235: 382-393.
- Van den Hooven, H.W., Spronk, CAEM., HW., Van de Kamp, M., Konings, R.N.H., Hilbers, C.W., Van de Ven, F.J.M. (1996b). Surface location and orientation of the lantibiotic nisin bound to membrane-mimicking micelles of dodecyl-phosphocholine and of sodium dodecylsulphate. *Eur. J. Biochem.* 235: 394-403.

- Van de Ven, F.J.M., Van den Hooven, H.W., Konings, R.N.H., Hilbers, C.W. (1991). NMR studies of lantibiotics: the structure of nisin in aqueous solution. *Eur. J. Biochem.* 202: 1181-1188.
- Van Netten, P., Perales, J., Van de Moosdijk, A., Curtis, G.D.W., Mossel, D.A.A. (1989). Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 8: 299-316.
- Van Netten, P., Van de Moosdijk, A., Van Hoensel, P., Mossel, D.A.A., Perales, I. (1990). Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 73-79.
- Vandenbergh, P.A. (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 221-238.
- Vega-Mercado, H., Martín Belloso, O., Qin, B.L., Chang, F.J., Góngora-Nieto, M.M., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. (1997). Non-thermal food preservation: pulsed electric fields. *Trends Food Sci. Technol.* 8: 151-157.
- Venema, K., Abee, T., Haandrikman, A.J., Leenhouts, K.J., Kok, J., Konings, W.N., Venema, G. (1993). Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1041-1048.
- Venema, K., Haverkort, R.E., Abee, T., Haandrikman, A.J., Leenhouts, K.J., Leij, L.D., Venema, G. (1994). Mode of action of Lci A, the lactococcin A immunity protein. *Mol. Microbiol.* 16: 521-532.
- Venema, K., Venema, G., Kok, J. (1995). Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. *Trends in Microbiol.* 3: 299-304.
- Venema, K., Dost, M.H.R., Beum, P.A.H., Haandrikman, A.J., Venema, G., Kok, J. (1996a). The genes for secretion and maturation of lactococcins are located on the chromosome of *Lactococcus lactis* IL 1403. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1689-1692.
- Venema, K., Dost, M.H.R., Venema, G., Kok, J. (1996b). Mutational analysis and chemical modification of Cys24 of lactococcin B, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. *Microbiology* 142: 2825-2830.
- Vessoni Penna, C.T., Moraes, D.A., Fajardo, D.N. (2002). The effect of nisin on growth kinetics from activated *Bacillus cereus* spores in cooked rice and in milk. *J. Food Protect.* 65: 419-422.
- Vernozy-Rozand, C., Meyrand, A., Mazuy, C., Delignette-Muller, M.L., Jaubert, G., Perrin, G., Lapeyre, C., Richard, Y. (1998). Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goats' milk lactic cheeses. *J. Dairy Res.* 65: 273-281.
- Vignolo, G.M., Suriani, F., de Ruiz Holgado, A.P., Oliver, G. (1993). Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 344-349.
- Villar, R.G., Macek, M.D., Simons, S., Hayes, P.S., Goldoft, M.J., Lewis, J.H., Rowan, L.L., Hursh, D., Patnode, M., Mead, P.S. (1999). Investigation of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT104 infections linked to raw-milk cheese in Washington State. *JAMA* 281: 1811-1816.

- Vosniakos, F.K., Hatzioannou, K.A. (1997). The preservation and maturing of dairy products by using an irradiation process. *Advan. Food Sci.* 19: 8-11.
- Walker, S.J., Arher, P., Banks, J.G. (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 157-162.
- Wan, J., Gordon, J.B., Muirhead, K., Hickey, M.W., Coventry, M.J. (1997a). Incorporation of nisin in micro-particles of calcium alginate. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 153-158.
- Wan, J., Harmack, K., Davidson, B.E., Hillier, A.J., Gordon, J.B., Wilcock, A., Hickey, M.W., Coventry, M.J. (1997b). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by piscicolin 126 in milk and Camembert cheese manufactured with a thermophilic starter. *J. Appl. Bacteriol.* 82: 287-291.
- Wandling, L.R., Sheldon, B.W., Foegeding, P.M. (1999). Nisin in milk sensitizes *Bacillus* spores to heat and prevents recovery of survivors. *J. Food Protect.* 62: 492-498.
- Weinberg, E.D. (1978). Iron and infection. *Microbiol. Rev.* 42: 45-66.
- Wever, R., Kast, W.M., Kasinoedin, J.H., Boelens, R. (1982). The peroxidation of thiocyanate catalysed by myeloperoxidase and lactoperoxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 709: 212-219.
- WHO (1981). Wholesomeness of Irradiated Food. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee. Technical Report 651, WHO, Geneva.
- WHO (1994). Review of the safety and nutritional adequacy of irradiated food. Report of a WHO Consultation; Geneva, 20-22 May 1992. WHO, Geneva.
- Wilhoit, D.L. (1996). Surface treatment of foodstuffs with antimicrobial compositions. U.S. Patent 5,573,801.
- Wolfson, L.M., Summer, S.S. (1993). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: a review. *J. Food Protect.* 56: 887-892.
- Wolfson, L.M., Summer, S.S. (1994). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against *Salmonella typhimurium* in trypticase soy broth in the presence and absence of a heat treatment. *J. Food Protect.* 57: 365-368.
- Wood, J.L. (1975). Biochemistry. En: Chemistry and biochemistry of thiocyanic acid and its derivatives. Newman, A.A. (ed). Academic Press, London.
- Worobo, R.W., Henkel, T., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E. (1994). Characteristics and genetic determinants of a hydrophobic peptide bacteriocin carnobacteriocin A produced by *Carnobacterium piscicola* IV17A. *Microbiology* 140: 517-526.
- Yang, R., Ray, B. (1994). Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 11: 281-291.
- Yokoyama, H., Hashimoto, S., Motobayashi, N. (1993). Method for ripening cheese under high pressure. U.S. Patent 5,180,596.
- Zajac, M., Gladys, J., Skarzynska, G., Harnuly, G., Björck, L. (1983). Changes in bacteriological quality of raw milk stabilized by activation of its lactoperoxidase system and stored at different temperatures. *J. Food Protect.* 46: 1065-1068.

- Zapico, P. (1993). El sistema lactoperoxidasa en leche de cabra. Aplicación a la mejora de su calidad microbiológica. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Madrid.
- Zapico, P., Gaya, P., Nuñez, M., Medina, M. (1993). Goats' milk lactoperoxidase system against *Listeria monocytogenes*. J. Food Protect. 56: 988-990.
- Zapico, P., Gaya, P., Nuñez, M., Medina, M. (1995). Activity of goats' milk lactoperoxidase system on *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli* at refrigeration temperatures. J. Food Protect. 58: 1136-1138.
- Zapico, P., Medina, M., Gaya, P., Nuñez, M. (1998). Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk. Int. J. Food Microbiol. 40: 35-42.
- Zapico, P., de Paz, M., Medina, P., Nuñez, M. (1999). The effect of homogenization of whole milk, skim milk and milk fat on nisin activity against *Listeria innocua*. Int. J. Food Microbiol. 46: 151-157.
- Zehren, V.L., Zehren, V.F. (1968). Examination of large quantities of cheese for staphylococcal enterotoxin A. J. Dairy Sci. 51: 635.
- Zimmerman, U. (1986). Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. Biochem. Pharmacol. 105: 175-256.
- Zoltai, P., Swearingen, P. (1996). Product development considerations for ohmic processing. Food Technol. 50: 263-266.
- Zottola, E.A., Yezzi, T.L., Ajao, D.B., Roberts, R.F. (1994). Utilization of Cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods. Int. J. Food Microbiol. 24: 227-238.