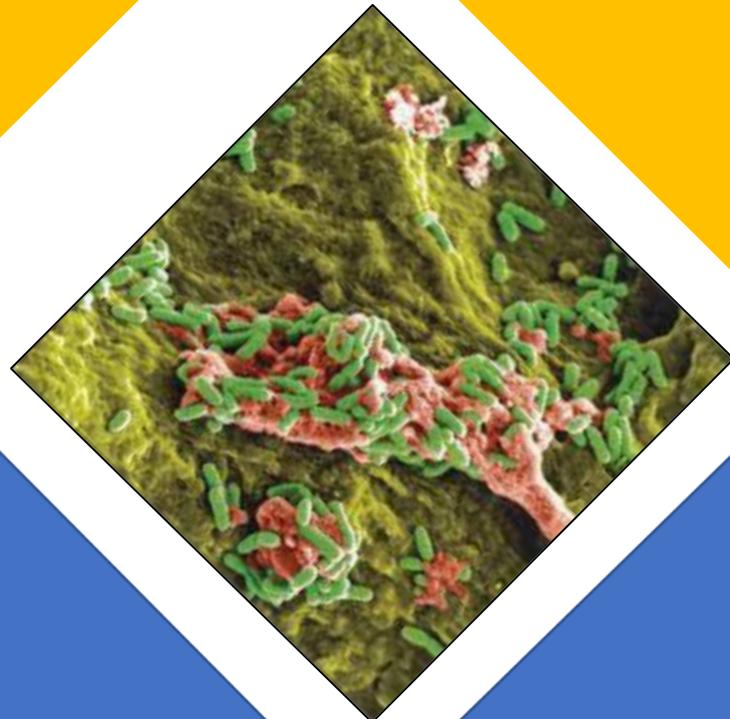


**Caracterización fenotípica de cepas de
Listeria monocytogenes aisladas en
carne de pollo. Empleo de bacterias
ácido lácticas nativas como
antagonistas**





UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE MAGÍSTER EN AGRONOMÍA

**Caracterización fenotípica de cepas de
Listeria monocytogenes aisladas en carne de
pollo. Empleo de bacterias ácido lácticas
nativas como antagonistas**

Ing. Agr. Darío Alejandro Lincor

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2023

Prefacio

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Magíster en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Agronomía bajo la dirección de la Mg. Carmen Matilde Salerno y del Dr. Hugo Laborde.

Ing. Agr. Darío Alejandro Lincor



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el...../...../....., mereciendo la calificación la de.....(.....)

Agradecimientos

En este espacio quiero dedicar mis agradecimientos a los responsables que de alguna u otra forma, contribuyeron de manera significativa para que esta meta se haga realidad. Todos ellos fueron fundamentales para alcanzar lo que en un principio creía imposible.

En primer lugar, quiero agradecer a mi flamante codirectora Carmen Salerno; fuiste mi referente y ejemplo a seguir para transitar este largo y arduo camino. Querida Carmen, gracias por guiarme con tu sabiduría, solidaridad, humildad y sencillez en cada paso realizado. Por ayudarme a concretar cada objetivo y apoyarme siempre en las decisiones que tomaba. Con vos aprendí todo lo humano que hay que tener en la vida para triunfar sanamente. Además de enseñarme todos los conocimientos técnicos del laboratorio y de acompañarme en todo momento, fuiste el pilar fundamental para sostenerme emocionalmente cuando la confianza y la paciencia se me desvanecía por completo... eternamente agradecido por todo lo que hiciste...

A mi bella y amada madre... la persona que siempre creyó en mí desde el instante cero, quien me brindó todo su apoyo incondicional y se alegró por cada logro personal y profesional que me tocó vivir... te amo ma...

A mi hermanita Silvina... por darme siempre una palabra de aliento en los momentos más difíciles, quien me aconsejó y me brindó respuestas concisas en días de incertidumbre... gracias mana

A C.B, una persona muy especial en una etapa de mi vida... la primera que depositó en mí una convicción infinita para poder lograr todo lo que me proponía...

A Guille... con quién trabajé por primera vez y me dio la oportunidad de escaparme en esos viajes de cadete, para empezar a hilvanar este camino... gracias amigo donde quieras que estés... siempre te tengo presente en mi corazón...

A mis amigos... no nombro a todos porque gracias a Dios tengo muchos, pero voy a agradecer particularmente a Laura y a Jorge... con ustedes disfruté los momentos más felices de unos de los ciclos más importantes de mi vida... todos los acontecimientos que compartimos durante los años que estuve en la Universidad, son de un valor inmensurable y permanecerán indelebles en mi memoria...

A mi gran ídolo Lío Messi (mi capitán)... por incentivarme a creer... quien me enseñó a ser resiliente y a confiar en mis propias capacidades y virtudes... a seguir intentándolo una y otra vez pese a las derrotas y adversidades... y a jamás darse por vencido ni aún vencido...

Agradecer a Dios, al Universo y a la Vida... porque siempre confié en que no había imposibles y que la recompensa iba a llegar algún día... que cumplir los sueños está al alcance de la mano y que el éxito está a la vuelta de la esquina... (solamente hay que salir del estado de confort)...

Y por último quisiera mencionar que esta Tesis va dedicada a mi amigo del alma Miguel Alvarado. Sé que desde algún bello lugar me estás acompañando... Siempre voy a recordar con mucho amor nuestras intensas charlas en el laboratorio, con mates lavados de por medio. Y aunque la vida no me permitió compartir más momentos con vos, quedaste grabado en lo más profundo de mis sentimientos querido amigo... Le agradezco infinitamente a Dios haberte conocido...

Gracias... Totales

RESUMEN

En Argentina, la explotación avícola se ha intensificado progresivamente hasta convertirse en industrial. Tal situación, ha conducido a mayores riesgos de contraer enfermedades de origen alimentario a través del consumo de carne contaminada. La transmisión de microorganismos patógenos en la cadena productiva se asocia con la crianza de los animales, el tratamiento en las plantas de faena y la manipulación durante la comercialización. Dentro de los patógenos alimentarios, *Listeria monocytogenes* es uno de los más importantes, debido a su impacto económico e interés para la salud pública. Esta bacteria crece a temperaturas de refrigeración y se adapta a diferentes condiciones de estrés.

En la búsqueda de alternativas seguras e inocuas para controlar *L. monocytogenes* surge explorar el potencial de las bacterias ácido lácticas (BAL) endógenas de pollos parrilleros. Estas cumplen un rol fundamental en el mantenimiento de la microbiota intestinal y la homeostasis, pudiendo inhibir cepas potencialmente patógenas a través de la producción de sustancias inhibidoras tipo bacteriocinas. Dentro de las estrategias para promover su desarrollo, se encuentra el empleo de dietas basadas en probióticos u otros suplementos naturales. Hallar BAL adaptadas al ambiente intestinal que funcionen como antagonistas, es un desafío interesante por su fácil disponibilidad y bajo costo.

En este Trabajo de Tesis se evaluó previamente en el Capítulo I la calidad microbiológica de distintos cortes de pollo provenientes de comercios locales. Los resultados evidenciaron la presencia de *L. monocytogenes*, con otras especies acompañantes incluyendo *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* y *L. murrayi*. Posteriormente, en el Capítulo II se analizó la capacidad adaptativa de las cepas de *L. monocytogenes* en medios conteniendo 1,5 % y 3 % p/v de cloruro de

sodio (NaCl). Los estudios mostraron un comportamiento heterogéneo de las cepas frente a las distintas concentraciones de NaCl. Las diferencias observadas en el recuento se atribuyeron a la variabilidad fenotípica existente dentro de la especie.

En el Capítulo III se aislaron BAL en excretas provenientes de pollos sometidos a distintas dietas experimentales. Las dietas incluían suplementos basados en el probiótico *B. subtilis* y harina de chía (*Salvia hispánica* L.). Los resultados demostraron que la composición de la dieta altera de forma significativa la abundancia de BAL intestinales, con un efecto positivo tras la incorporación de la harina de chía. Finalmente, en el Capítulo IV se evaluó la capacidad antagonista de las BAL obtenidas. En este caso, se ensayaron sobrenadantes libres de células (SLC) sobre las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de la carne de pollo. Los estudios indicaron que ciertos SLC presentaron antagonismo, aunque la respuesta fue específica en cada caso. Se observó una gran variabilidad en el espectro de control (efectividad) y en la actividad antagónica, con diferencias significativas entre los halos de inhibición medidos.

Los datos presentados en esta Tesis, revelan que *L. monocytogenes* constituye un riesgo para la salud pública y que determinadas BAL nativas o autóctonas provenientes de las excretas, pueden ser útiles para su control. Estas BAL pueden resultar de interés tanto en el desarrollo de probióticos para aves, así como para la producción de sustancias antimicrobianas, de importancia en la industria alimentaria.

ABSTRACT

In Argentina, poultry farming has progressively intensified to become industrial. Such a situation has led to higher risks of contracting foodborne diseases through the consumption of contaminated meat. The transmission of pathogenic microorganisms in the production chain is associated with the rearing of animals, treatment in slaughter plants and handling during commercialization. Within the food pathogens, *Listeria monocytogenes* is one of the most important, due to its economic impact and interest for public health. This bacterium grows at refrigeration temperatures and adapts to different stress conditions.

In the search for safe and innocuous alternatives to control *L. monocytogenes*, it is necessary to explore the potential of endogenous lactic acid bacteria (LAB) from broiler chickens. These play a fundamental role in the maintenance of intestinal microbiota and homeostasis, being able to inhibit potentially pathogenic strains through the production of inhibitory substances such as bacteriocins. Among the strategies to promote its development, is the use of diets based on probiotics or other natural supplements. Finding LABs adapted to the intestinal environment that function as antagonists is an interesting challenge due to their easy availability and low cost.

In this Thesis Work, the microbiological quality of different cuts of chicken from local businesses was previously evaluated in Chapter I. The results showed the presence of *L. monocytogenes*, with other companion species including *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* and *L. murrayi*. Subsequently, in Chapter II, the adaptive capacity of *L. monocytogenes* strains in media containing 1.5 % and 3 % p/v sodium chloride (NaCl) was analyzed. The studies showed a heterogeneous behavior of the strains against the different concentrations of NaCl. The differences observed in the

count were attributed to the phenotypic variability existing within the species.

In Chapter III, LAB were isolated in excreta from chickens subjected to different experimental diets. The diets included supplements based on the probiotic *B. subtilis* and chia flour (*Salvia hispánica* L.). The results showed that the composition of the diet significantly alters the abundance of intestinal LAB, with a positive effect after the incorporation of chia flour. Finally, in Chapter IV the antagonistic capacity of the LAB obtained was evaluated. In this case, cell-free supernatants (SLC) were tested on *L. monocytogenes* strains isolated from chicken meat. Studies indicated that certain SLCs were antagonistic, although the response was specific in each case. A great variability was observed in the control spectrum (effectiveness) and antagonistic activity, with significant differences in the measured inhibition halos.

The data presented in this Thesis show that *L. monocytogenes* constitutes a risk to public health and that certain native or autochthonous LABs from excreta may be useful for its control. These LABs may be of interest either in the development of probiotics for poultry, as well as for the production of antimicrobial substances, of importance in the food industry.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN GENERAL	2
1.1 Situación actual de la Argentina en la producción de pollos (<i>Gallus gallus</i>).....	2
1.2 Características de la carne de pollo	5
1.3 Bioseguridad aviar.....	6
1.4 Cadena productiva de pollos parrilleros	7
1.5 Faena de aves.....	8
1.5.1 Lugar de procesamiento	8
1.5.2 Etapas de la faena	11
1.6 Microbiología de la carne de pollo.....	14
1.6.1 Carga microbiana.....	14
1.6.2 Higiene sanitaria previa a la comercialización.....	15
1.7 Enfermedades de transmisión alimentaria	16

CAPÍTULO I: *LISTERIA MONOCYTOGENES* COMO POTENCIAL PATÓGENO EMERGENTE DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA

1. Generalidades de la Listeriosis.....	19
1.1 Riesgo alimentario y epidemiología del agente patógeno	19
1.2 Características fenotípicas del género <i>Listeria</i> y de la especie <i>L. monocytogenes</i>	22
1.3 Ecología de <i>L. monocytogenes</i> : reservorios, distribución y transmisión.....	24
1.4 Virulencia y toxicidad alimentaria	26
1.5 Patogénesis	27
1.6 Invasión de <i>L. monocytogenes</i>	27
1.7 Serotipos dentro de la especie <i>L. monocytogenes</i>	29

1.8 Legislación y vigilancia epidemiológica.....	30
1.9 Medidas de control y prevención sanitaria en la cadena productiva de alimentos	32
1.10 Problemática en la erradicación de <i>L. monocytogenes</i> en la industria alimentaria.	34
1.10.1 Ineficiencia de agentes desinfectantes	34
1.10.2 Formación de biofilm.....	35
1.11 Problemática de control en la salud pública.....	36
1.11.1 Resistencia a los antibióticos	36
1.12 Tratamientos de inactivación de <i>L. monocytogenes</i> en alimentos.....	37
1.12.1 Métodos físicos.....	37
1.12.2 Métodos químicos.....	40
1.12.3 Métodos biológicos	41
1.13 Métodos de detección de <i>L. monocytogenes</i>	42
2. HIPÓTESIS.....	45
3. OBJETIVOS	46
3.1 Objetivos generales.....	46
3.2 Objetivos particulares	46
4. METODOLOGÍA.....	48
4.1 Aislamiento, caracterización e identificación y de <i>Listeria</i> spp. en carne de pollo	48
4.2 Tinción de Gram.....	51
4.3 Pruebas bioquímicas	52
4.3.1 Empleo de azúcares y polialcoholes como sustratos fermentables.....	52
4.3.2 Prueba del rojo de metilo.....	53
4.3.3 Voges-Proskauer (VP).....	54
4.3.4 Hidrólisis del almidón	55

4.3.5 Ensayo en medio SIM	55
4.3.6 Prueba de la catalasa.....	56
4.3.7 Reducción de nitratos	57
4.3.8 Prueba oxidasa.....	58
4.3.9 Prueba ureasa.....	59
4.3.10 Hemólisis en agar sangre	59
4.3.11 Prueba de CAMP (Christie Atkins y Munch Peterson).....	60
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN... ..	61
5.1 Presencia de <i>Listeria</i> spp. en carne de pollo de comercios locales.....	61
CAPÍTULO II: COMPORTAMIENTO DE LAS CEPAS AISLADAS DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO	
1. Capacidad adaptativa de <i>L. monocytogenes</i> en los alimentos en general.....	77
2. HIPÓTESIS.....	80
3. OBJETIVO... ..	81
3.1 Objetivos generales.....	81
3.2 Objetivos particulares	81
4. METODOLOGÍA.....	82
4.1 Análisis estadístico	83
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN... ..	84
5.1 Variabilidad fenotípica de las cepas aisladas de <i>L. monocytogenes</i> creciendo en dos concentraciones de NaCl	84

CAPÍTULO III: INCIDENCIA DE LA DIETA EN EL RECuento DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) PRESENTES EN EXCRETAS DE POLLOS

1.1 Sustentabilidad en la producción avícola y seguridad alimentaria	99
1.1.1 Uso de probióticos en la dieta de aves	100
1.1.2 Empleo de alimentos no tradicionales en la producción avícola	101
1.2 Rol de la microbiota intestinal de los pollos	102
1.3 Generalidades de las Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	104
2. HIPÓTESIS.....	107
3. OBJETIVO... ..	108
3.1 Objetivo general	108
3.2 Objetivo particular	108
4. METODOLOGÍA	
4.1 Localización e Instalaciones	109
4.2 Animales y Manejo.....	109
4.3 Dietas Experimentales	110
4.4 Diseño Experimental	114
4.5 Toma de muestras y aislamiento de BAL.....	115
4.6 Confirmación microbiológica de las BAL aisladas mediante pruebas fenotípicas	116
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1 Las excretas de pollos broiler son fuente de BAL nativas (endógenas)	118
5.2 La composición de la dieta de los pollos influye en el recuento de BAL de las excretas	121

CAPÍTULO IV: ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE BAL AISLADAS DE EXCRETAS DE POLLO SOBRE CEPAS DE *L. MONOCYTOGENES* PROCEDENTES DE LA CARNE AVIAR

1.1 Importancia de las BAL como antagonistas de patógenos presentes en alimentos.....	132
1.2 Sustancias antimicrobianas producidas por las BAL	134
1.2.1 Ácidos orgánicos	134
1.2.2 Otros metabolitos.....	135
1.2.3 Bacteriocinas	136
1.2.3.1 Clasificación de las bacteriocinas	137
1.2.3.2 Empleo de bacteriocinas en la industria alimentaria	139
2. HIPÓTESIS.....	142
3. OBJETIVOS	143
4. METODOLOGÍA.....	144
4.1 Obtención de los sobrenadantes de BAL.....	144
4.2 Reactivación de cepas de <i>L. monocytogenes</i>	145
4.3 Prueba de antagonismo	145
4.4 Análisis estadístico	146
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN... ..	147
5.1 Rol de los sobrenadantes de BAL nativas en el antagonismo sobre las cepas de <i>L. monocytogenes</i>	147
5.2 Efecto antagónico de los SLC según las BAL aisladas en los distintos tratamientos	149
5.2.1 SLC obtenidos de las BAL provenientes de la condición control	150
5.2.2 SLC obtenidos de las BAL provenientes del tratamiento W3... ..	153

5.2.3 SLC obtenidos de las BAL provenientes del tratamiento P	162
5.2.4 SLC obtenidos de las BAL provenientes del tratamiento W3 + P	164
6. CONCLUSIONES	177
7. BIBLIOGRAFÍA... ..	182
ANEXO.....	247



Introducción general

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Situación actual de la Argentina en la producción de pollos (*Gallus gallus*)

La avicultura en Argentina se ha intensificado en los últimos años manifestando un crecimiento importante, sostenido por diversos factores productivos como el mejoramiento genético, la alimentación, la sanidad y prácticas de manejo adecuadas. La actividad avícola se establece favorablemente tanto en la producción de carne aviar como de huevos. El desarrollo constante y la expansión del mercado se han mantenido dinámicamente desde el año 2003 con creciente participación en el plano nacional e internacional.

La inserción exportadora de carne aviar es de relevancia económica en Argentina junto con los subproductos derivados de la faena en menor medida (harina de plumas, vísceras, huesos, crestas, etc) (Ministerio de Agroindustria, 2016). En los primeros diez meses del año 2019 la producción de carne de pollo fue de 1,83 millones de toneladas, superando los 1,71 millones de toneladas alcanzadas en el 2018 en el mismo período (Barajas Maldonado, 2019). Aproximadamente se exporta el 11 % de la producción y el resto se destina para consumo en el mercado interno (Infoagro, 2019). Argentina es la décima nación productora a nivel mundial y, a la vez, el décimo país exportador de carne aviar (Ramseyer & Terré, 2019). Actualmente los últimos datos del 2020 registran que la producción de carne de ave fue de 992.000 toneladas en los primeros cinco meses del año. Por su parte las exportaciones se situaron en 70.251 toneladas en el primer cuatrimestre superando en un 6 % las del año 2019 durante el mismo período (Gutiérrez, 2020). Los principales destinos de

exportación en el año 2020 fueron: China (26.361 toneladas), Sudáfrica (6.585 toneladas) y Chile (5.689 toneladas), que en conjunto concentraron más de la mitad de las exportaciones. Los demás destinos en el mercado exportador lo constituyeron los Emiratos Árabes Unidos y Arabia Saudita (Portal Portuario, 2020). En el continente americano, nuestro país ocupa el cuarto lugar en cuanto a producción de carne de pollo luego de Estados Unidos, Brasil y México (Ramseyer & Terré, 2019).

La producción avícola nacional se lleva a cabo en 18 provincias argentinas concentrándose la mayor actividad en Entre Ríos (51 %), Buenos Aires (35 %) seguidas por Santa Fe y Córdoba (Domenech 2017; 2018). En las dos primeras provincias se localizan el 88 % de las granjas de pollos de engorde (Gutiérrez, 2018). La actividad cuenta con 5.504 unidades productivas, de las cuales 4.452 son para la producción de carne (Bueno *et al.*, 2016).

A partir del año 2005, la industria avícola argentina triplicó su producción logrando una conversión de dos kilos de cereales por cada kilo de carne de pollo. Además, el sector cárnico, demanda anualmente unos 4,4 millones de toneladas de grano: 66 % de maíz y 27 % de poroto de soja (Domenech, 2017). Por otro lado, en los últimos años el consumo de carne de pollo ha experimentado un gran incremento (Figura 1), debido a diversos factores favorables: precio, perfil nutricional, bajo contenido en grasa, facilidad de preparación, versatilidad y buena aceptación por parte de la mayoría de los consumidores. En el 2010, el consumo de carne de pollo alcanzó los 34,7 kg/hab/año y superó el valor estimado por el “plan de expansión avícola” (SAGPyA, 2011). En la actualidad esta tendencia se mantiene, registrándose un consumo de 46,6 kg de carne per cápita por año (CEPA, 2019).

Las mejoras en las prácticas sanitarias y alimenticias, los rápidos avances en el área de la genética, el alto índice reproductivo y el corto ciclo de producción de las aves, proyectan que para el año 2024 la carne de pollo representará más de la mitad de la producción adicional.

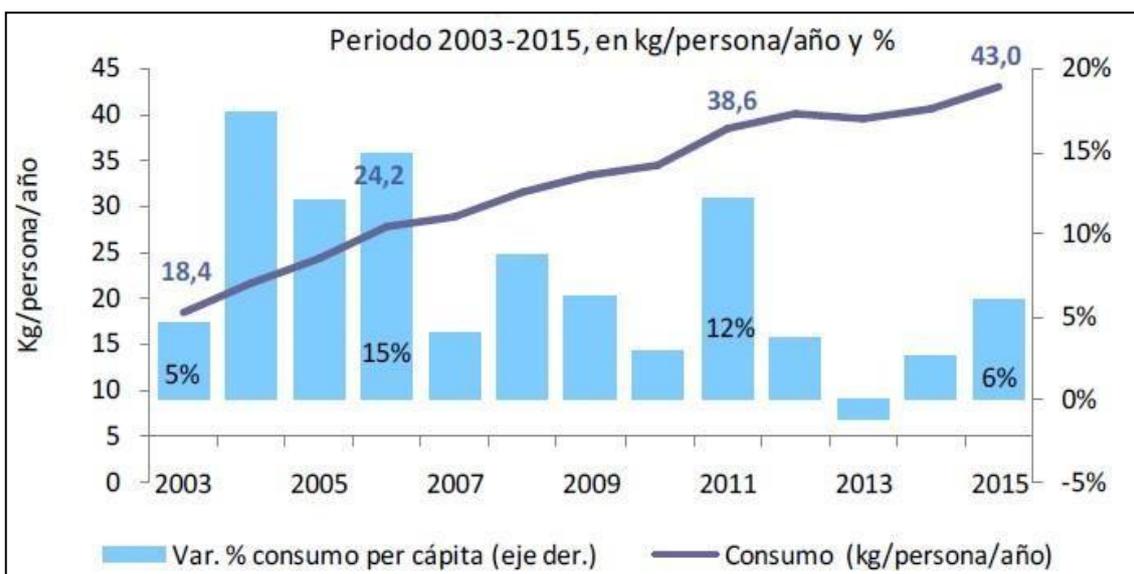


Figura 1. Evolución del consumo per cápita de carne aviar en Argentina. Fuente: Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas (2016).

Respecto al *status* sanitario, la Argentina se encuentra libre de influenza aviar y Newcastle, enfermedades representan importantes barreras para el comercio y que afectan a la avicultura en diferentes partes del mundo. Este contexto nacional permite contribuir a la sustentabilidad del mercado exterior y a la apertura de nuevos destinos de producción, además de evitar las grandes pérdidas económicas provocadas por estos patógenos.

El Plan Nacional de Sanidad Avícola (PNSA) a través de la implementación del Programa de Enfermedades de las Aves y Animales de Granja contempla iniciativas destinadas al control de la micoplasmosis y salmonelosis de las aves y

establece el mejoramiento de la bioseguridad de los establecimientos avícolas (MECON, 2016).

La selección intensiva lograda en las últimas décadas ha generado animales de una gran masa muscular con un elevado rendimiento de la canal (pollo eviscerado sin patas ni cuello). Esto condujo a la obtención del pollo parrillero denominado *broiler*, el cual hace referencia al tipo de animal utilizado en la crianza intensiva y que se caracteriza por un rápido ciclo de producción (6 a 7 semanas) (Peinado, 2015).

1.2 Características de la carne de pollo

La carne de ave está compuesta por tejido muscular, piel adherida, tejido conectivo y órganos utilizados como alimentos. Las porciones comestibles de las canales contienen aproximadamente un 71 % de agua y a diferencia de las carnes rojas, la mayor parte de grasa se encuentra debajo de la piel y en la cavidad abdominal. Esta grasa puede eliminarse fácilmente y constituye una ventaja sobre las carnes porcina o vacuna cuando se desea obtener productos bajos en lípidos.

Los nutrientes y otras propiedades de la carne de ave influyen notoriamente en el crecimiento de los microorganismos. La carne de pollo contiene un alto porcentaje de agua que se encuentra entre el 66 y el 74,7 % y presenta un pH que varía entre 5,96 y 6,18 (Qiao *et al.*, 2002; Karaoğlu *et al.*, 2005). La actividad agua (a_w) depende del tiempo de almacenamiento, pero posee valores entre 0,98 a 0,99 si la carne ha sido almacenada en presencia de aire seco. Por otro lado, el tiempo de faena determina la acidez de la carne, condicionando su calidad microbiológica. En pollos de 9 semanas, el pH del músculo de la pechuga es de 6,6 mientras que en aves de 25 semanas alcanza un valor de 7,2. Sin embargo, la piel funciona como barrera física contra los microorganismos impidiendo la contaminación del músculo subyacente. Tanto la piel

como la carne son sustratos ideales para el desarrollo de una amplia diversidad de microorganismos (Adamcic & Clark, 1970).

1.3 Bioseguridad aviar

El mantenimiento de un ambiente libre o con una carga mínima de patógenos en el establecimiento avícola se lleva a cabo a través de un conjunto de prácticas de manejo, normas operacionales y directrices que constituyen la bioseguridad. El implemento de esta herramienta permite prevenir la entrada y transmisión de agentes patógenos que puedan afectar la sanidad en las granjas avícolas. Su aplicación proporciona aumentos tanto en la productividad de la parvada como en el rendimiento económico, por lo que es de interés en cualquier empresa de producción de aves. El plan de bioseguridad debe ser flexible y práctico para que los operarios lo desarrollen sin dificultades.

Dentro de las consideraciones deben tenerse en cuenta; la ubicación de la granja, las características de la construcción de los galpones, el control de visitas al establecimiento, como así también la limpieza y desinfección de camas, bebederos y comederos.

Por otro lado, debido a que el estado inmunológico de los pollitos es distinto al de los pollos adultos, es conveniente el uso de lotes de las mismas edades. Así también, se aconseja evitar el estrés en los animales y la contaminación del alimento balanceado y del agua. Es conveniente ejercer control en vacunaciones, medicaciones, heces y cadáveres, minimizando la presencia de insectos y de animales ajenos a la producción (Ricaurte, 2005).

1.4 Cadena productiva de pollos parrilleros

A diferencia de otras producciones pecuarias, la industria avícola correspondiente a la producción de pollos parrilleros se encuentra altamente integrada (Figura 2). La producción primaria es realizada en granjas integradas, propias o de terceros, y luego es transportada a empresas faenadoras o procesadoras (Dirección de Ganadería Bovina, Porcina y Avícola, 2012). Estas últimas retiran las aves vivas de las granjas y la trasladan a sus plantas frigoríficas. Una vez realizados los procesos de transformación, el producto se comercializa en el mercado interno y externo. Dentro de este sistema integrado intervienen además, las empresas proveedoras de alimentos balanceados y de insumos sanitarios, como también los bienes de capital y los servicios.

En los sistemas modernos de producción avícola es común la reutilización de la cama de pollos parrilleros. Esto es promovido con el fin de disminuir el impacto ambiental y los costos de producción y debido principalmente a la escasez de materiales para tal fin (Pote *et al.*, 2011; Watts *et al.*, 2011).

Los canales comerciales en el mercado interno son variados y se encuentran representados principalmente por mayoristas, hipermercados, supermercados y minoristas. A su vez, el comercio minorista se encuentra conformado por autoservicios, pollerías, carnicerías, rotiserías, restaurantes, etc. En cuanto al abastecimiento del mercado internacional, se observan iniciativas tanto individuales como de otro tipo, que requieren la conformación de un consorcio de exportación.

La información originada en las necesidades de los consumidores, es procesada rápidamente por cada uno de los integrantes de la cadena de valor agregado. Esto da como resultado una variada oferta de productos que enfoca a un gran espectro del perfil

consumidor y abre nuevas y mayores alternativas para el sector. De esta manera, la estructura productiva se adapta a los requerimientos comerciales con la consecuente mejora de la posición argentina en el mercado de carne de pollo.

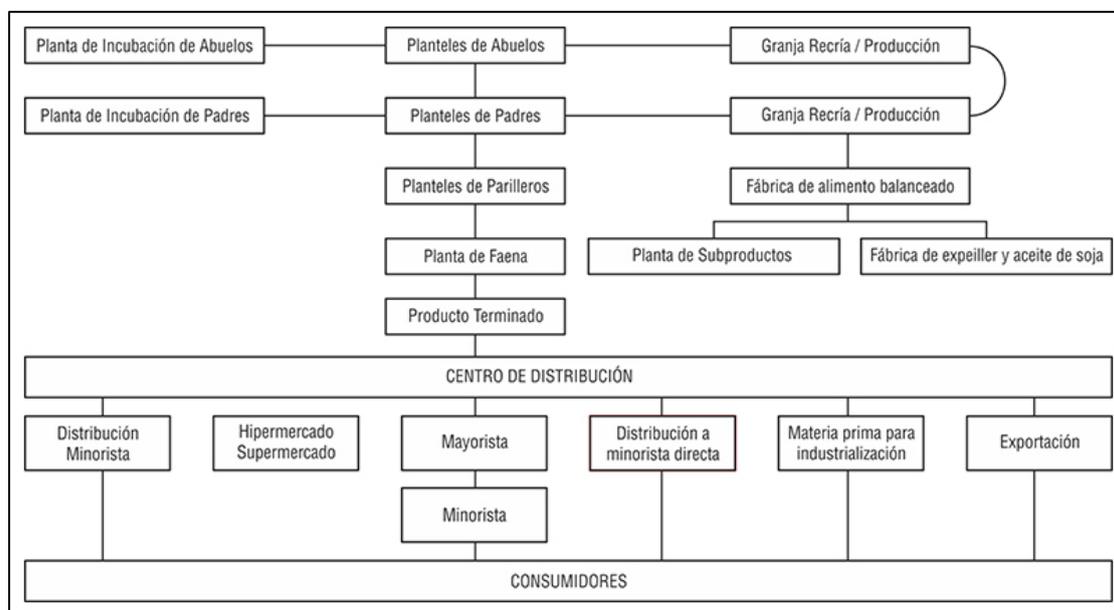


Figura 2. Esquema del complejo de producción y comercialización de pollos parrilleros. (Adaptado de Bueno *et al.*, 2016).

1.5 Faena de aves

1.5.1 Lugar de procesamiento

La faena y preparación de carnes enfriadas y congeladas se lleva a cabo en un establecimiento industrial y comercial denominado frigorífico, el cual junto a otras entidades asegura además el aprovechamiento de los subproductos. Estos deben estar habilitados para tal fin por la autoridad sanitaria competente y tener Inspección Veterinaria Oficial (Mountney & Parkhurst, 2001).

Los establecimientos faenadores y procesadores deben estar situados en zonas que no estén expuestas a inundaciones, olores objetables, humo, polvo y/o gases. Su perímetro debe ser delimitado claramente con un cerco y los caminos de acceso pavimentados o mejorados (Feldman, 2000). Los sectores básicos pueden dividirse en: recepción de jaulas, insensibilización, degüello, escaldado, pelado, repasado, lavado/escurrido, eviscerado, preparación de menudos, escurrido y envasado, cámaras de enfriado, expedición, lavadero de bandejas, filtro sanitario, local de restos (sangre, plumas, patas, cabezas, vísceras, carcasas descartadas) y cocción de restos.

Los edificios e instalaciones deben ser de construcción sólida y sanitariamente apropiada. Es fundamental que los materiales utilizados para la estructura y el mantenimiento no transmitan, directa o indirectamente, sustancias indeseables al producto. Las mesadas de trabajo tienen que ser resistentes al deterioro contra agentes físicos, como el acero inoxidable, garantizando una adecuada higiene y desinfección luego del procesamiento de la carne. El diseño de la planta debe proveer fácil acceso a todos los lugares de trabajo y un espacio suficiente tanto para la colocación de equipos como para el almacenamiento de materiales, con el fin de asegurar la calidad de las operaciones de limpieza y producción. Estos establecimientos deben contar con las siguientes dependencias: playas de descarga, de inspección *ante-mortem* y de sacrificio, cámaras frigoríficas, depósito para productos no comestibles, sectores de inspección veterinaria y oficinas para empleados. Es necesario contar con espacios libres de obstáculos entre los equipos y paredes, pisos y techos para favorecer la normal circulación de equipos móviles y del personal, en sus tareas de proceso y mantenimiento.

Los criterios aplicables a superficies (pisos, paredes, techos o cielorrasos y estructuras y accesorios elevados) indican que deben ser construidas sin grietas, utilizando materiales impermeables, no absorbentes, lavables, resistentes y antideslizantes, fáciles de limpiar y desinfectar. Para el caso de puertas, el uso de cortina de aire es una alternativa contra el ingreso de insectos y contaminantes físicos, así como el sentido de apertura de la misma (de zona limpia a zona sucia).

Los locales deben contar con iluminación natural y/o artificial que permita la normal realización de tareas y evite alterar la calidad del producto cárnico. Por otro lado, la ventilación debe ser suficiente para desalojar el calor excesivo, evitar la condensación de vapor y la acumulación de polvo y favorecer la eliminación del aire contaminado. Esta operación tiene que permitir la renovación total del aire al menos cinco veces por hora.

Las cañerías que circulan por el establecimiento deben estar identificadas de acuerdo al transporte que realicen, en función de un código de colores estipulado internacionalmente por el Servicio Nacional de la Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA, 2003). Se recomienda que todas las cañerías circulen por fuera del edificio para facilitar las tareas de inspección, mantenimiento y limpieza de las mismas. En caso de estar instaladas interiormente, deben protegerse con canales impermeables y presentar una ubicación adecuada, permitiendo el fácil acceso a los techos, paredes y pisos.

Es imprescindible contar con abastecimiento de agua potable abundante y a presión adecuada tanto para su uso durante el proceso como para las tareas de limpieza. Es importante además poseer un sistema de agua fría y caliente para las distintas actividades.

Es necesario realizar un análisis microbiológico del agua cada 15 días y uno fisicoquímico cada seis meses a fin de verificar su potabilidad. Otro requisito importante para mantener la potabilidad del agua es limpiar los tanques de almacenaje una vez al mes. El vapor que se utilice debe ser generado con agua potable y ser transportados también por tuberías independientes.

Los establecimientos deben disponer de un sistema eficaz de evacuación de efluentes líquidos que debe mantenerse en todo momento en buen estado de funcionamiento. Para llevar a cabo una adecuada evacuación, los líquidos deben escurrir hacia las bocas de los sumideros a fin de evitar la acumulación en los pisos. El sistema tiene que presentar un adecuado cierre hidráulico en su encuentro con la red general de evacuación y los efluentes deben ser tratados con antisépticos específicos de acción bactericida aprobados por el SENASA (SENASA, 2003).

En todas las áreas de ingreso al local de manipulación debe haber lavabos con agua caliente a 45 °C, situados de tal manera que el personal tenga que pasar obligatoriamente junto a ellos y lave sus manos cada vez que se incorpore al proceso. A su vez, debe realizarse el lavado de botas con cepillo, detergente y soluciones desinfectantes. Es importante resaltar, que los lavabos en el área de manipulación no deben ser accionados en forma manual sino por medio de pedal o método similar. Este sector debe estar provisto de jabón y toallas descartables. Asimismo, deben proveerse suficientes dispositivos de distribución, asegurarse la eliminación de materiales descartables y evitar el uso de toallas de tela.

1.5.2 Etapas de la faena

Las carcasas deben ser presentadas al comercio despojadas de plumas, cabeza, cuello, tarsos y vísceras toraco-abdominales, incluyendo tráquea, esófago, buche,

pulmones, sacos aéreos, riñones, intestinos, bazo, bolsa de Fabricio y órganos sexuales (Reglamento Bromatológico Nacional, 2005).

El proceso de sacrificio de las aves sintéticamente contempla las siguientes etapas: recepción, desplume, evisceración, lavado, pre-enfriamiento, enfriamiento, empaque, almacenamiento en frío, despacho y distribución. Las secuencias de eventos se representan mediante un diagrama de flujo (Figura 3). El paso inicial es la recepción de aves vivas; los animales son retirados de sus jaulas y colgados de sus extremidades en un transportador aéreo o cadena de sacrificio, provisto de ganchos individuales. Posteriormente se procede a la insensibilización por medio de descarga eléctrica, el método de aturdimiento más común y efectivo (Ricaurte, 2005). A continuación, las aves son degolladas para permitir el desangrado. El paso siguiente es el escaldado; las aves son sumergidas en agua a una temperatura de 59 °C para producir la dilatación de los folículos y facilitar la posterior eliminación de plumas. Este proceso se realiza mediante el movimiento de unos dedos de caucho que retiran las plumas de la carcasa y es favorecido por una corriente de agua que mantiene las ranuras despejadas. Durante el escaldado, las temperaturas y los tiempos utilizados deben estar regulados adecuadamente, ya que estas variables pueden influir en la ternura de la carne. Posterior al escaldado, se efectúa el corte de cabeza, extracción de tráquea, cloaca y corte de patas. En el sector de evisceración, se realiza la extracción de vísceras de la cavidad abdominal de manera manual o semi-automática y la separación del hígado, molleja y corazón en forma manual. En este momento, las aves evisceradas pasan a denominarse canales, las cuales son pre-enfriadas con agua a 36-37 °C. Durante este proceso, dichas canales reducen la carga microbiana por arrastre. En la etapa siguiente, las canales pasan a un tanque de enfriamiento con agua clorada entre 0 y 2 °C. De esta forma, alcanzan una temperatura inferior a 4 °C y absorben una pequeña cantidad de

agua (hidratación). Finalmente, las canales son trasladadas al área de envasado (empaquete) la cual presenta una temperatura de 8 °C para mantener las condiciones de frío en la carne.

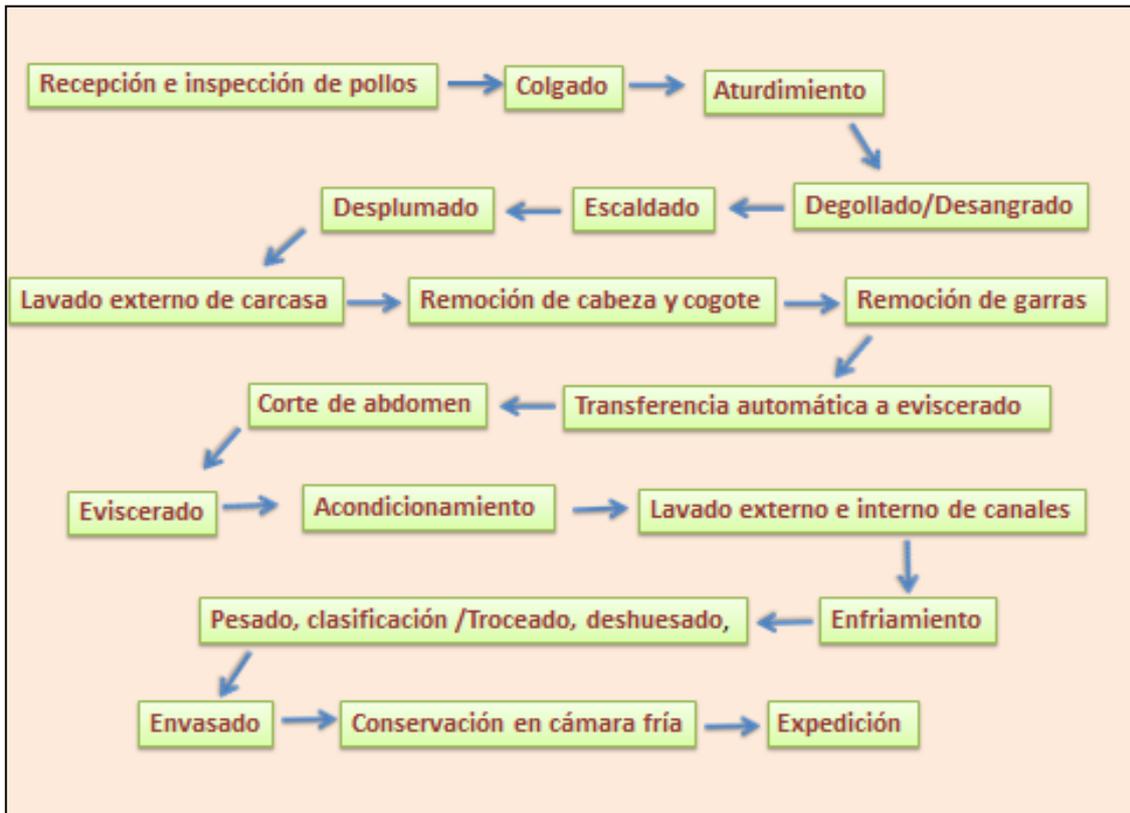


Figura 3. Diagrama de Flujo del procesamiento industrial del pollo desde la faena hasta su comercialización (Adaptado y modificado de Feldman, 2000).

1.6 Microbiología de la carne de pollo

1.6.1 Carga microbiana

Diversos factores como carga microbiana de las canales, mantenimiento de la cadena de frío durante la distribución, nivel sanitario del establecimiento expendedor, entre otros, influyen de manera significativa en la calidad microbiológica de los alimentos cárnicos a base de pollo. Esta constituye en la actualidad el factor determinante en la elección de un alimento por otro por parte de los consumidores.

Por su carácter perecedero, la carne fresca permite el crecimiento de varios microorganismos, por tal motivo es necesario implementar estrictos programas de inspección para controlar su vida útil. La intervención de distintas fuentes contaminantes define la composición de la microbiota de la carne, la cual también representa la eficacia de medidas higiénicas vinculadas a contrarrestar la difusión y proliferación de microorganismos.

La carga microbiana de la carne de pollo está determinada por la biota del tracto gastrointestinal de las aves en la granja como también por el manejo realizado antes y después de la matanza del animal. Durante la cadena productiva, la manipulación ejercida por empleados de pollerías o comercios expendedores contribuye a la carga microbiana y se adiciona a la adquirida en los frigoríficos o plantas de procesado. El tratamiento y manejo de la carne por lo tanto, puede hacer disminuir, mantener o incrementar el número de microorganismos presentes en el producto final. De esta forma, la calidad de la carcasa depende de la condición de las aves cuando llegan a la planta y de su manejo durante el procesamiento (Ricaurte, 2005).

1.6.2 Higiene sanitaria previa a la comercialización

Para cumplir con las buenas prácticas pecuarias conducentes a la correcta comercialización de los productos cárnicos, es necesario considerar algunos tópicos que se describen a continuación.

La microbiota del intestino de las aves está conformada mayormente por bacterias entéricas y muchas de ellas son eliminadas con las heces. La adquisición de las bacterias intestinales se produce por transmisión vertical cuando los microorganismos pasan de la gallina al huevo, u horizontal cuando pollos sanos ingieren heces de otros animales, alimento balanceado y/o agua contaminados.

Una vez finalizada la etapa de terminación en la granja, las camadas de pollos se recogen, se colocan en jaulas y se transportan hasta el frigorífico para su sacrificio en el mismo día. Los procedimientos de captura y transporte se deben realizar causando el mínimo estrés a las aves (ICMSF, 1998). Los animales son llevados al matadero a la edad de faena (7 semanas). Allí, deben permanecer en condiciones apropiadas de ventilación, a fin de evitar la pérdida excesiva de peso vivo y/o minimizar la mortalidad. Antes del sacrificio los pollos deberían tener entre 8 y 12 horas de ayuno, para conseguir una adecuada evacuación del contenido del intestino que podría potencialmente contaminar la carne durante el procesamiento. Los períodos más largos sin alimento (más de 13 horas de ayuno) son perjudiciales debido a que el intestino pierde su mucosa y se torna más frágil, haciéndolo susceptible a ruptura durante la evisceración (Ricaurte, 2005).

En los establecimientos avícolas es necesario diferenciar entre limpieza e higiene, así como considerar la importancia de su significado a través de todo el proceso de faena y acondicionamiento. El término “limpieza” se refiere a la eliminación de tierra, residuo de alimentos, polvo, grasa u otra materia objetable. Por su parte, la “higiene” se

logra a través del cumplimiento de todas las medidas necesarias para garantizar la inocuidad y salubridad de los pollos.

1.7 Enfermedades de transmisión alimentaria

Cada año, 600 millones de personas (casi una de cada 10 personas) sufren intoxicaciones alimentarias en el mundo y 420.000 fallecen por esta causa (OMS, 2020). La intensificación de los sistemas productivos y los manejos deficientes respecto a las medidas de higiene aplicadas durante la obtención de los alimentos, es en gran parte responsable de este evento. En este sentido, la avicultura en la Argentina a través de los años, se ha desarrollado paralelamente a su industrialización en el resto del mundo. Esta situación ha traído mayores riesgos de contraer enfermedades de origen alimentario a través del consumo de huevos, carne y subproductos de aves.

La adopción de estrategias preventivas durante la cadena de producción, es fundamental para lograr producir alimentos de calidad y constituye un factor clave en la sanidad alimentaria. Para garantizar la inocuidad de los alimentos, se establecen medidas de prevención y monitoreo basadas en los Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC). Este proceso sistemático se programa en todas las etapas de la industria alimentaria y especialmente en la formulación de recomendaciones específicas para grupos de riesgo elevado. Estos principios, establecen una base para asegurar la idoneidad de los alimentos y deben aplicarse de acuerdo a cada código específico, para cada una de las etapas de elaboración del alimento (granjas, plantas de procesamiento, almacenamiento, distribución, etc). Las normas se asientan en los criterios de inocuidad recomendados por el Codex Alimentarius, la Organización Internacional de Epizootias (OIE) y la legislación vigente. Los consumidores, eslabón último de la cadena agroalimentaria, deben exigir por lo tanto, la obtención de alimentos

seguros que cumplan con las buenas prácticas de manufactura (BPM).

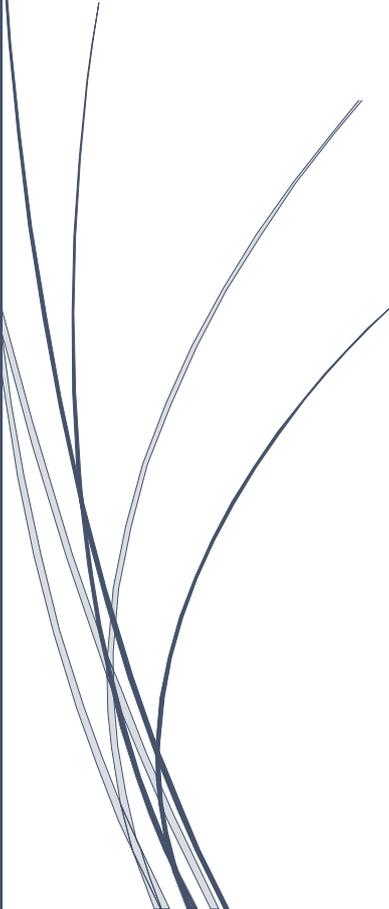
Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son una de las mayores causas de carga económica y problemas para la salud pública a escala global. Estas son provocadas por el consumo de agua o alimentos contaminados con microorganismos o parásitos o por las sustancias tóxicas que estos producen. El Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Alimentos, indica que aproximadamente el 40 % de los brotes de ETA en Argentina, ocurren en el hogar como consecuencia de condiciones de higiene deficientes durante la preparación y manipulación (ANMAT, 2019). Por lo tanto, la responsabilidad del consumidor constituye un factor clave para prevenir su desarrollo.

A lo largo de la cadena alimentaria, desde la producción hasta su consumo, los alimentos de origen animal pueden ser contaminados con microorganismos patógenos, pudiendo causar enfermedades en los consumidores. Muchos de estos están presentes en las aves vivas y pueden permanecer en la carne cruda luego del sacrificio. La sobrevivencia y multiplicación en el producto final puede tener lugar si las condiciones higiénicas y de almacenamiento a bajas temperaturas son inadecuadas e insuficientes (Roberts, 1990). La presencia de microorganismos responsables de toxiinfecciones alimentarias puede resultar imperceptible, debido a que los aspectos organolépticos de la comida como color y sabor generalmente no son alterados. En este contexto, dentro de las bacterias relevantes causante de ETA se encuentra *Listeria monocytogenes*. Esta puede contaminar la carne de pollo y ocasionar consecuencias en la salud humana produciendo listeriosis, una de las principales y más importantes enfermedades alimentarias a nivel mundial (OMS, 2018).



CAPÍTULO I

LISTERIA MONOCYTOGENES
COMO POTENCIAL PATÓGENO
EMERGENTE DE TRANSMISIÓN
ALIMENTARIA



CAPÍTULO I: *L. MONOCYTOGENES* COMO POTENCIAL PATÓGENO EMERGENTE DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA

1. Generalidades de la Listeriosis

1.1 Riesgo alimentario y epidemiología del agente patógeno

L. monocytogenes se manifestó como patógeno emergente en los alimentos en la década de los 80 en Canadá, U.S.A y Europa. El primer caso de listeriosis se documentó en 1981 en Nueva Escocia (Canadá) a causa del consumo de coles contaminadas con heces de oveja. Posteriormente, la listeriosis surgió como consecuencia principal de cambios en los hábitos de la población. Estos cambios se basaron en la preferencia hacia los alimentos listos para el consumo (LPC), al uso extensivo de la refrigeración y a las nuevas transformaciones generadas en los sectores de producción, procesamiento y distribución de los alimentos (Sánchez Hernández, 2016).

La toxiinfección alimentaria por *L. monocytogenes* constituye una problemática importante en la salud. Esta es ocasionada por la incorporación de la bacteria a lo largo de la cadena productiva y/o por la contaminación cruzada en sus eslabones antes del consumo (Todd & Notermans, 2011). La preocupación a través de los años ha ido aumentando mundialmente en productores de alimentos, consumidores y autoridades sanitarias. Los investigadores y las jurisdicciones de salud han llegado a la conclusión que no es posible su completa eliminación a nivel de las plantas procesadoras de alimentos y por lo tanto deben extremarse las medidas para su control tanto a nivel industrial y comercial como también en el hogar (Thimothe *et al.*, 2004).

L. monocytogenes ha sido aislada en numerosos alimentos tanto procesados como sin procesar, incluyendo productos cárnicos y avícolas, vegetales, frutas, leche y sus derivados (manteca y quesos blandos), helados, salchichas, embutidos fermentados, paté,

ensaladas, pescado ahumado, mariscos, entre otros. Los alimentos se pueden contaminar en cualquier eslabón de la cadena productiva y el patógeno puede crecer durante el almacenamiento en frío.

A pesar de encontrarse con frecuencia en alimentos crudos, los casos de listeriosis humana generalmente se relacionan con aquellos listos para el consumo, que se conservan refrigerados por un período prolongado de tiempo o que son contaminados post procesamiento térmico (FAO, 2000). Si bien el número de células bacterianas que deben ingerirse para que se presente una infección alimentaria no está claramente definido, se ha establecido que un valor de menos de 100 UFC/g no debería presentar riesgo alguno (Mortarjemi, 2002).

L. monocytogenes puede presentar inconvenientes en la industria láctea donde algunos derivados se fabrican con leche no pasteurizada. Tal es el caso de países como Francia y Suiza donde se permite la elaboración y comercialización de estos productos. En este sentido, los quesos de pasta blanda madurados por mohos como el tipo Camembert, han sido asociados con frecuencia a casos de listeriosis por el crecimiento y aumento de población del patógeno (Bell & Kyriakides, 1998; Sanaa *et al.*, 2004).

La listeriosis de origen alimentario se presenta en casos esporádicos, aunque también se puede manifestar como brotes, afectando a un gran número de personas. Pese a esto, su notificación no es de carácter obligatorio. En comparación con otras ETA más comunes como la salmonelosis, la shigelosis o el Síndrome Urémico Hemolítico (causado por *Escherichia coli* verotoxigénica) posee una baja frecuencia de infección. Sin embargo, provoca una alta tasa de hospitalización (91 %) entre los afectados y una elevada tasa de mortalidad, que puede variar entre un 20 y 30 % (Hulchison *et al.*, 2004; Steele & Odemeru, 2004; Vera *et al.*, 2013).

En la actualidad, el número de casos de listeriosis ha aumentado considerablemente y se estima que la frecuencia en los países desarrollados se encuentra en un rango de 2 a 15 casos por millón de habitantes. En el 2015, se informó un brote de listeriosis invasiva asociado al consumo de vegetales congelados procedentes de Hungría. Los países afectados fueron Austria, Dinamarca, Finlandia, Suecia y el Reino Unido. Se reportaron 47 casos y 9 muertes (EFSA, 2018). Por este motivo, en Argentina la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) ordenó el retiro preventivo de 128 lotes de productos congelados a base de maíz y otros vegetales elaborados con materias primas que habrían sido importados al país procedentes de Hungría (ANMAT, 2018).

En U.S.A. se registraron diversos casos en alimentos que generalmente no eran vinculados a la bacteria. En el año 2011 se registró un brote en melones con 147 afectados y 34 muertes incluyendo un aborto. Por su parte en el 2014, se produjeron sucesivos episodios de listeriosis por distintos alimentos: brotes de soja (2 muertos), frutas con huesos y manzanas caramelizadas (7 muertes y 35 afectados) y helados (2 muertes) (Buchanan *et al.*, 2017). El brote más severo a nivel mundial de listeriosis fue registrado en la República de Sudáfrica con 180 muertes y 948 casos probados a partir de la ingesta de productos cárnicos listos para consumo, del tipo mortadela, salchichas tipo viena, jamón cocido y otros fiambres, con una tasa de mortalidad del 27 % en los casos estudiados (OMS, 2018).

Dentro de la población, las personas inmunodeprimidas constituyen el grupo más sensibles a contraer listeriosis alimentaria. En las mujeres embarazadas, la enfermedad puede provocar abortos espontáneos, nacimientos prematuros y mortinatalidad. Por su parte, los pacientes oncológicos, transplantados o con SIDA son considerados de alto riesgo al igual que los adultos de avanzada edad (Rodríguez Auad, 2018).

La listeriosis se manifiesta de dos formas: invasiva y no invasiva. El cuadro invasivo se presenta con infección sistémica, septicemia, meningitis y encefalitis con un período de incubación generalmente entre 20 y 30 días (Riedo *et al.*, 1994). Por otro lado, en personas que no pertenecen a los grupos de riesgo o que están sometidas a tratamientos frecuentes con antiácidos, una infección elevada de *L. monocytogenes* causa gastroenteritis febriles leves similares a una gripe. En estos casos, la listeriosis se manifiesta como una patología no invasiva. Los síntomas febriles también se presentan en mujeres embarazadas que contraen la enfermedad (Rossi *et al.*, 2008).

Según estudios realizados en animales, el tiempo de incubación en la listeriosis no invasiva puede ser similar a la manifestación invasiva (Vázquez Boland *et al.*, 1996). También puede variar de 1 a 4 semanas después del nacimiento en bebés infectados al momento de nacer (Graham *et al.*, 2002) o incluso extenderse de 3 a 70 días en personas adultas. Los síntomas gastrointestinales como náuseas, vómito y diarrea, pueden preceder a formas más serias de listeriosis y presentarse entre las 9 y 48 horas luego de la infección. Esta variabilidad en el período de incubación, es uno de los desafíos más grandes que presenta la listeriosis para la salud pública. Dicha característica hace muy difícil realizar la encuesta epidemiológica y la toma de muestras de alimentos para evaluar el posible origen de esta ETA.

1.2 Características fenotípicas del género *Listeria* y de la especie *L. monocytogenes*

Listeria se clasifica taxonómicamente dentro de la Clase Bacilli, Orden Bacillales, Familia Listeriaceae. El género comprende bacilos Gram positivos solitarios o formadores de cadenas cortas, no productores de esporas e incluye a las especies *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* y *L. murrayi*, como también las identificadas en el año 2009; *L. marthii* y *L. rocourtiae*. (Graves *et al.*,

2010; Leclercq *et al.*, 2010). De las mencionadas, *L. monocytogenes* es potencialmente patógena para el hombre y animales y *L. ivanovii* sólo lo es para bovinos y rumiantes pequeños, aunque se han descrito algunos casos esporádicos de aislamientos causantes de gastroenteritis y septicemia en el humano (Guillet *et al.*, 2010; Orsi *et al.*, 2011).

L. monocytogenes fue descubierta por los microbiólogos Murray, Webb y Swann (Murray *et al.*, 1926) cuando estudiaban una epizootia que afectaba a cobayos y conejos de su laboratorio en la Universidad de Cambridge. Esta enfermedad se caracterizaba por la presencia de lesiones necróticas en hígado y manifestaba leucocitosis mononuclear (monocitosis). Al año siguiente, Pirie (1927) aisló el mismo agente etiológico durante sus estudios en el sur de África a partir de focos necróticos en gerbos, bautizando a la bacteria como *Listerella hepatolytica*. Posteriormente en 1957 el taxónomo Heinz Seeliger le otorgó su nombre actual en honor al cirujano Joseph Lister (Sánchez Hernández, 2016).

L. monocytogenes es una bacteria anaerobia facultativa y psicrófila que presenta movilidad por la presencia de flagelos, siendo inmóvil a 37 °C. Se desarrolla en un amplio rango de pH entre 4,6 y 9,2 (ICMSF, 1998), aunque puede tolerar un pH de 3,5 después de una fase de adaptación a un pH de 5,5 (O'Driscoll *et al.*, 1996). Este microorganismo, posee una gran capacidad de termorresistencia que le permite adaptarse y proliferar a temperaturas de refrigeración y resistir las altas temperaturas. Los parámetros de crecimiento oscilan entre -0,1 y 45 °C, con un óptimo entre los 30 y 37 °C. Se ha establecido que es 4 veces más resistente que *Salmonella* a las temperaturas elevadas, presentando un punto de muerte térmica de 10 minutos a 58 °C. También se destaca que puede sobrevivir durante varias semanas a -18 °C en diferentes sustratos alimentarios (ICMSF, 1996).

1.3 Ecología de *L. monocytogenes*: reservorios, distribución y transmisión

L. monocytogenes se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y está extensamente adaptada a distintos entornos colonizando tanto ambientes terrestres como acuícolas. El reservorio natural del patógeno es el suelo, pero se considera habitante natural del intestino de mamíferos, incluyendo animales silvestres y domésticos como rumiantes, aves y algunas especies de peces (Vivant *et al.*, 2013; McMullen & Freitag, 2015). En el hombre, la bacteria puede ser un residente intestinal temporal ya que entre el 5 % y 10 % de la población en algún momento es portadora asintomática (Martínez Galán *et al.*, 2016).

La diseminación de la bacteria a través de salpicaduras de barro y materia fecal puede generar diversos reservorios secundarios incluyendo plantas, pienso, aguas residuales, camas para crianza de aves, bebederos, entre otros. El patógeno no forma endosporas, sin embargo, es capaz de sobrevivir por largos períodos de tiempo en el ambiente teniendo la habilidad para colonizar y crecer en un amplio rango de nichos ecológicos. Este carácter ubicuo se correlaciona con la presencia de 331 genes que codifican para diferentes proteínas de transporte (Torres *et al.*, 2005).

L. monocytogenes presenta vida saprófita (Freitag *et al.*, 2009), por lo que sobrevive y crece en materiales orgánicos de origen vegetal y animal en estado de descomposición. Esto indica que debe procederse al adecuado compostaje de estos residuos si se desea utilizarlos como abono de cultivos, procurando alcanzar la etapa termófila en el proceso para eliminar los potenciales patógenos. Por otro lado, durante la elaboración de silaje, las técnicas inadecuadas empleadas en la etapa de compactación, pueden incorporar la bacteria junto al material a ensilar a través del suelo. Del mismo modo, diversas condiciones como el exceso de humedad y el aumento de pH, conducen a la obtención de un silaje mal conservado, lo cual favorece el desarrollo de *L. monocytogenes*. El forraje

en este caso, actúa como fuente de inóculo y reservorio del microorganismo, pudiendo provocar brotes de infección en rumiantes si es consumido por el ganado (García *et al.*, 2016).

La presencia de *L. monocytogenes* también se ha constatado en hongos comestibles, específicamente durante la producción de *Agaricus bisporus* (champiñón) (Pennone *et al.*, 2018). La bacteria puede sobrevivir en el sustrato de cultivo, contaminando posteriormente los productos de cosecha. Por este motivo se recomienda la pasteurización del sustrato previa inoculación con las esporas y un tratamiento térmico efectivo de las setas.

En las plantas de alimentos, *L. monocytogenes* puede encontrarse en numerosos sitios, incluyendo: pisos, agua estancada, desagües, equipos de procesamiento, cintas transportadoras, ropa de operarios, utensilios, cámaras de frío, túneles de congelación, entre otros (Rocourt & Cossart, 1997; Codex Alimentarius, 2007; Schöbitz *et al.*, 2009). La alta humedad y los restos de nutrientes favorecen el crecimiento y la persistencia de la bacteria en el entorno, estableciendo un potencial riesgo de contaminación cruzada hacia los productos de elaboración primaria. En la producción láctea, *L. monocytogenes* puede resultar problemática debido al estado higiénico deficiente en los equipos de ordeño. De esta forma, durante las operaciones, las ubres mal aseadas se transforman en fuentes de inóculo para la leche y sus derivados (Muhterem Uyar *et al.*, 2018; Castro *et al.*, 2018). Además, este microorganismo se ha detectado como agente causante de mastitis bovina subclínica; si bien en estos animales no se distinguen síntomas y/o signos visibles de enfermedad, actuarían como portadores dificultando el control sanitario (Schöbitz *et al.*, 2001).

1.4 Virulencia y toxicidad alimentaria

A pesar de que por el momento la industria y los gobiernos deben tratar a todos los aislamientos de *L. monocytogenes* como potencialmente patógenos, la bacteria presenta variación en el grado de patogénesis dentro de la misma especie. Este concepto ha conducido actualmente a considerar que no todas las cepas son igual de nocivas; gran parte se presentan como naturalmente virulentas y capaces de producir alta mortalidad, mientras que otras se categorizan como hipovirulentas o directamente avirulentas e incapaces de establecer una infección dentro del hospedero (Olier *et al.*, 2002). La diversidad en la capacidad de patogénesis puede explicarse debido a la presencia de polimorfismos en las secuencias nucleotídicas de los genes de virulencia, producidos por mutaciones puntuales y/o deleciones (Roche *et al.*, 2005; Témoïn *et al.*, 2008; Velge & Roche, 2010). Esto coincide en parte, con el bajo número de casos registrados pese a la frecuente exposición de los alimentos con el patógeno.

La capacidad para producir listeriosis está determinada por factores tanto intrínsecos como extrínsecos. Estos interactúan entre sí y establecen la susceptibilidad del huésped a presentar un cuadro infeccioso. Los aspectos epigenéticos regulan la expresión de determinados genes y se vinculan con el grado de virulencia de *L. monocytogenes*. Experimentos realizados sobre modelos animales, han constatado que en situaciones de estrés, se inducen cambios en la patogénesis de ciertas cepas (Jacquet *et al.*, 2002). Por otro lado, las condiciones ambientales extremas (temperatura elevada, falta de nutrientes, estrés oxidativo, pH ácido) pueden inducir mecanismos de adaptación en la célula bacteriana que resultan favorables posteriormente durante la infección intracelular (Boerlin & Piffaretti 1991; Navas Fernández *et al.*, 2006).

1.5 Patogénesis

L. monocytogenes actúa como un patógeno intracelular, por lo tanto evita el mecanismo de defensa del huésped mediado por anticuerpos. La bacteria adquiere esta capacidad induciendo su propia fagocitosis y diseminándose célula a célula, sin ser detectada por el sistema inmune humoral (Cossart *et al.*, 2003).

El patógeno es capaz de atravesar tres barreras fisiológicas presentes en los seres humanos: intestinal, hemato-encefálica y placentaria. Debido a que la ingestión de alimentos contaminados constituye la principal vía de entrada en el hospedero, en el tracto gastrointestinal, *L. monocytogenes* debe soportar inicialmente el ambiente ácido del estómago. Se ha evidenciado que bajo estas condiciones se activan al menos 13 proteínas de estrés oxidativo y 14 de “shock” tóxico (Vázquez Boland *et al.*, 2001). Posteriormente, la bacteria es absorbida desde el lumen intestinal atravesando las células epiteliales. Si el sistema inmune innato no ejerce un eficiente control, *L. monocytogenes* puede multiplicarse e infectar los ganglios linfáticos. El ingreso en el torrente sanguíneo, le permite alcanzar diferentes tejidos como el hígado y el bazo, donde puede replicarse en el interior de los macrófagos. La sobrevivencia del hospedero depende aquí del desarrollo de una efectiva respuesta inmune adaptativa. De otro modo, la bacteria puede ingresar nuevamente al torrente sanguíneo y alcanzar el cerebro o la placenta, causando infecciones sistémicas potencialmente letales (Camejo *et al.*, 2011).

1.6 Invasión de *L. monocytogenes*

El proceso de infección comprende una serie de etapas que permiten la entrada del patógeno en la célula hospedera y favorecen la proliferación de *L. monocytogenes* hacia las células vecinas.

En cada paso participan múltiples factores patogénicos o proteínas claves codificados por distintos genes de virulencia (Témoin *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Naik *et al.*, 2017).

a. Adhesión a la célula hospedera

La célula bacteriana se adhiere a los enterocitos penetrando la pared intestinal y una vez en el interior de la célula hospedera queda dentro de un fagosoma (vacuola fagocítica). El proceso es mediado por la interacción patógeno-huésped a través de la Internalina A (proteína de superficie) del patógeno, con su receptor E-caderina (glicoproteína transmembrana) del huésped. Esta asociación es específica y se basa en la presencia del aminoácido prolina en el residuo 16 de la molécula de E-caderina. En *Mus musculus* (ratón), la sustitución por ácido glutámico en esa posición, determina que no se produzca invasión intestinal. *L. monocytogenes* también produce Internalina B que se une a receptores de distintos tejidos. En el caso del hígado, el receptor para el factor de crecimiento del hepatocito (receptor Met), actúa en la interacción con esta proteína de superficie y le permiten al microorganismo invadir la célula eucariota.

b. Lisis de la vacuola fagocítica y escape

La vacuola fagocítica es rápidamente lisada por la hemolisina o listeriolisina O (LLO) y dos fosfolipasas C que hidrolizan al fosfatidilinositol y a la fosfatidilcolina. La proteína LLO es una toxina dependiente de colesterol y capaz de formar poros en la membrana de los fagosomas. Este mecanismo permite a *L. monocytogenes* escapar de la vacuola primaria.

c. Desarrollo intracelular

Una vez libre en el citosol, *L. monocytogenes* pone en marcha la activación génica con el fin de adquirir los nutrientes necesarios y posibilitar la multiplicación intracelular. Dentro de los genes que se expresan se incluye al gen *hpt*. Este codifica para un transportador de hexosa 6-fosfato bacteriano que permite captar de la célula huésped las fuentes de carbono.

d. Dinámica dentro de la célula hospedera

Posterior a su replicación, *L. monocytogenes* utiliza los componentes estructurales y enzimáticos del citoesqueleto de la célula huésped para trasladarse en el interior de la misma. El movimiento intracelular es consecuencia de la polimerización de filamentos de actina en uno de los polos de la bacteria. Este proceso es dirigido por una proteína de superficie denominada ActA y resulta en el desplazamiento del patógeno hacia la membrana plasmática de la célula huésped.

e. Lisis de la vacuola de doble membrana y propagación a células vecinas

Una vez que el patógeno alcanza la membrana plasmática del huésped, se forma una protuberancia denominada listeriópodo. De esta forma, la bacteria queda rodeada de una doble membrana (vacuola) induciendo la fagocitosis de la célula adyacente. Posteriormente, las enzimas responsables del proceso de lisis (fosfolipasas y LLO) intervienen nuevamente y liberan a la bacteria dentro de la célula (Gedde *et al.*, 2000; Cossart *et al.*, 2003; Roche *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009).

1.7 Serotipos dentro de la especie *L. monocytogenes*

La especie *L. monocytogenes* presenta antígenos somáticos (O) y flagelares (H), los

cuales pueden ser reconocidos mediante técnicas de aglutinación que emplean antisueros mono y polivalentes. De esta manera, se distinguen distintas cepas que pueden ser clasificadas en 12 serotipos: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d y 4e. Se establece que todos estos serotipos deben considerarse peligrosos, aunque solamente tres de ellos (1/2a, 1/2b y 4b) fueron implicados en el 90 % de los casos de listeriosis en humanos. Particularmente, el serotipo 4b ha sido responsable de la mayoría de los brotes, destacándose la variante 4bv de este como potencialmente patógena (Vázquez Boland *et al.*, 2001; Buchrieser *et al.*, 2007; Velge & Roche, 2010). La serotificación también puede realizarse con técnicas moleculares que emplean genes marcadores específicos (Callejo *et al.*, 2008).

Los estudios filogenéticos y de subtipificación establecen que los serotipos forman una población estructurada y pueden separarse en tres grupos genéticos divergentes denominados linajes. Estos abarcan serotipos estrechamente relacionados con un origen evolutivo común (Ward *et al.*, 2008; Orsi *et al.*, 2011):

Linaje I: Incluye los serotipos 1/2b, 4b, 3b, 4d y 4e. Este linaje está vinculado a epidemias de origen alimentario en humanos y a casos esporádicos en animales.

Linaje II: Incluye a los serotipos 1/2a, 3a, 1/2c y 3c. Se relaciona a muestras ambientales, alimentos y animales.

Linaje III: Abarca a los serotipos 4a y 4c. Principalmente asociado con animales.

1.8 Legislación y vigilancia epidemiológica

En Argentina, las enfermedades infecciosas son documentadas por la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) “Dr. Carlos G. Malbrán”. Este organismo asesora a la Red Nacional de Laboratorios Clínicos dependientes del

Ministerio de Salud y es el laboratorio Nacional de Referencia (LNR).

Si bien la listeriosis no constituye una patología de notificación obligatoria, presenta vigilancia epidemiológica en las secciones: 1- Infecciones Bacterianas Gastrointestinales y ETA y 2- Infecciones Bacterianas del Sistema Nervioso Central (SNC), Respiratorias y Sistémicas (Michanie, 2004; ANMAT, 2018). En la actualidad, Argentina no registra brotes asociados a alimentos contaminados, sin embargo, el LNR documentó 310 casos de listeriosis invasiva desde el año 1985. Estos correspondieron a cuadros de sepsis y meningitis desconociendo la incidencia del patógeno en abortos espontáneos. A pesar de los registros, las falencias en la detección temprana de los brotes y la no notificación de casos esporádicos, imposibilitan conocer el verdadero impacto de esta ETA en la salud pública de nuestro país (Signorini *et al.*, 2017).

Los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios y las normas higiénico-sanitarias, bromatológicas y de calidad, se fundamentan en el Código Alimentario Argentino (CAA) y están reglamentados por el Decreto 2126/71 (Ley 18.284). El SENASA constituye el organismo de control y establece la investigación de *L. monocytogenes* solo en productos cocidos y/o procesados. En este aspecto, las condiciones de aceptación de alimentos están indicadas exclusivamente para salazones, salchichas tipo Viena, chacinados, quesos y carne de ave y crustáceos cocidos. Concretamente, el Capítulo VI de Productos Cárneos y Afines y el Capítulo VIII de Productos Lácteos del CAA, determinan la ausencia de *L. monocytogenes* en 25 gramos para alimentos a base de carne y para quesos de mediana y alta humedad, incluyendo al queso mozzarella (CAA, 2018; Isequilla, 2018).

En países como U.S.A., el criterio microbiológico se aplica para alimentos primarios y procesados, exigiendo la ausencia de *L. monocytogenes* en 25 gramos. En tanto, la Unión Europea (UE) admite hasta 100 UFC/g en alimentos listos para el consumo que no sean destinados a lactantes o usos médicos especiales (Codex Alimentarius, 2007).

1.9 Medidas de control y prevención sanitaria en la cadena productiva de alimentos

La posible presencia de *L. monocytogenes* en alimentos crudos y procesados refuerza la necesidad de establecer barreras que minimicen su ingreso ya sea en los sectores industriales como en los lugares de consumo. Las técnicas sanitarias aplicadas durante el sacrificio de los animales junto con el conocimiento de parámetros físicos y químicos que limitan el desarrollo de la bacteria, son fundamentales para prevenir focos de contaminación y riesgos de padecer una ETA. En este sentido, los APPCC deberían ser parte esencial en las distintas etapas de la cadena alimentaria (producción, manejo y preparación de alimentos) (Cervantes, 2002; Figueroa López *et al.*, 2019). Así también, el control preciso y continuo sobre edificaciones, equipos, personal y materias primas, es necesario para garantizar la calidad microbiológica del alimento y reducir potenciales pérdidas económicas durante el proceso productivo (Cervantes, 2005).

En las industrias alimentarias, existen estrategias de control tendientes a disminuir o evitar la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos. Entre estas medidas se incluyen:

- Realizar prácticas operativas adecuadas con procedimientos eficaces de limpieza y desinfección que garanticen la inocuidad ambiental
- Prevenir la contaminación cruzada tanto en el despiece (faena y evisceración) como en el procesado y la venta
- Establecer sectores separados en plantas de procesamiento, para aislar completamente productos tratados de crudos
- Instaurar el uso de indumentaria apropiada y efectuar un riguroso control del uniforme y calzado del personal
- Exigir un frecuente lavado de manos

- Reducir el tránsito de personas que ingresan al lugar donde se procesan alimentos
- Modificar las prácticas de los operarios cuando sea necesario
- Establecer un programa intensivo de muestreo con el fin de evitar la propagación de la bacteria en los alimentos
- Mejorar el diseño de los equipos para impedir que se formen nichos favorables al crecimiento bacteriano
- Ejercer controles eficaces de tiempo y temperatura durante la distribución y almacenamiento
- Determinar un tiempo razonable de vida útil para alimentos que presenten mayor riesgo de contaminación
- Mantener la cadena de frío durante el transporte de los alimentos crudos y procesados
- Implementar tratamientos tras el envasado que permitan inactivar o retrasar el desarrollo de la bacteria

Por otro lado, debido a que gran parte de las ETA se manifiestan en el último eslabón de la cadena alimentaria, es recomendable que los consumidores sigan buenas prácticas de manipulación e higiene en la preparación de los alimentos. Estas prácticas incluyen:

- Limpiarse de las manos antes de manipular cualquier alimento
- Desinfectar de las superficies, utensilios y tablas para cortar
- Cocinar completamente los productos animales y sus derivados (alcanzar temperaturas internas de 70 y 85 °C en carnes rojas y de ave respectivamente)

- Refrigerar de forma inmediata los alimentos crudos y los excedentes ya cocinados con temperaturas cercanas o inferiores a 5 °C
- Prevenir la contaminación cruzada
- Lavar eficazmente con agua corriente y potable las frutas y hortalizas que vayan a consumirse crudas
- Mantener la cadena de frío durante el transporte de alimentos de riesgo
- Descongelar los alimentos en la parte baja del refrigerador o con artefactos adecuados que lo hagan en forma rápida y segura (microondas)
- Prevenir el consumo de alimentos de riesgo en los grupos más susceptibles (personas inmunodeprimidas)

1.10 Problemática en la erradicación de *L. monocytogenes* en la industria alimentaria

1.10.1 Ineficiencia de agentes desinfectantes

La inmediación a centros urbanos o zonas agrícolas aumenta la posibilidad de introducción de *L. monocytogenes* en los lugares donde se manipulan alimentos, debido a contaminación por masas de aguas, estiércol, suelo o material vegetal en descomposición (Muhterem Uyar *et al.*, 2018).

Entre los diversos productos químicos que se utilizan para higienizar superficies, se incluyen: ácido peracético, yodo, peróxidos, compuestos clorados, desinfectantes de amonio cuaternario, entre otros. En ocasiones estos no garantizan la eliminación completa de la bacteria y pueden perder efectividad debido a la inactivación de sus componentes bactericidas. Tal es el caso de agentes clorados que son inactivados en la presencia de materia orgánica.

La acción de los higienizantes se dificulta también en superficies que permiten la formación de biopelículas o “biofilm” favorecidos por la acumulación de restos orgánicos (Lunden, 2004). Estos nichos dentro del ambiente de la cadena productiva, promueven la multiplicación y establecimiento de *L. monocytogenes*, lo que determina su prevalencia en las industrias y plantas de procesamiento. Durante las operaciones regulares de limpieza, dichos sitios pueden ser difíciles de encontrar y consecuentemente de limpiar, convirtiéndose en reservorios del patógeno desde donde se contaminan los alimentos (Michanie, 2004).

Los sanitizantes de amplio espectro antimicrobiano aplicados frecuentemente en superficies, son poco efectivos contra *L. monocytogenes*. Por este motivo, se han estudiado productos que puedan tener una mayor especificidad frente al control de patógenos alimentarios, como los aceites esenciales o el ácido hipocloroso (De Ancos *et al.*, 2006; Stones, 2009).

1.10.2 Formación de biofilm

Los biofilm son microcolonias constituidas por microorganismos inmersos en una matriz de exopolisacáridos. Esta matriz es secretada por las mismas bacterias y se encuentra firmemente anclada a la superficie sobre la cual se forma. Los biofilm representan un sistema muy eficaz de protección para las especies de *Listeria* spp. frente a condiciones ambientales adversas, como variaciones de temperatura y especialmente contra productos higienizantes. La resistencia a la acción de agentes antimicrobianos se debe a que un alto porcentaje de la población bacteriana se encuentra en la fase de desarrollo estacionario. Esto implica que la tasa de crecimiento en el interior del biofilm sea lenta y requiera de una baja disponibilidad de nutrientes en comparación a la fase exponencial (Kiepek Pearson & Karatan, 2005).

El tipo de superficie donde se establece el biofilm influye en la intensidad de adherencia al material y determina su resistencia frente a la acción mecánica. Se ha demostrado que al emplear productos higienizantes a base de cloro o yodo, las biopelículas de *L. monocytogenes* desarrolladas en goma o polietileno resultan más difíciles de eliminar que aquellas establecidas en acero inoxidable (Jeyasekaran & Karunasagar, 2000). Además, los biofilm formados en este último material, aunque sean más fáciles de eliminar, poseen mayor espesor en comparación a los formados sobre superficies de teflón (Pan *et al.*, 2006). Estos factores deben ser considerados para prevenir puntos de contaminación potenciales dentro de los lugares de procesado de los alimentos. En este aspecto, es fundamental el diseño de los equipos y/o su ubicación en la línea productiva. Está comprobado que el uso de desinfectantes se dificulta en los sistemas cerrados del tipo "cleaning in place"(CIP) en comparación a los sistemas abiertos, donde es posible el cepillado y la limpieza de las unidades (Michanie, 2004).

1.11 Problemática de control en la salud pública

1.11.1 Resistencia a los antibióticos

La mayoría de aislamientos de *L. monocytogenes* presentan sensibilidad a un amplio rango de antibióticos comúnmente utilizados en los tratamientos contra infecciones de Gram positivas, incluyendo: penicilina, ampicilina, gentamicina, tetraciclinas, rifampicina, cotrimoxazol (trimetoprima y sulfametoxazol) y vancomicina. Estos antibióticos se comportan como bacteriostáticos, aunque se ha observado actividad bactericida en vancomicina, cotrimoxazol y naturalmente en aminoglucósidos como la gentamicina (Villalobos & Martínez, 2006; Urbano Cáceres *et al.*, 2017).

Por otro lado, existen antibióticos que no son recomendables para su empleo como agentes terapéuticos. Tal es el caso del ácido nalidíxico, la ciprofloxacina, macrólidos,

y los derivados de β -lactámicos como las cefalosporinas actuales, que presentan baja actividad contra *L. monocytogenes*. Además, se ha informado que varias cepas del patógeno tienen resistencia a la fosfomicina (Torres *et al.*, 2005; Vega & Mercado, 2013).

En determinados aislamientos procedentes de infecciones clínicas y alimentos se han obtenido cepas con resistencia a eritromicina y a cloranfenicol. Asimismo, a pesar del buen comportamiento de los β -lactámicos en la listeriosis, se informaron casos en los cuales el empleo de penicilina y ampicilina no logra un adecuado control clínico del patógeno. La rifampicina, por su parte, aunque posee una actividad “*in vitro*” efectiva, puede seleccionar cepas resistentes con facilidad durante tratamientos prolongados. La resistencia a los antibióticos generalmente está asociada a plásmidos, sin embargo puede estar codificada por el ADN cromosómico como en el caso de algunas tetraciclinas (Villalobos & Martínez, 2006; Moreno Córdova & Mercado Martínez, 2014).

1.12 Tratamientos de inactivación de *L. monocytogenes* en alimentos

1.12.1 Métodos físicos

Los tratamientos térmicos resultan ser los más prácticos y efectivos para eliminar *L. monocytogenes* de los alimentos. Las industrias alimentarias utilizan la pasteurización (63°C durante 30 minutos o 71,7 °C durante unos 15 segundos), la cual garantiza la destrucción del patógeno en alimentos que posteriormente deben ser refrigerados, y la esterilización (120 °C durante 4 minutos), eficaz en alimentos como leche, zumos de frutas y concentrados que pueden ser almacenados prescindiendo de la refrigeración (Elika, 2013).

En la industria pesquera, el crecimiento de esta bacteria en condiciones de refrigeración, ha incentivado el empleo de agua electrolizada ácida y agua electrolizada

neutra como tratamientos desinfectantes de filetes frescos en combinación con procesos térmicos leves. En este caso se han obtenido mejores resultados con el agua electrolizada neutra al no perjudicar la calidad proteica de los productos de mar (Ovissipour *et al.*, 2018).

En ciertos alimentos frescos y en superficies inertes, la utilización de dióxido de cloro (ClO₂) es una tecnología efectiva. Este método basa su efecto antimicrobiano en el poder altamente oxidante, lo cual daña las membranas y enzimas del patógeno. La reactividad y solubilidad de este gas están condicionadas por la temperatura, lo que influye en su eficiencia bactericida. Sin embargo, el empleo de altas concentraciones del mismo puede provocar daños en las instalaciones y superficies donde se procesan alimentos o causar cambios en la calidad de los mismos (Park & Kang, 2018). Por otro lado, la aplicación de radiaciones ionizantes constituye un método no térmico de alta energía para la destrucción de patógenos, aunque pueden generar efectos adversos en las propiedades sensoriales y nutricionales de alimentos de origen animal. Las radiaciones más utilizadas son los rayos X y gamma y los electrones acelerados. La letalidad de estos agentes físicos depende de la temperatura y la actividad agua del medio, por lo que la radiorresistencia aumenta cuando estos parámetros descienden. La efectividad contra *L. monocytogenes* en alimentos cárnicos es variable, pero en canales de aves puede reducir considerablemente los niveles microbianos hasta tasas extremadamente bajas (Ordóñez Pereda *et al.*, 2004). Si bien la irradiación aumenta la vida útil del alimento, pueden producirse contaminaciones post-proceso. Las radiaciones gamma han resultado de interés en el control de poblaciones de *L. monocytogenes* en carne de pavo y pollo refrigerado (Kamat & Nair, 1995; Thayer *et al.*, 1998). Por su parte, el empleo de radiaciones con luz ultravioleta puede ser igualmente interesante debido a que *L. monocytogenes* presenta menos resistencia comparada con otras bacterias Gram

positivas (ICMSF, 1998).

El empleo de altas presiones hidrostáticas (pasteurización hiperbárica) puede ser también efectivo para eliminar poblaciones de *L. monocytogenes*. Este tratamiento no perjudica las cualidades nutricionales del alimento, aunque su eficacia depende de la temperatura y el tiempo de presurización (Kalchayanand *et al.*, 1998). Los estudios evidencian que esta tecnología puede reducir la viabilidad de cepas de *L. monocytogenes* y *L. innocua* (Alpas *et al.*, 1998; Alpas *et al.*, 2000). El efecto antimicrobiano se debe a la inducción de estrés mecánico en las paredes celulares, alteración de la permeabilidad de las membranas y destrucción estructural de proteínas y polisacáridos (Murano *et al.*, 1999; Tholozan, 2000; Garriga *et al.*, 2002). Sin embargo, las desventajas en el uso de altas presiones en la industria alimentaria, se relacionan a la reducción de la vida útil de los equipamientos y su elevado costo (Garriga *et al.*, 2002).

Entre los métodos físicos para la desinfección de carcasas de pollo, se incluyen diversos tratamientos: vapor de agua y vacío, inmersión en agua caliente, pasteurización con vapor, radiaciones electromagnéticas y ionizantes y congelación (Moreno, 2006). En las plantas de faena, se utiliza habitualmente el tratamiento con agua caliente y su efectividad se relaciona con la temperatura de la misma (Barnhart *et al.*, 1999). Sin embargo, el vapor presenta mayor capacidad de penetración en la carne de la canal, por lo que su empleo es más ventajoso respecto al agua líquida (James *et al.*, 2007).

A pesar de existir diversos métodos físicos que garantizan la preservación de los alimentos, la refrigeración es la herramienta más habitual en el caso de la carne para retardar el crecimiento de patógenos. Además, si las temperaturas superan el punto de congelación, la formación de cristales de hielo causa la lisis de la célula bacteriana (Li & Torres, 1993).

1.12.2 Métodos químicos

Estos métodos se basan en la aplicación de distintos productos químicos o aditivos que retardan la proliferación de microorganismos. La aplicación de estas sustancias antimicrobianas se complementa con las condiciones de manipulación sanitaria eficientes por lo que el alimento debe presentar una adecuada calidad microbiológica para que esta técnica funcione correctamente.

Los efectos adversos a causa del empleo de compuestos químicos derivan en el perjuicio de la salud de trabajadores, la corrosión de equipos y las alteraciones sensoriales que pueden producirse en la carne (Smulders & Woolthuis, 1985). La desventaja de los productos químicos también se debe a la posibilidad que tienen estas moléculas de inducir resistencia en los microorganismos, reduciendo su efectividad antimicrobiana.

La desinfección de las canales de pollo mediante productos químicos puede ser durante la faena o después de la evisceración y en todo caso antes del enfriamiento para reducir la contaminación de la carne con bacterias provenientes de la piel o restos de intestinos. La efectividad de estos tratamientos depende de diversos factores incluyendo la temperatura, humedad y la presencia de grasa (Van Netten *et al.*, 1995).

La aplicación en los alimentos de diversos ácidos orgánicos débiles como el láctico, cítrico, peroxiacético, málico, fumárico y propiónico es una herramienta difundida en algunos países. La utilización de ácido láctico y cítrico ha sido ampliamente estudiada como desinfectante en canales de pollo (Di Schiavi, 2015). Sin embargo, en Argentina, el SENASA autoriza el empleo de estos agentes antimicrobianos en canales bovinas y no así en carcasas de pollos. Las concentraciones permitidas están entre 0,05 % y 2,5 %. El efecto bactericida de los ácidos orgánicos depende de una serie de factores físicos que condicionan su estado de ionización. En su forma no ionizada, el ácido penetra a través de la membrana de la célula microbiana. Una vez en el interior de la bacteria, este

se disocia y produce una serie de alteraciones entre las que se destacan: acidificación intracelular, caída del gradiente electroquímico, inactivación enzimática, interferencia del transporte de fosfatos y aminoácidos, entre otros (Mountney & O' Malley, 1965).

A pesar de los diversos métodos de descontaminación disponibles, los sistemas de desinfección de canales en la industria cárnica se basan comúnmente en compuestos clorados. Estos tratamientos químicos incluyen la aplicación de hipoclorito de sodio o clorito de sodio acidificado en el agua de lavado (Di Schiavi, 2015).

1.12.3 Métodos biológicos

Las biotecnologías aplicadas a la industria alimentaria surgen como una alternativa segura, viable y eficaz al uso de aditivos o conservantes, evitando la posibilidad de reacciones adversas generadas por estos agentes. Estos métodos responden a la creciente demanda de los consumidores por alimentos con cantidades mínimas de componentes químicos, que presenten escasa manipulación o tratamientos y que no impliquen cambios en su calidad nutricional, su sabor o textura. La principal ventaja es que estas técnicas biológicas no producen efectos tóxicos en mamíferos y se aplican para prevenir o erradicar la contaminación microbiana tanto en los alimentos como en su entorno industrial.

Entre las diversas tecnologías dirigidas para el control específico de *L. monocytogenes*, se destacan el empleo de bacteriófagos (Guenther *et al.*, 2009; Iacumin *et al.*, 2016), el uso de extractos vegetales provenientes de romero, té verde u orégano (Theivendran *et al.*, 2006) y las sustancias producidas por las bacterias ácido lácticas (BAL) (Izquierdo *et al.*, 2009).

El empleo de bacteriófagos se aprobó en el año 2006 para el control de *L. monocytogenes* en carne y productos avícolas (Endersen *et al.*, 2014). Actualmente se

dispone de cepas de fagos que presentan función antilisteria sobre distintos serotipos de la especie. Estos fueron empleados eficazmente sobre varios alimentos incluyendo: quesos maduros, leche, carnes de ave, mariscos, salchichas y vegetales. Específicamente, la cepa FWLLm1 resultó apropiada en el tratamiento de pechuga de pollo lista para el consumo (Bai *et al.*, 2016). La función antibacteriana de los fagos se presenta al final de su ciclo infectivo y se basa en la actividad lítica de las endolisinas que degradan el peptidoglucano de la bacteria parasitada. Estas enzimas también pueden resultar efectivas al ser aplicadas en los alimentos en forma externa para el control de bacterias Gram positivas (Endersen *et al.*, 2014).

Por su parte, algunas BAL son consideradas microorganismos GRAS (*General Regarding as Safe*). Dentro de este grupo se incluyen especies de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, entre otras. Varias cepas son controladores biológicos debido a su capacidad de producir sustancias antimicrobianas denominadas bacteriocinas. Estos productos provenientes del metabolismo secundario son de naturaleza peptídica y actúan de manera específica para ciertos patógenos como *L. monocytogenes* (de la Fuente Salcido & Barboza Corona, 2010). Algunas de estas bacteriocinas están autorizadas como preservantes naturales o bioconservadores de alimentos al carecer de toxicidad (O’Keeffe & Hill 2000; Mondragón Preciado *et al.*, 2013).

1.13 Métodos de detección de *L. monocytogenes*

Las técnicas microbiológicas para la detección de la especie *L. monocytogenes* en alimentos se basan en el cultivo estándar de los aislamientos a evaluar o en métodos de detección rápida que incluyen *kits* bioquímicos, anticuerpos o técnicas moleculares. Sin embargo, estas últimas junto con las técnicas inmunológicas y las que implican la

utilización de biosensores, requieren previamente del enriquecimiento en cultivo para un mejor análisis ya que carecen de sensibilidad y especificidad para pruebas directas de los alimentos. Por otra parte, el cultivo en medios específicos, es un método sensible de bajo costo que permite el análisis cualitativo y cuantitativo con la desventaja del tiempo requerido para el aislamiento y confirmación (Valderrama *et al.*, 2016).

Dentro de los *kits* basados en ensayos bioquímicos, se encuentra el sistema Api *Listeria*. Este incluye una batería bioquímica con diez pruebas diferenciales: hidrólisis de esculina, presencia de arilamidasa (prueba DIM) y manosidasa y utilización de azúcares (ácido D-arabitol, D-xilosa, L-rhamnosa α -D- metil glucósido, D-ribosa, glucosa-1-fosfato y D-tagatosa) (Bille *et al.*, 1992). La metodología permite diferenciar *L. monocytogenes* de *L. innocua* mediante la determinación de la capacidad enzimática del microorganismo, evidenciada por un cambio de color.

Por su parte, los métodos de enriquecimiento en cultivo, se basan en el empleo de medios selectivos de aislamiento para la identificación de *L. monocytogenes* en alimentos o muestras ambientales. Se estima que el umbral establecido para la apropiada detección es de 10^4 - 10^5 UFC/mL, por lo que el cultivo deberá permitir un desarrollo adecuado del microorganismo. En esta metodología, se utilizan distintos compuestos antimicrobianos que inhiben la microbiota competidora de *Listeria* spp. Por lo tanto, se incluyen antibióticos, que evitan tanto el crecimiento de bacterias Gram positivas como de Gram negativas (acriflavina y ácido nalidíxico respectivamente). También se pueden adicionar agentes antihongos como la cicloheximida o compuestos antimicrobianos como el cloruro de litio y las cefalosporinas de amplio espectro.

La etapa de enriquecimiento se puede complementar empleando medios que evalúan la capacidad de hidrólisis de la esculina. Este carbohidrato, al ser hidrolizado por *Listeria* spp. produce un precipitado negro característico (Law *et al.*, 2015). En la

actualidad, se utilizan medios de cultivo que permiten el adecuado aislamiento de especies del género *Listeria*, como el medio de cultivo PALCAM o el medio OXFORD. Estos medios no permiten distinguir *L. monocytogenes* de especies no patogénicas, por tal motivo se han desarrollado medios agarificados como ALOA *Listeria* y CHROMagar™ *Listeria*.

2. HIPÓTESIS

La extensa búsqueda bibliográfica realizada resalta la importancia sanitaria que *L. monocytogenes* tiene en la salud pública. Su ubicuidad en la industria alimentaria y su difícil eliminación durante las etapas de procesado, condujo a suponer que este microorganismo podía estar presente en alimentos cárnicos frecuentemente consumidos en nuestro país, como la carne de pollo. Por este motivo se formuló la siguiente hipótesis:

- Debido al alto grado de intensificación de la industria avícola y a las diversas tareas de procesamiento que se efectúan durante toda la cadena productiva desde la granja hasta la etapa de comercialización, los cortes de pollo provenientes de comercios locales están contaminados con *L. monocytogenes* y/o sus especies afines, representando esto un potencial peligro para la salud pública.

3. OBJETIVOS

Si bien se han realizado estudios microbiológicos que determinan condiciones higiénicas insuficientes en la cadena productiva, la prevalencia de esta bacteria en la carne cruda aviar no ha sido considerada con la importancia que se merece. La mayoría de los trabajos de investigación se centralizan en los alimentos listos para el consumo, que en definitiva son los que exhiben mayor riesgo.

Sin embargo, en nuestro país se desconoce la participación de *L. monocytogenes* en la carne de pollo comercializada y su potencial riesgo patogénico como agente productor de ETA. Además, la listeriosis no invasiva es una enfermedad de notificación no obligatoria y los casos esporádicos asociados a los productos cárnicos crudos podrían subestimarse.

En base a los criterios mencionados y debido a que no existen estudios actuales de relevamiento de especies de *Listeria* spp. en la localidad de Bahía Blanca, se propusieron los siguientes objetivos:

3.1 Objetivos generales:

- Investigar la presencia de especies del género *Listeria* en la carne de pollo comercializada localmente.
- Determinar de manera indirecta el estado de las condiciones sanitarias correspondientes en la cadena productiva aviar.

3.2 Objetivos particulares:

- Caracterizar fenotípicamente especies del género *Listeria* en trozados de pollo procedentes de bocas de expendio minoristas y supermercados.
- Establecer el potencial riesgo en la salud pública que represente particularmente el aislamiento de *L. monocytogenes*.

4. METODOLOGÍA

4.1 Aislamiento, caracterización e identificación de *Listeria* spp. en carne de pollo

Los análisis experimentales fueron llevados a cabo en el Dpto. de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur en el laboratorio de Microbiología Agrícola.

Al iniciar el estudio se seleccionaron al azar 20 comercios expendedores ubicados tanto en zonas céntricas como periféricas de la ciudad de Bahía Blanca. Estos sectores incluyeron almacenes, pollerías y supermercados. En cada comercio se muestrearon 3 tipos de corte: pata, muslo y pechuga. A fin de reducir la variabilidad de las muestras obtenidas, se realizaron tres muestreos en distintos períodos del año, correspondientes a los meses de febrero, junio y noviembre. Se obtuvieron en total 180 presas durante todo el ensayo. Las muestras se colocaron en recipientes estériles y se almacenaron a 4 °C en una conservadora con geles refrigerantes hasta su traslado al laboratorio. El procesamiento de las mismas se realizó dentro de las cuatro horas posteriores a la recolección del material para evitar alterar las condiciones iniciales. Una vez en el laboratorio, se pesaron 25 gramos de cada corte incluyendo carne, piel y grasa. Posteriormente las muestras se analizaron en una Cabina de Seguridad Biológica Clase II (Figura 4), utilizándose indumentaria y accesorios de protección personal adecuada: guardapolvo, guantes de látex, barbijo, antiparras y calzado asignado específicamente para esa área de trabajo. Todas actividades se realizaron manteniendo las condiciones asépticas para evitar la contaminación cruzada.



Figura 4. Cabina de Seguridad Biológica Clase II.

El aislamiento *L. monocytogenes* se llevó a cabo empleando un protocolo basado en el criterio presencia-ausencia según USDA/FSIS (2019). En esta metodología, se utilizan medios de cultivo específicos y suplementos antibióticos que favorecen el crecimiento de especies del género *Listeria* (Figura 5). Los antibióticos se presentan en polvo contenidos en viales de vidrio (liofilizados) y son preparados al momento de su empleo. Previo a al agregado de estos suplementos, los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 1 atm durante 15 minutos (121° C). El procedimiento se dividió en tres etapas cada una con sus correspondientes medios y suplementos:

1) Pre-enriquecimiento: Caldo UVM I (University of Vermont Medium. Oxoid CM 863) con ácido nalidíxico y acriflavina (Oxoid SR142E) (Anexo 1.1).

2) Enriquecimiento: Caldo FRASER (Oxoid CM 895) con ácido nalidíxico, acriflavina y citrato férrico amónico (Oxoid SR 156 E) (Anexo 1.2).

3) Detección: Agar OXFORD (Oxoid CM 856) con suplementos selectivos de *Listeria* constituidos por cicloheximida, sulfato de colistina, acriflavina, cefotetan y fosfomicina (Oxoid SR140E) (Anexo 1.3).

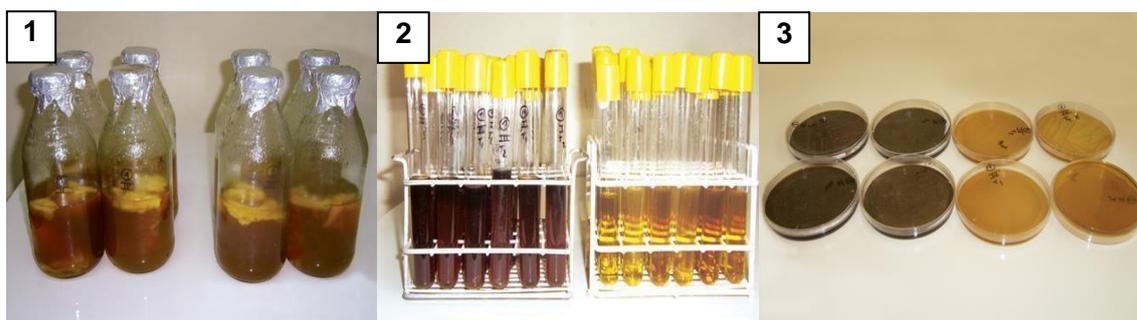


Figura 5. Medios de cultivo específicos para el aislamiento de *Listeria* spp. 1) Cultivo en medio UVM I. 2) Cultivo en medio FRASER. 3) Cultivo en Agar OXFORD.

En la etapa de pre-enriquecimiento, las muestras de 25 gramos se colocaron dentro de frascos conteniendo 225 mL de medio UVM I, se distribuyeron mediante agitación y se incubaron a 30 °C durante 24 horas. Posteriormente, a partir de este cultivo, se transfirieron alícuotas de 1 mL de inóculo a tubos conteniendo 10 mL de Caldo FRASER estéril, los que fueron incubados a 35 °C durante 24 horas. A continuación, se tomaron alícuotas de 0,1 mL de este Caldo FRASER y se sembraron sobre cajas de Petri conteniendo Agar OXFORD. Se inocularon tres cajas por corte muestreado. La incubación se realizó a 35 °C durante 24 horas.

La presencia del género *Listeria* en el Agar OXFORD se confirmó mediante la observación de colonias negras o grisáceas rodeadas por un halo oscuro. Este principio se basa en la capacidad de este género bacteriano de hidrolizar el glucósido esculina a

esculetina. Esta molécula forma complejos fenólicos con los iones hierro presentes en el medio y produce el color característico (Prieto 2008; Law *et al.*, 2015).

Las colonias obtenidas se repicaron en tubos conteniendo Agar Triptona Soja (ATS) con extracto de levadura (0,6 % p/v) (Anexo 1.13) y se incubaron a 37 °C durante 18 a 24 horas. Posteriormente, a partir de cultivos puros se realizó la caracterización morfológica de la población bacteriana empleando la tinción de Gram. Para identificar las especies del género *Listeria*, se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes según *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Bergey & Holt, 1994), Ryser & Marth (1999) y Pascual Anderson & Calderón y Pascual (2000). Los cultivos empleados fueron repicados en medio fresco 24 horas antes de efectuar cada prueba. Para cada aislamiento se realizaron 3 repeticiones. En todos los ensayos se utilizó la cepa patrón ATCC 19115 como cultivo de referencia de *L. monocytogenes*, cedida por ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Las pruebas fenotípicas que permitieron la evaluación de las cepas aisladas se describen a continuación.

4.2 Tinción de Gram

La tinción de Gram es una tinción diferencial empleada para la identificación de bacterias con distintas características estructurales. La técnica requiere 4 soluciones que son agregadas a la colonia de estudio en el orden siguiente:

- 1) Primer colorante: es un colorante básico que, en contacto con las células cargadas negativamente, reacciona con ellas coloreándolas. El más utilizado es el cristal violeta o el violeta de genciana.
- 2) Solución mordiente: esta solución fija las tinciones y aumenta la afinidad entre el colorante y las células. El mordiente comúnmente empleado es una solución yodo-iodurada o Solución de Lugol (Anexo 1.7).

3) Agente decolorante: consiste en un disolvente orgánico, generalmente alcohol-acetona en proporción 1:1.

4) Colorante de contraste: está constituido por un colorante básico de distinto color al primer colorante. El más común es la safranina.

Según la composición química de la envoltura celular se pueden distinguir dos grupos bacterianos; Gram positivos o Gram negativos, difiriendo en el color con el que finalmente aparecen. Los microorganismos pertenecientes al primer grupo se teñirán de azul por el cristal violeta y no perderán esta coloración durante los pasos sucesivos. En tanto, las bacterias Gram negativas perderán la coloración inicial del cristal violeta en los siguientes pasos y se teñirán de rosa debido a la safranina. Esto es posible debido a que las bacterias Gram positivas poseen una gruesa malla de peptidoglucano en su parte más externa (casi el 90 % de la pared) a diferencia de las bacterias Gram negativas que están recubiertas por una fina capa del mismo (5 al 20 % de la pared). Además, estas últimas, presentan una membrana externa de lipopolisacáridos y proteínas que envuelven toda la célula.

Esta prueba se realizó empleando un *kit* para la detección Gram siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego del procedimiento de tinción, los preparados se visualizaron mediante microscopía de campo claro seleccionando aquellos aislamientos correspondientes a cocobacilos o bacilos cortos Gram positivos.

4.3 Pruebas bioquímicas

4.3.1 Empleo de azúcares y polialcoholes como sustratos fermentables

Mediante este ensayo se demuestra la capacidad de utilizar un determinado hidrato de carbono a través de la vía fermentativa. Durante este proceso, se generan productos ácidos que cambian la coloración del medio. El mismo contiene el indicador rojo fenol,

el cual presenta un color rojo en condiciones alcalinas y vira a amarillo a pH menor de 6,8.

Para realizar esta prueba, se preparó previamente el Medio Base de Caldo Rojo Fenol (Anexo 1.4) y se agregó 1 % p/v del sustrato: D-xilosa, manitol, L-ramnosa o D-glucosa. Este se esterilizó a 3/4 atm durante 15 minutos y posteriormente se inoculó con un cultivo de cada aislamiento. La incubación se realizó a 35 °C durante 48 horas.

4.3.2 Prueba del rojo de metilo

Esta prueba se basa en el empleo del indicador rojo de metilo para determinar el pH del medio. La técnica determina la capacidad de un microorganismo de formar productos ácidos (láctico, fórmico o acético) a partir de la fermentación de la glucosa y mantenerlos venciendo el poder buffer del sistema. En un tiempo de incubación prolongado de 48 horas, los microorganismos que son rojo de metilo positivos producen ácido en suficiente cantidad contrarrestando el sistema amortiguador del fosfato. Por su parte, aquellos que son rojo de metilo negativos, metabolizan los productos iniciales de la fermentación dando productos neutros que disminuyen la acidez del medio. Esto último conduce a un aumento del pH. En un pH inferior a 4,4 el indicador vira de un color naranja a un color rojo, mientras que a un pH superior a 6 toma un color amarillo.

Para realizar esta prueba, se empleó el Medio de Cultivo de Clark & Lubs (Caldo Rojo Metilo/Voges Proskauer) (Anexo 1.5), el cual se esterilizó en autoclave a 1 atm durante 15 minutos (121 °C). Luego de la inoculación de los aislamientos, los cultivos se incubaron a 35 °C durante 48 horas. El posible viraje de color se determinó retirando asepticamente 2,5 mL del caldo y agregando 5 gotas del indicador rojo de metilo.

4.3.3 Voges-Proskauer (VP)

En este ensayo se utiliza el mismo medio de cultivo que en la prueba del rojo de metilo por lo que estas determinaciones se hacen en simultáneo. Además, se emplean dos reactivos: α -naftol al 5 % p/v (intensificador del color) e hidróxido de potasio (KOH) al 40 % p/v (agente oxidante). La técnica determina la capacidad de un microorganismo de producir acetil-metil-carbinol (2,3 butanodiol) a partir de la glucosa. Este compuesto neutro es producto de la fermentación butilenglicólica y es obtenido a partir de la degradación del ácido pirúvico. Así, los microorganismos fermentadores mixtos de la glucosa pueden seguir distintas vías metabólicas: producir solamente ácidos como producto final sin presencia de 2,3 butanodiol (VP negativos) o generar 2,3 butanodiol como producto principal (VP positivos).

En presencia de oxígeno atmosférico, la acetoina y el 2,3 butanodiol (productos finales neutros) se oxidan con los reactivos alcalinos generando diacetilo. En condiciones alcalinas, el diacetilo y el grupo guanidino del aminoácido arginina presente en la peptona del medio de cultivo, originan un compuesto de color rojo rosado. La reacción colorimétrica se produce en la superficie del medio de cultivo.

Para realizar esta prueba, se inocularon cultivos frescos en el Caldo RM/VP estéril y se incubaron 48 horas a 35 °C. Posteriormente, se retiró asépticamente 2,5 mL del caldo desarrollado y se agregaron 0,6 mL de solución de alfa naftol al 5 % p/v y 0,2 mL de solución de KOH al 40 % p/v. A continuación, se agitó cada tubo para exponer su contenido al oxígeno atmosférico y facilitar la oxidación. La interpretación de los resultados se hizo luego de 10-15 minutos, observándose un color rojo rosado (reacción positiva) en la superficie del medio o un color amarillo correspondiente al reactivo (reacción negativa).

4.3.4 Hidrólisis del almidón

Este ensayo determina la capacidad de un microorganismo para hidrolizar el almidón y por ende, la producción de la exoenzima amilasa. Esta enzima rompe específicamente las uniones α -1,4 de la macromolécula produciendo dextrinas, maltosa y glucosa. Si el almidón no es sustrato del microorganismo a evaluar, el yodo contenido en una solución iodo-iodurada reacciona con el polisacárido generando una coloración azulada.

Para realizar esta prueba se utilizó un medio de agar nutritivo conteniendo 1 % p/v de almidón soluble (Agar Almidón; Anexo 1.6) el cual se esterilizó en autoclave a 1 atm durante 15 minutos (121 °C). Posteriormente, el medio se volcó en cajas de Petri estériles hasta su utilización. Las cajas se inocularon por estría con cada cultivo y se incubaron a 35 °C durante 48 horas. La presencia de almidón, se verificó inundando la caja con la Solución de Lugol (Anexo 1.7). La reacción se consideró positiva para la hidrólisis del polisacárido al observar una zona clara alrededor del desarrollo bacteriano, con el resto de la superficie del medio coloreada de azul.

4.3.5 Ensayo en Medio SIM

El Medio SIM es un medio semisólido que contiene agar al 0,2 % p/v (Anexo 1.8). Se utiliza para evaluar: movilidad, formación de indol y producción de sulfuro de hidrógeno (SH₂).

a) Movilidad

Las bacterias pueden presentar movilidad en el Medio SIM al contener uno o varios flagelos. Estas estructuras cambian su localización según la especie bacteriana y las condiciones de cultivo. La reacción de movilidad se considera positiva cuando se

observa un enturbiamiento del medio en forma de sombrilla invertida sobre la línea de siembra. En tanto, si el microorganismo carece de movilidad, el crecimiento bacteriano sigue la línea de siembra mientras que el medio circundante permanece claro.

b) Formación de indol

El Medio SIM contiene el aminoácido triptófano, el cual puede ser utilizado como sustrato de los microorganismos para producir indol. La presencia de indol se detecta mediante una reacción colorimétrica empleando el Reactivo de Kovac (Anexo 1.9) resultante en la formación de un anillo rojo en la superficie del medio.

c) Producción de SH₂

La capacidad de un microorganismo de liberar SH₂ a partir de aminoácidos azufrados (cistina, cisteína y metionina) puede ser revelada con el Medio SIM, el cual también contiene citrato de hierro. La formación de SH₂ por la acción de enzimas microbianas específicas produce un precipitado negro de sulfuro ferroso que es observado en el tubo.

Para realizar las pruebas correspondientes el Medio SIM se esterilizó en autoclave a 1 atm durante 15 minutos (121°C). La siembra se realizó por punción en el centro del medio de cultivo hasta 2/3 de profundidad. Los tubos se incubaron en estufa a 30 °C durante 48 horas.

4.3.6 Prueba de la catalasa

Mediante esta técnica se comprueba la presencia de la enzima catalasa la cual descompone el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua y oxígeno. El H₂O₂ es un producto terminal del metabolismo oxidativo de los azúcares y su acumulación en las

células resulta tóxica, por lo que los microorganismos aerobios y la mayoría de anaerobios facultativos disponen de esta enzima. En la reacción participan dos moléculas de H_2O_2 donde una actúa como sustrato y la otra funciona como dador. Si el microorganismo presenta la enzima catalasa, ante la aplicación de H_2O_2 se observan burbujas debido a la liberación de oxígeno, de acuerdo a la siguiente reacción:



Para realizar esta prueba, un inóculo de cada aislamiento se colocó sobre un portaobjetos con la ayuda de un ansa estéril. Posteriormente, se agregó sobre el inóculo una gota de H_2O_2 al 30 % v/v y se observó el desprendimiento de burbujas.

4.3.7 Reducción de nitratos

Mediante esta técnica se determina la capacidad de un microorganismo de reducir los nitratos (NO_3^-) y transformarlos en nitrito (NO_2^-) o nitrógeno libre (N_2). El proceso se lleva a cabo en condiciones anaeróbicas y el nitrato resulta ser el aceptor final de electrones. El ensayo requiere de un Caldo Nitrado (Anexo 1.10) y los siguientes reactivos:

- Solución A: α -naftilamina al 0,5 % v/v y ácido acético al 30 % v/v
- Solución B: Ácido sulfanílico al 0,8 % v/v y ácido acético al 30 % v/v
- Cinc en polvo

Para realizar esta prueba se inocularon cultivos frescos en un Caldo Nitrado estéril y se incubaron a 35 °C durante 24 horas. Cada tubo estaba provisto con una campana Durham. Se utilizó un tubo sin inocular como control negativo. Posteriormente se realizó el ensayo de la siguiente manera:

Fase 1

Luego de la incubación, se añadió 1 mL de solución A y 1 mL de solución B. Se observó el posible viraje del medio a un color rojo dentro de los 30 segundos. Un resultado positivo en esta fase, constató que el nitrito era producto del metabolismo microbiano. La coloración roja se genera por la reacción del ácido sulfanílico (inoloro) y la α -naftilamina con el nitrito presente en el medio y produce un compuesto diazoico denominado p-sulfobenceno-azo- α -naftilamina.

Fase 2

Esta fase se realizó en caso que la fase 1 haya resultado negativa; se agregaron 20 mg de polvo de cinc y se detectó el posible viraje dentro de 30 segundos. La aparición de color rojo evidenció que el microorganismo no produjo la reducción del nitrato. En tanto, la no aparición de color, determinó que el microorganismo había reducido el nitrato a nitrito y continuó este proceso hasta la formación de compuestos gaseosos.

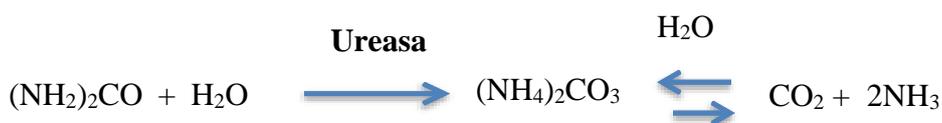
4.3.8 Prueba oxidasa

Esta prueba comprueba la presencia de citocromo c oxidasa, enzima constituyente de la cadena transportadora de electrones en bacterias aerobias y anaerobias facultativas. Se utilizan discos (incolores) que contienen una amina aromática primaria (generalmente tetrametil p-fenilendiamina dehidrocloruro) como sustrato artificial. Este compuesto es oxidado por la enzima del microorganismo en presencia de oxígeno atmosférico produciendo indofenol. En estos casos, el disco se observa de un color rosado o fucsia.

Para realizar esta prueba se colocaron discos Oxoid (Britania) en tubos conteniendo 2 mL de agua destilada estéril (ADE). Posteriormente los tubos se inocularon con un cultivo fresco de cada aislamiento y se observó el posible viraje de color.

4.3.9 Prueba ureasa

Este ensayo determina la capacidad del microorganismo de hidrolizar la urea a través de la enzima ureasa con formación de dos moléculas de amoníaco (NH₃). La liberación de NH₃ produce un aumento de pH lo cual es reflejado por el rojo fenol presente en el medio. El indicador presenta un viraje de color en condiciones altamente alcalinas (pH 8,4). La reacción de descomposición de la urea es la siguiente:



Se empleó el Medio de Christensen (medio base) solidificado conteniendo una concentración de urea al 20 % p/v (Anexo 1.11). Este medio contiene glucosa la cual constituye una fuente de energía que estimula a la enzima ureasa y evita que los microorganismos que no utilizan la urea como fuente de nitrógeno, obtengan energía de la peptona, evitando así generar un resultado falso positivo. Por otra parte, debido a la descomposición de la urea en altas temperaturas, su esterilización se realizó de manera separada. Para esto, se disolvieron 20 gramos de urea en 100 mL de ADE añadiendo posteriormente unas gotas de cloroformo. Antes de su utilización, se dejó reposar 24 horas en heladera. Posteriormente, la solución de urea se adicionó al medio base estéril y la solidificación se realizó en forma pico de flauta.

La inoculación se efectuó con cultivos frescos de cada aislamiento incubando los tubos a 35 °C durante 24 horas. El viraje del indicador rojo fenol de amarillo a rosado indicó un resultado positivo.

4.3.10 Hemólisis en agar sangre

Esta prueba determina la capacidad de un microorganismo de degradar eritrocitos (hemólisis) mediante la acción enzimática. Para esto, se utilizaron cajas de Petri

conteniendo Agar Sangre de Carnero (Britania) (Anexo 1.12). El medio se dividió en sectores cuadriculados y en cada sector delimitado se sembró por punción una pequeña cantidad de inóculo. Posteriormente, las cajas se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Los resultados fueron expresados según el tipo de reacción:

- Hemólisis β : hemólisis parcial con la zona de crecimiento rodeada de un halo color verdoso
- Hemólisis β fuerte: hemólisis total con colonias rodeadas de un halo transparente
- Hemólisis γ : sin hemólisis y sin halo alrededor de la colonia

4.3.11 Prueba de CAMP (Christie Atkins y Munch Peterson)

Esta técnica determina la capacidad de un microorganismo de intensificar la reacción hemolítica de *Staphylococcus aureus* a través de la producción de una proteína extracelular difusible (factor CAMP) que actúa de manera sinérgica con la β -hemolisina de *S. aureus*.

Para realizar esta prueba, se utilizaron cajas de Petri conteniendo Agar Sangre de Carnero (Britania). Se realizaron 6 siembras por caja de cada aislamiento trazando estrías en línea recta desde el borde hasta el centro del medio de cultivo. Posteriormente, de forma perpendicular a las siembras realizadas se practicó una estría con una cepa hemolítica de *S. aureus*, evitando el contacto entre las líneas de siembra. La incubación se realizó en aerobiosis a 37 °C durante 24 horas. La observación de una zona de lisis intensificada en forma de punta de flecha entre las intersecciones de las estrías, se consideró como resultado positivo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Presencia de *Listeria* spp. en carne de pollo de comercios locales

De acuerdo a los resultados obtenidos, los 20 locales muestreados resultaron positivos en el aislamiento de *Listeria* spp. En la totalidad de los 180 cortes evaluados incluyendo pechugas, patas y muslos fue posible detectar colonias típicas del género. Estas colonias se identificaron por la formación de un halo oscuro producto de la hidrólisis de la esculina contenida en el medio de cultivo OXFORD (Figura 6). Posteriormente, se seleccionaron 180 colonias representativas provenientes de cada experimento y se repicaron en ATS y extracto de levadura (0,6 % p/v) como se mencionó en la sección de Metodología. Estos aislamientos fueron analizados por tinción de Gram y se emplearon para la clasificación por especie basada en las pruebas bioquímicas según *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1994), Ryser & Marth (1999) y Pascual Anderson & Calderón y Pascual (2000).

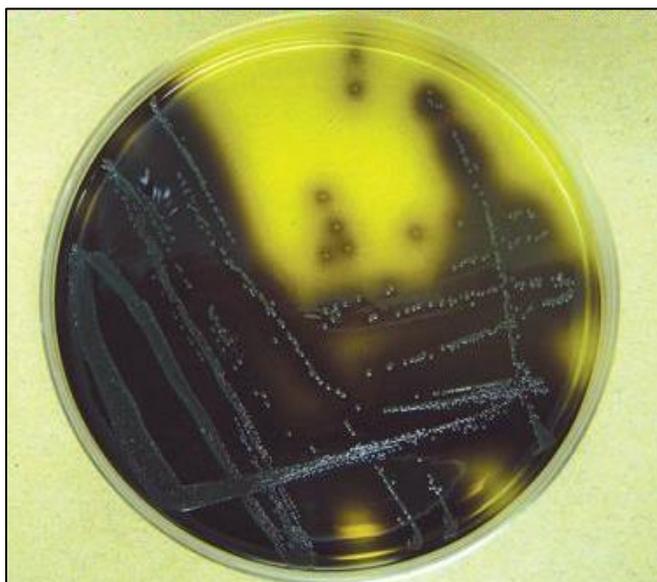
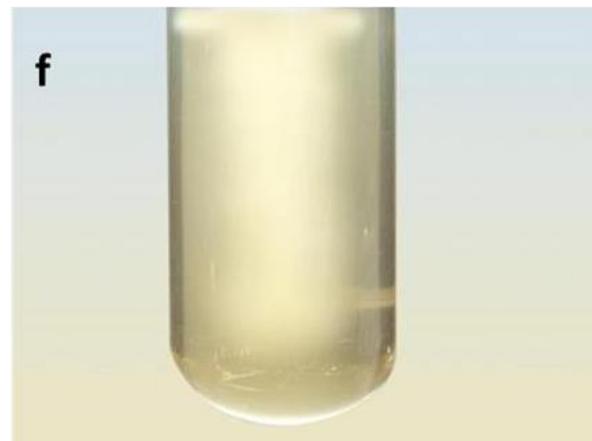
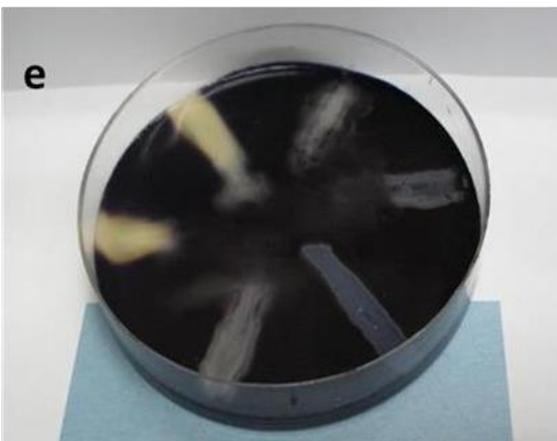
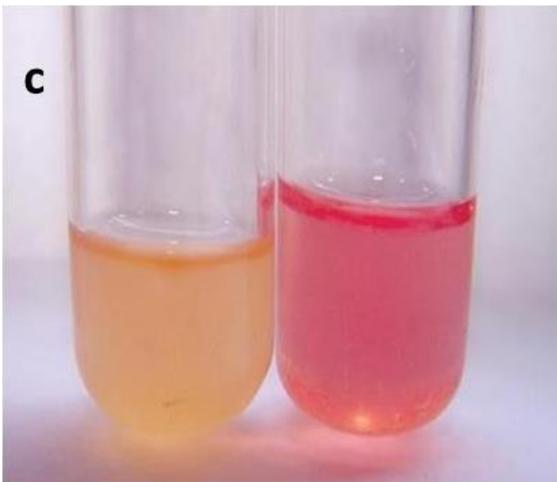
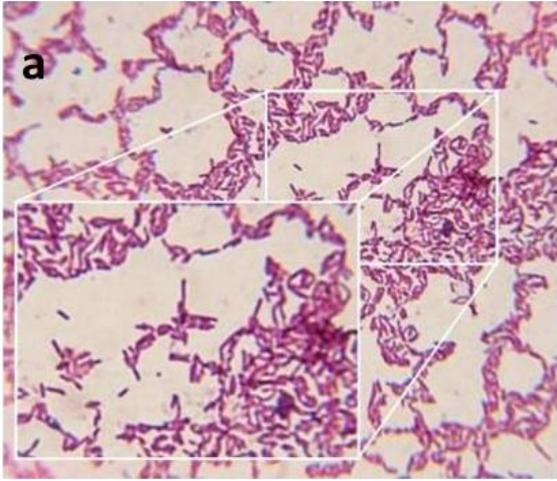


Figura 6. Colonias de *Listeria* spp. aisladas en medio OXFORD.

En la Figura 7 se observan las pruebas fenotípicas realizadas durante el ensayo. El 92 % de los 180 aislamientos repicados, mostraron características propias del género *Listeria*: bacilos Gram positivos, móviles, productores de enzima catalasa, positivos para las pruebas rojo de metilo y Voges Proskauer y negativos para las de ureasa y oxidasa. El 8 % de los aislamientos restantes no pudieron identificarse por los métodos bioquímicos empleados en esta Tesis. Considerando el carácter ubicuo del género, se sugirió la posibilidad de que estos aislamientos pertenezcan a nuevas especies y difirieran fenotípicamente del resto de los cultivos analizados. Por otra parte, la variabilidad fenotípica obtenida según los resultados de hemólisis, prueba de CAMP, reducción de nitratos, hidrólisis de almidón y utilización de hidratos de carbono asignó a cada aislamiento evaluado la especie correspondiente (Tabla 1). De esta forma, la actividad enzimática microbiana determinó una heterogénea población presente en la carne de pollo. De los 166 aislamientos que pudieron testearse, 13 cepas correspondieron a *Listeria monocytogenes*, 42 a *L. innocua*, 28 a *L. ivanovii*, 25 a *L. seeligeri*, 20 a *L. welshemeri*, 17 a *L. grayi* y 21 a *L. murrayi* (Figura 8).



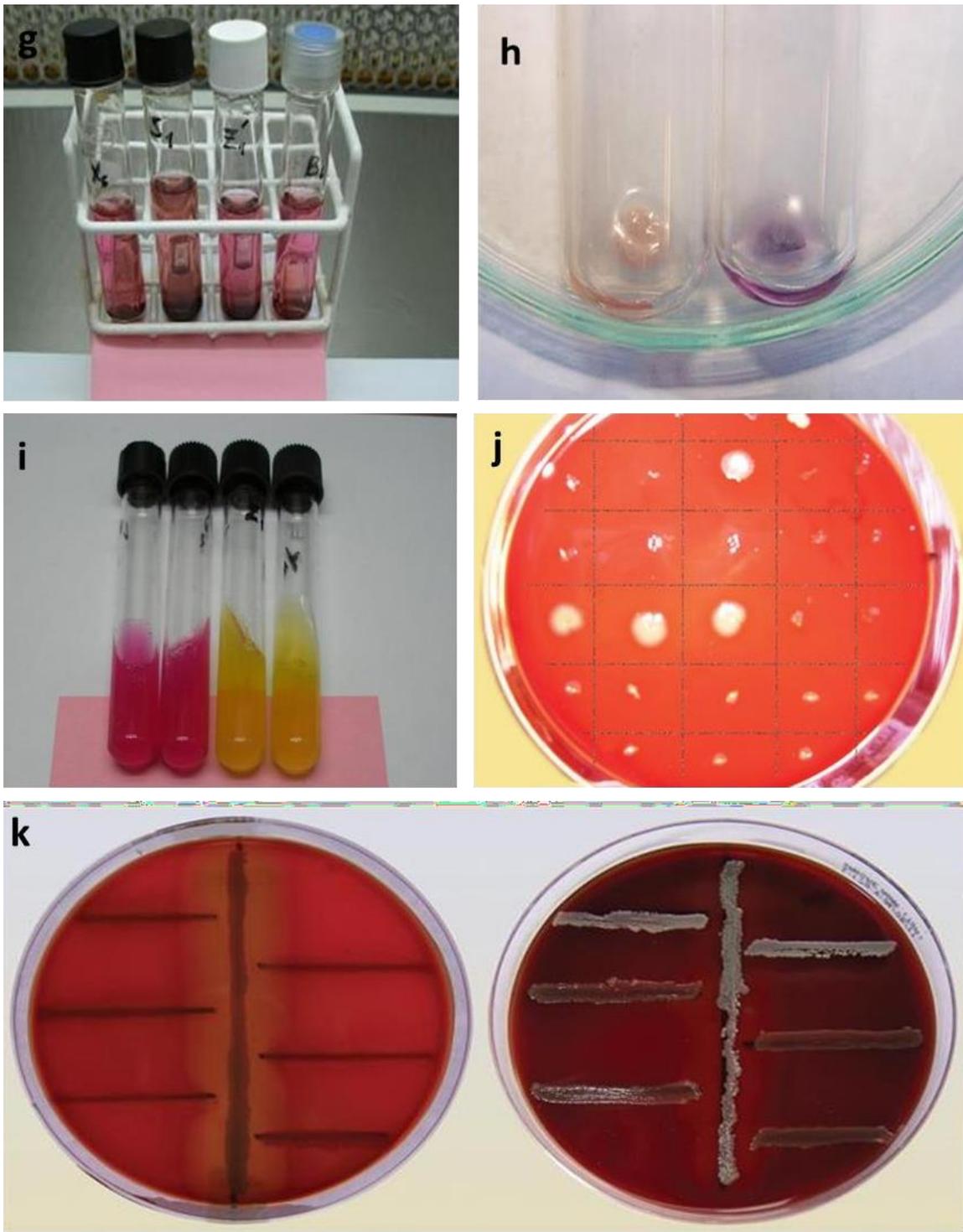


Figura 7. Pruebas fenotípicas realizadas para la clasificación por especie del género *Listeria*. a) Tinción de Gram b) Fermentación de azúcares c) Voges-Proskauer d) Rojo de metilo e) Hidrólisis de almidón f) Movilidad en Medio SIM g) Reducción de nitratos h) Oxidasa i) Hidrólisis de urea j) Hemólisis k) Prueba de CAMP.

Tabla 1. Pruebas fenotípicas realizadas para diferenciar especies del género *Listeria*.

Prueba/Especie	L. m	L. i	L. iv	L. s	L. w	L.g	L. mu
Hidrólisis de esculina	+	+	+	+	+	+	+
Bacilos Gram +	+	+	+	+	+	+	+
D-Xilosa	-	-	+	+	+	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	+	+
L-Ramnosa	+	v	-	-	v	-	v
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Rojo de metilo	+	+	+	+	+	+	+
Voges Proskauer	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de Almidón	-	-	-	-	-	+	+
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-
SH ₂	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de Nitratos	-	-	-	-	-	-	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-
Hemólisis	β	γ	β fuerte	β	γ	γ	γ
Prueba de CAMP con <i>S. aureus</i>	+	-	+	+	-	-	-

Referencias: L. m: *L. monocytogenes*, L. i: *L. innocua*, L. iv: *L. ivanovii*, L. s: *L. seeligeri*, L. w: *L. welshimeri*, L. g: *L. grayi*, L. mu: *L. murrayi*. Positivo (+); Negativo (-); Variable (v); No hemolítico (γ); Hemolítico (β).

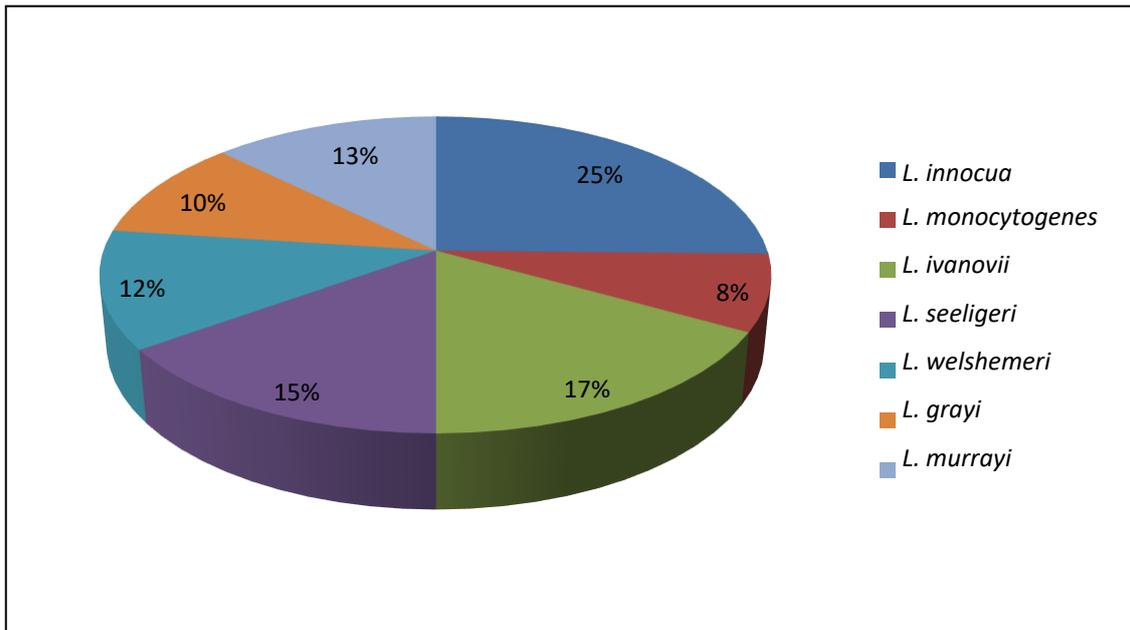


Figura 8. Distribución porcentual de los aislamientos clasificados por especie obtenidos de los trozados de pollo comerciales.

En Argentina, son escasas las investigaciones dedicadas a la detección de *L. monocytogenes* en carne de pollo cruda, ya que no se establecen restricciones reglamentarias de esta bacteria en este tipo de alimento. Los límites microbiológicos indicados para carne de ave cruda y procesada se basan específicamente en el Recuento de Aerobios Mesófilos, Enterobacterias y Coliformes. El CAA establece en el criterio obligatorio la ausencia de *Salmonella* spp., mientras que en el criterio complementario se monitorea el recuento de *Staphylococcus aureus*. Como fue mencionado, los criterios de ausencia de *L. monocytogenes* son considerados solo en alimentos lácteos, salazones, chacinados y carne de ave y crustáceos cocidos (CAA, 2018).

Los resultados de las pruebas fenotípicas realizadas en este Trabajo, evidencian que la presencia de *Listeria* spp. en 25 gramos de carne cruda de pollo constituye un riesgo para la salud pública. Los aislamientos de *L. monocytogenes* provenientes de las muestras analizadas, sugieren que la carne de pollo puede ser un potencial vehículo de cepas patógenas y de esta forma convertir a la listeriosis como una ETA emergente. En este

aspecto, se han vinculado brotes de listeriosis humana compatibles con la transmisión alimentaria a través del consumo de carne pollo (McLauchlin *et al.*, 2020). Sin embargo, la ausencia de datos epidemiológicos y la notificación no obligatoria de los casos esporádicos, dificulta los estudios que correlacionan la presencia de *L. monocytogenes* en este alimento cárnico con una ETA. En concordancia al relevamiento realizado en los comercios locales, varios estudios asocian a la carne de pollo con la presencia de cepas potencialmente peligrosas. El grupo de Zeinali *et al.*, (2017) determinó que el 40 % de las muestras de carcasas de pollos presentaba contaminación por *Listeria* spp. y el 18 % correspondía a aislamientos de *L. monocytogenes*, siendo la mayoría de estos resistentes a los antibióticos comúnmente usados para el tratamiento de listeriosis humana. Esto alertaría la posibilidad que la carne de pollo refrigerada genere condiciones predisponentes favorables para el desarrollo de *L. monocytogenes*, produciendo inconvenientes en la salud pública. Si bien en el presente Trabajo de Tesis, *L. monocytogenes* fue aislada con una frecuencia del 8 %, el alto porcentaje de aislamiento de otras especies del mismo género como la obtenida en *L. ivanovii* y particularmente en *L. innocua* puede resultar igualmente problemático. Estas especies no son consideradas como patógenas para el humano, sin embargo, las investigaciones realizadas por Ripjens *et al.*, (1997) señalan que la presencia principalmente de *L. innocua*, pueden indicar condiciones sanitarias deficientes que más tarde propician el crecimiento de *L. monocytogenes*. Respecto a la composición de la microbiota acompañante de *L. monocytogenes* en la carne de pollo, los resultados presentados aquí concuerdan con los obtenidos por otros autores, aunque con diferencias en la proporción porcentual de las especies aisladas (Pelisser *et al.*, 2001; Zeinali *et al.*, 2017; Moura *et al.*, 2019). En este aspecto, la multiplicidad de *Listeria* spp. identificadas, señala un significativo déficit de las condiciones de inocuidad durante el manejo de la carne de pollo, sugiriéndose como

indicador de ineficientes medidas de saneamiento adoptadas durante la comercialización y/o posiblemente durante la etapa de faena. La riqueza microbiana hallada, puede ser explicada por Sauders & Wiedmann (2007), quienes señalan que las especies del género *Listeria* presentan homología genética, por lo que sus nichos ecológicos suelen solaparse. Por otra parte, en el relevamiento realizado, la frecuencia de *L. monocytogenes* fue menor en comparación a la hallada por otros investigadores que basaron su muestreo en carne de cerdo o pescado (Salihu *et al.*, 2008; Figueroa López *et al.*, 2019).

En el presente Trabajo, todos los cortes evaluados resultaron positivos para la detección *Listeria* spp. Esto contrasta con los estudios realizados por Franco *et al.*, (1995), quienes informan que la carne y piel de las patas son las partes que más se contaminan durante la manipulación, en comparación con las pechugas. Teóricamente, debería esperarse que los cortes con mayor índice de contaminación sean aquellos que tengan más sitios de trozado. Sin embargo, los resultados presentados aquí, denotan que no hubo diferencias entre las muestras obtenidas, ya que fue posible aislar al menos una especie del género *Listeria* de cada presa analizada. Esto también discrepa con los estudios realizados por Goh *et al.*, (2012) quienes además de reportar una frecuencia mucho menor de contaminación en las muestras recolectadas, encontraron diferencias en la frecuencia de aislamiento dependiendo del corte analizado. Estos autores hallaron una mayor contaminación de *L. monocytogenes* en pechuga respecto al porcentaje de incidencia en pata y muslo.

Particularmente, la frecuencia de aislamiento obtenida en *L. monocytogenes* coincidió con la hallada por Ahmed *et al.*, (2016) para la carne aviar. Estos autores detectaron una incidencia intermedia comparada con la carne vacuna procesada y los productos lácteos. Otros estudios reportan que *L. monocytogenes* puede presentarse en niveles relativamente bajos en la carne de pollo, aunque esto dependerá de las condiciones en que se encuentra

la carne al momento de tomar las muestras (Cruz Pulido *et al.*, 2012). Según Pelliser *et al.*, (2001) se asume que el rango de aislamiento de *L. monocytogenes* en carne de pollo, varía entre el 2 y el 94 % dependiendo del país de origen y el método de aislamiento. Así, mientras los relevamientos hechos por Karoley *et al.*, (2005) reportan un 14,89 % de incidencia de *Listeria* spp. con el 8,5 % correspondiente a *L. monocytogenes*, los estudios de Nierop *et al.*, (2005) informan un 19,2 % de aislamientos pertenecientes al género *Listeria*. En tanto, la frecuencia de *L. monocytogenes* obtenida en la carne de pollo por Centurion & Takajara (2004) fue del 2 %. Independientemente de los niveles expresados y de acuerdo a los resultados obtenidos, se sugiere que la carne de pollo puede funcionar como reservorio de *L. monocytogenes* y ser fuente de contaminación para otros alimentos presentes en el hogar, con el riesgo latente de padecer una ETA. Este potencial patogénico es revelado en la tolerancia cero admitida en alimentos listos para el consumo. Por lo tanto, los porcentajes de detección no se deberían subestimar, ya que en condiciones adecuadas este microorganismo puede multiplicarse y ser peligroso para las personas de riesgo.

En los estudios presentados aquí, *L. welshimeri* fue aislada en un 12 % de las muestras. Esta especie tiene la particularidad de emplear la xilosa como sustrato fermentable y transformarla en productos ácidos al igual que *L. seeligeri* y *L. ivanovii*, pero a diferencia de estas no produce hemólisis en agar sangre (Ryser *et al.*, 2015). Este diagnóstico diferencial realizado a través de las pruebas bioquímicas, permitió distinguir *L. welshimeri* de las especies que presentaron un patrón similar a *L. monocytogenes* como bacterias productoras de hemolisina. Según Moura *et al.*, (2019), *L. welshimeri* es la especie mejor adaptada a los ambientes con bajas temperaturas dentro de las plantas de procesamiento, ya que puede estar presente en una incidencia elevada en carcasas luego de los tratamientos en frío. Considerando este criterio y de acuerdo a los

resultados presentados en esta Tesis, se sugiere a *L. innocua* como la mejor adaptada a las temperaturas de refrigeración. De cualquier manera, es probable que la presencia de otras *Listeria* spp. en la carne de pollo refrigerada, indique condiciones favorables a la adaptación y crecimiento de *L. monocytogenes*, lo que posteriormente dificultaría el control microbiológico en el alimento. Por otra parte, el aislamiento de bacterias viables reveló la capacidad de estos microorganismos de resistir las condiciones de almacenaje en los comercios expendedores. En concordancia, tanto *L. monocytogenes* como las especies afines, presentan la habilidad de competir y desarrollarse en temperaturas de refrigeración y en rangos de congelamiento (Chasseignaux *et al.*, 2001; Pérez Rubiano *et al.*, 2008). Los estudios realizados en carne de pollo, sugieren que *L. monocytogenes* puede crecer en un intervalo de -0,1 a -0,4 °C (Walker *et al.*, 2008). Esta capacidad adaptativa es llevada a cabo a través de la expresión de proteínas de *shock* térmico (Liu *et al.*, 2002) y/o por modificación de los fosfolípidos de membrana que le otorgan mayor fluidez a la misma (Zhu *et al.*, 2005; Badaoui Najjar *et al.*, 2007).

La presencia de *L. monocytogenes* en la carne de pollo analizada propone investigar el posible origen de la contaminación. Por ser un sistema productivo de carácter altamente intensivo, la producción avícola está expuesta a numerosas fuentes de inóculo durante las distintas etapas de la cadena industrial. En primer lugar, debido a que las *Listeria* spp. son habitantes naturales de la microbiota intestinal del pollo, estas pueden contaminar la carne durante el proceso de eviscerado a través de la materia fecal, que actúa como fuente de contaminación (ICMSF, 1998; Rothrock *et al.*, 2017). En este contexto, adquiere importancia el manejo realizado de los animales antes del sacrificio; ejerciendo un control sanitario del alimento balanceado durante la crianza y garantizando un tiempo de ayuno recomendable para la evacuación intestinal antes del traslado a las plantas de faena (Ricaurte, 2005).

Si bien el proceso de eviscerado constituye un punto crítico para la contaminación microbiana de las canales de pollo, este evento puede darse luego de este proceso y trasladarse a los lugares despique y venta. Moura *et al.*, (2019) encontraron que la contaminación con especies del género *Listeria* no se manifiesta luego del eviscerado, pero que *L. monocytogenes* puede presentarse en las etapas posteriores de empaque y refrigeración, especialmente en cortes de muslo. De importancia para los resultados presentados aquí, estos autores determinaron una alta ocurrencia de esta especie en los elementos utilizados para trozar el pollo como también de las superficies de trabajo, sugiriendo que la contaminación cruzada puede ser relevante para explicar la presencia de *L. monocytogenes* en las muestras analizadas. Esto se relaciona también, a las investigaciones realizadas por Kerr *et al.*, (1993) quienes determinaron que en las plantas de procesado y venta al por menor de carne aviar, la manipulación de los trabajadores era una importante vía de contaminación cruzada de *Listeria* spp. Por su parte, Pérez Rubiano *et al.*, (2008) concluyeron que la presencia de especies del género *Listeria* en carcasas de pollo congelado, está asociada a la contaminación de utensilios durante el despise. En este sentido, se evidencia que las operaciones realizadas en los comercios expendedores, también tienen una destacada responsabilidad al respecto. Además, es importante resaltar que los deficientes sistemas de limpieza y desinfección en las plantas de beneficio y durante el almacenamiento, transporte y distribución, contribuyen de manera rotunda a la presencia o ausencia de *L. monocytogenes* en los expendios de pollo (Lunden *et al.*, 2002; Carrascal *et al.*, 2007). Asimismo, diversas superficies y equipos de trabajo promueven su establecimiento en las plantas de procesado (ICMSF, 1998; Molero *et al.*, 2010). Por otra parte, el tipo de sistema productivo empleado en las granjas avícolas, puede influenciar su prevalencia en mayor o menor grado. En este aspecto, las aves pueden funcionar como potenciales vectores de *L. monocytogenes*, contaminando primero los

ambientes de trabajo y posteriormente la carne (Rothrock *et al.*, 2017). Feldman *et al.*, (2000) menciona la relación del ingreso de una nueva partida de aves a la planta (fuente de microorganismos) y la contaminación de jaulas durante el traslado al matadero, lo que destaca la importancia del manejo durante la producción. Asimismo, las mascotas, al actuar como reservorios naturales de la bacteria, podrían contaminar diversos sectores de la granja (Rothrock *et al.*, 2017). Por otro lado, la presencia de especies de *Listeria* en la piel, patas y plumas de las aves, puede favorecer a la contaminación de las canales durante el proceso de desangrado y desplume (Ricaurte, 2005; Pérez Rubiano *et al.*, 2008). Se ha indicado que la contaminación superficial de las carcasas durante la faena se genera a través de la exposición a plumas sucias con polvo o con materia fecal adherida (Tinney *et al.*, 1997). El ICMSF (1998) afirma que es fundamental la higiene en las zonas de descarga de los animales y que el control de la contaminación debe iniciarse en la propia granja, puesto que durante las etapas de procesado las bacterias patógenas no se eliminan. Esto pone de manifiesto que la aplicación de buenas prácticas de manufactura en la cadena productiva debería constituir un factor fundamental para reducir la transferencia horizontal de contaminación. También la eficiencia de las medidas de APPCC dentro las granjas avícolas sería una herramienta beneficiosa para mitigar los riesgos que atentan contra la seguridad alimentaria. Por tanto, debido a que las fuentes de contaminación pueden ser diversas, los resultados presentados en esta Tesis, sugieren realizar un estudio comparativo para determinar si los aislamientos obtenidos de otros ambientes, son similares a los que se presentan en la carne de pollo a la venta. Por otra parte, la carne de pollo contaminada en los cortes provenientes del trozado, puede ser de riesgo en la elaboración de sus derivados. En este aspecto, se han detectado varios productos procesados de origen aviar incluyendo mortadelas, arrollados, embutidos y hamburguesas

contaminados con *Listeria* spp. y particularmente con una alta incidencia de *L. ivanovii* (Alsheikh *et al.*, 2013).

Respecto a la prevalencia de *L. monocytogenes* en distintos períodos del año, se sugiere que esta fue independiente de la época en que se realizaron los muestreos. Esto concuerda con Ayaz *et al.*, (2009) quienes no encontraron variación estacional en la detección de *L. monocytogenes* en las carcasas de pollo analizadas.

Aunque el aislamiento e identificación de *L. monocytogenes* o sus especies relacionadas no se efectúa de manera rutinaria en las canales de pollo o en sus respectivos cortes, el relevamiento microbiológico realizado en este Trabajo, resulta primordial para determinar las condiciones de higiene en que los productos cárnicos de origen aviar llegan al consumidor. Por otra parte, desde un enfoque epidemiológico y considerando el rol que *L. monocytogenes* representa en la salud pública, los resultados presentados señalan un potencial peligro para las personas que pertenecen a los grupos de riesgo.

Si bien no se registran antecedentes de toxiinfecciones ocurridas por *L. monocytogenes*, las investigaciones realizadas en la ciudad de Bahía Blanca son escasas en cuanto a la detección de *Listeria* spp. en alimentos. Además, ninguna ha sido relacionada específicamente con la carne de pollo. Los análisis microbiológicos llevados a cabo por Marzocca *et al.*, (2004) confirmaron la presencia de *L. monocytogenes* tanto en fiambres envasados al vacío como en muestras ambientales provenientes de sitios de procesamiento y venta. Por su parte, los estudios hechos por Cardillo *et al.*, (2009) resultaron negativos para la presencia de esta bacteria al muestrearse superficies de trabajo de una planta frigorífica local. Sin embargo, en el año 2020 se ordenó el retiro de mercadería proveniente de una cadena de supermercados, al constatar la presencia de *L. monocytogenes* en un lote de helados (ANMAT, 2020).

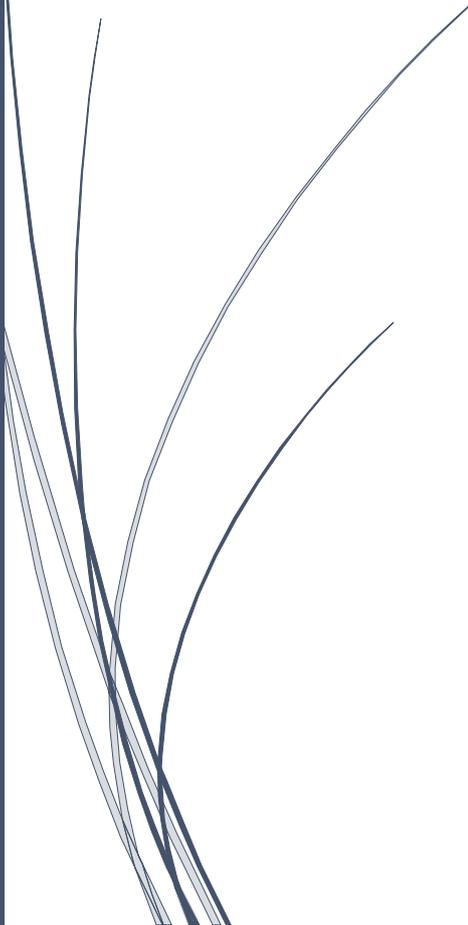
En concordancia a los estudios realizados por Ramírez Mérida *et al.*, (2009) quienes afirman que la presencia de *L. monocytogenes* no se vincula al local de expendio, en este Trabajo de Tesis se demostró que la detección de *Listeria* spp. es independiente del tamaño del comercio. Esto también se asocia a la distribución ubicua de todas las especies del género, en diferentes sectores de la cadena productiva; los estudios de Osaili *et al.*, (2011) constataron la presencia de *Listeria* spp. tanto en pollo crudo como en productos cocidos indistintamente del local de expendio. Sin embargo, las investigaciones realizadas por Goh *et al.*, (2012), exhiben resultados diferentes dependiendo del origen de las muestras; con una mayor ocurrencia de contaminación en supermercados comparados con locales menores.

La evaluación realizada en esta Tesis revela que tanto *L. monocytogenes* como las especies acompañantes identificadas, pueden ser indicadoras de la calidad microbiológica de la carne de pollo. Esto podría funcionar también como una medida indirecta del nivel de higiene presente en las distintas etapas de procesamiento y mantenimiento de la cadena de frío. Por otra parte, debido a que la presencia de *Listeria* spp. no garantiza la seguridad microbiológica de un alimento (Pérez Castellanos, 2004), los resultados obtenidos evidenciarían fallas en las medidas de control tendientes a eliminar potenciales patógenos. Si bien los alimentos relacionados con la presencia de *L. monocytogenes* se vinculan en su mayoría a productos listos para el consumo (McLauchlin 2004; Figuera *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2011), los resultados indican que la carne de pollo cruda constituye un sustrato propicio para su crecimiento y/o supervivencia. Esto posiblemente se deba a las características fisicoquímicas de la carne aviar, las cuales influyen favorablemente en el establecimiento de las especies aisladas (Pradhan *et al.*, 2012; Vasconcelos Fernandes, 2016).

Finalmente, la diferenciación entre especies de *Listeria* mediante la metodología de identificación fenotípica, sería de relevancia en varias investigaciones para confirmar los análisis moleculares. Según los resultados del presente estudio, todas las cepas aisladas de *L. monocytogenes* presentaron hemólisis en agar sangre, lo que refleja en parte el potencial de virulencia de los aislamientos. Esto contrasta con las investigaciones hechas por Moura *et al.*, (2019) quienes reportan aislamientos que presentan falsos negativos en el test de hemólisis. Por su parte, el grupo de Kureljušić *et al.*, (2017) destaca que los ensayos de hemólisis deben complementarse con otras pruebas bioquímicas para ser tan eficientes como las técnicas de detección molecular. De acuerdo a esto, los estudios presentados aquí, revelaron tanto la presencia como la actividad enzimática de *Listeria* spp., siendo estas características necesarias para corroborar la viabilidad de los aislamientos y evaluar un potencial problema sanitario.

CAPÍTULO II

COMPORTAMIENTO DE LAS CEPAS AISLADAS DE *L. MONOCYTOGENES* EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO



CAPÍTULO II: COMPORTAMIENTO DE LAS CEPAS AISLADAS DE *L. MONOCYTOGENES* EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO

1. Capacidad adaptativa de *L. monocytogenes* en los alimentos en general

L. monocytogenes posee la capacidad de sobrevivir condiciones ambientales que podrían resultar adversas a otros agentes productores de ETA. A pesar de crecer sobre diferentes sustratos alimenticios, la cocción es el medio eficaz para desactivar la bacteria. En carne cruda se ha determinado que una temperatura de 70° C durante 2 minutos es suficiente para eliminarla (Carlier *et al.*, 1996).

Los tratamientos de conservación basados en atmósferas controladas que emplean dióxido de carbono (CO₂) y nitrógeno (N₂), pueden ser resistidos por *L. monocytogenes* por su habilidad para desarrollarse en entornos faltos de oxígeno (Sewell *et al.*, 2015). Del mismo modo, se ha encontrado que esta bacteria puede crecer en productos cárnicos refrigerados almacenados al vacío y aumentar su población exponencialmente (Schmidt & Kaya, 1990).

Un factor de importancia en la sobrevivencia de *L. monocytogenes*, es el contenido graso del alimento. Se ha demostrado que la bacteria presenta resistencia térmica bajo estas condiciones, soportando las altas temperaturas (Doyle *et al.*, 2001). Por otro lado, las temperaturas subletales pueden determinar la activación de proteínas de *shock* térmico en *L. monocytogenes*. Este mecanismo intrínseco contribuye a reducir la sensibilidad a los tratamientos de pasteurización (Pitt *et al.*, 1999).

Una característica relevante es que *L. monocytogenes* puede tolerar eficientemente condiciones de alta osmolaridad. La propiedad de soportar la desecación, posibilita que este microorganismo esté presente en aquellos alimentos con elevado potencial osmótico de larga vida útil como los chacinados, embutidos, quesos u otros productos

procesados (Gardan *et al.*, 2003; Signorini *et al.*, 2017). Las investigaciones han evidenciado que *L. monocytogenes* puede sobrevivir en ambientes de hasta un 20 % p/v de cloruro de sodio (NaCl) (Marzocca *et al.*, 2004; Muhterem Uyar *et al.*, 2018) y en las concentraciones de nitrito permitidas en los alimentos (Rocourt & Cossart., 1997). De hecho, se ha constatado que los aislamientos provenientes de alimentos presentan una mayor adaptación al estrés osmótico comparado con otras fuentes (Ribeiro & Destro, 2014). En este aspecto, los aislamientos de origen alimentario podrían soportar hasta 10 % p/v de NaCl, aunque el crecimiento depende de la concentración (Swaminathan *et al.*, 2007).

Específicamente, el NaCl es una sal comúnmente utilizada en la industria alimentaria para conservar los alimentos y controlar el crecimiento bacteriano. Sin embargo, actualmente las tendencias vinculadas a razones de salud están promoviendo reducir las concentraciones de NaCl en los alimentos, lo que podría promover la sobrevivencia y el crecimiento de *L. monocytogenes* (Ribeiro & Destro, 2014). En este sentido, las industrias deberían llevar a cabo nuevas estrategias para garantizar la seguridad alimentaria de la población.

La dependencia entre el contenido de NaCl y la conservación se establece por la disponibilidad de agua presente en el alimento. Este factor está determinado por la concentración de solutos en la fase acuosa del producto y a excepción de los microorganismos xerófilos, osmófilos o halófilos, influye de forma determinante en las funciones metabólicas de la mayoría de los microorganismos, afectando su proliferación.

Así, la adición de solutos como el NaCl reduce la actividad agua del alimento lo cual puede limitar el desarrollo de microorganismos indeseables o patógenos como *L. monocytogenes*. La variable a_w difiere según la matriz alimentaria; siendo las carnes,

hortalizas, pescados, las frutas y verduras frescas, los alimentos con mayores valores de a_w (entre 0,98 o superior) y en consecuencia los que presentan mayores riesgos de contaminación (de la Fuente Salcido & Barboza Corona 2010).

2. HIPÓTESIS

Algunas tecnologías habitualmente empleadas en el procesado y conservación de los alimentos, así como ciertas condiciones generadas a lo largo de la cadena productiva, pueden influir en el estado fisiológico de *L. monocytogenes*. Esto conduciría a la selección de subpoblaciones bacterianas resistentes al estrés y posiblemente con mayor capacidad de virulencia que las cepas procedentes de ambientes naturales. Lo mencionado, puede producirse especialmente en el sector industrial a causa de diversos factores: refrigeración, ciclos de congelamiento, tratamiento con sal y ácidos orgánicos, deshidratación, exposición a desinfectantes y sustancias antimicrobianas, entre otros (Kathariou 2002; Navas *et al.*, 2005; Jantzen *et al.*, 2006). Esto condujo a suponer que los aislamientos obtenidos de *L. monocytogenes* podrían presentar características fenotípicas particulares en cuanto a la tolerancia al estrés osmótico. Por este motivo se formuló la siguiente hipótesis:

- Debido a la presión selectiva que pueden ejercer los manejos intensivos generados en el sector industrial avícola y habiendo constatado la presencia de *L. monocytogenes* en la carne de pollo refrigerada, las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de los cortes de pollo pueden tolerar distintas condiciones de osmolaridad y diferir en cuanto a su nivel de susceptibilidad al NaCl.

3. OBJETIVOS

De acuerdo a los criterios mencionados y debido a la carencia de estudios de caracterización fenotípica sobre cepas de *L monocytogenes* aisladas de carne de pollo se propusieron los siguientes objetivos:

3.1 Objetivos generales:

- Evaluar el comportamiento de las cepas aisladas en distintas concentraciones de NaCl.
- Determinar si los aislamientos difieren en el nivel de susceptibilidad al NaCl.

3.2 Objetivos particulares:

- Comparar los recuentos obtenidos de cada aislamiento en dos concentraciones salinas: 1,5 % y 3 % p/v de NaCl.
- Determinar si existen aislamientos mejor adaptados que otros a las concentraciones de NaCl evaluadas.

4. METODOLOGÍA

Luego de efectuados los estudios taxonómicos, los 13 aislamientos de *L. monocytogenes* obtenidos se cultivaron en diferentes condiciones de salinidad con el fin de analizar posibles diferencias en la capacidad de crecimiento *in vitro* e inducir una posible variabilidad fenotípica intraespecífica. Para esto, las cepas inicialmente aisladas en ATS se repicaron en cultivo fresco y se incubaron durante 24 horas. La evaluación de la aptitud en NaCl, se realizó a dos concentraciones salinas empleando el medio Caldo Triptona Soja (CTS) (Anexo 1.14) ajustado a pH final de 7,3. Se prepararon dos matraces con el caldo de cultivo mencionado y se agregó a cada uno NaCl hasta conseguir una concentración final de 1,5 % y 3 % p/v respectivamente. En la preparación de los medios, se tomó en cuenta la cantidad de NaCl del CTS para así obtener las concentraciones requeridas de sal. Los medios fueron fraccionados en tubos y esterilizados en autoclave a 1 atm durante 15 minutos (121 °C).

Para la siembra, se inocularon 3 tubos por aislamiento para cada condición. Con el fin de estandarizar el inóculo inicial, los caldos se homogenizaron mediante agitación hasta obtener una turbidez igual a 0,5 en la escala McFarland *Standard* (McFarland, 1907) (Biomérieux) (Anexo 3). Posteriormente, los tubos se llevaron a incubar en estufa a 37 °C durante 48 horas. En cada condición, se determinó el recuento en placa empleando el método de las diluciones seriadas con *Buffer* Fosfato Salino (BFS) (NaCl 0,806 % p/v) (Anexo 1.15). La siembra en placa se realizó en ATS a razón de 0,1 mL por caja. Los resultados se expresaron en log UFC/mL, considerando un promedio de tres réplicas.

4.1 Análisis estadístico

La evaluación de los datos se realizó mediante el Análisis de la Varianza (ANOVA) Doble Mixto (nivel de confianza del 95 %) utilizando el programa estadístico estándar *InfoStat System* (Córdoba, Argentina) (Di Rienzo *et al.*, 2013). Dentro de cada condición, se evaluó la variabilidad entre los aislamientos tomando la variable “cepa” como factor aleatorio. Para analizar el comportamiento de cada aislamiento en las concentraciones de estudio, se consideró la variable “cepa” como valor fijo. Las medias de cada tratamiento fueron separadas mediante la prueba de comparación múltiple de Fisher (test de diferencias mínimas significativas (DMS)).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Variabilidad fenotípica de las cepas aisladas de *L. monocytogenes* creciendo en dos concentraciones de NaCl

Los 13 aislamientos evaluados de *L. monocytogenes* fueron identificados con letras y números y se denominaron: B7, C5, G1, G7, GG5, HH5, L5, N7, R7, U1, V7, W1 y Z1 (Anexo 2).

Los resultados obtenidos para la condición de 1,5 % p/v de NaCl a las 48 horas se describen en la Tabla 2.1. Para dicho período y tratamiento se puede observar que las cepas V7 (6,67 log UFC/mL \pm 0,577), GG5 (7,33 log UFC/mL \pm 0,577) y R7 (7,67 log UFC/mL \pm 1,155) presentaron el menor recuento y se diferenciaron significativamente de los demás aislamientos. Por su parte, las cepas G7 (12 log UFC/mL \pm 1) y HH5 (13 log UFC/mL \pm 1) mostraron el mayor recuento con respecto al resto, aunque la primera no difirió de B7 (11,33 log UFC/mL).

En tanto, el 53,84 % de los aislamientos en estudio, correspondiente a las cepas C5, G1, L5, N7, U1, W1 y Z1 exhibieron un comportamiento similar y respondieron uniformemente al nivel de salinidad de 1,5 % p/v. Estas cepas presentaron recuentos intermedios respecto a las mencionadas anteriormente con valores que oscilaron entre 8,33 y 9,33 log UFC/mL. Puede observarse a esta concentración de NaCl, que el recuento en placa obtenido difirió según la cepa estudiada, encontrándose variabilidad entre los aislamientos.

Tabla 2.1 Recuento en placa de los aislamientos de *L. monocytogenes* en la condición 1,5 % p/v de NaCl durante 48 horas.

NaCl 1,5 % p/v	
Cepas	Recuento (log UFC/mL)
B7	11,33 ± 1,527 d
C5	8,67 ± 0,577 bc
G1	8,67 ± 0,577 bc
GG5	7,33 ± 0,577 ab
G7	12 ± 1 de
HH5	13 ± 1 e
L5	8,67 ± 0,577 bc
N7	8,67 ± 0,577 bc
R7	7,67 ± 1,155 ab
U1	8,33 ± 0,577 bc
V7	6,67 ± 0,577 a
W1	8,67 ± 0,577 bc
Z1	9,33 ± 1,155 c

Referencias: Los datos se expresan como promedio ± SD de tres repeticiones en tres determinaciones independientes. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$).

En la Tabla 2.2 se observan los resultados obtenidos para la condición de 3 % p/v de NaCl a las 48 horas de evaluación. A dicha concentración, los aislamientos GG5 (5,67 log UFC/mL ± 0,577), W1 (6 log UFC/mL ± 1), C5 (6,33 log UFC/mL ± 0,577), V7 (6,33 log UFC/mL ± 0,577) y N7 (6,67 log UFC/mL ± 0,577) presentaron el menor crecimiento respecto a las demás cepas estudiadas. Los mayores recuentos se observaron

nuevamente en los aislamientos G7 y HH5 (ambas con $11,67 \log \text{ UFC/mL} \pm 0,577$). Por su parte, las cepas B7 ($7,33 \log \text{ UFC/mL} \pm 0,577$), L5 ($7,67 \log \text{ UFC/mL} \pm 0,577$) y R7 ($7,67 \log \text{ UFC/mL} \pm 0,577$) no presentaron diferencias significativas entre ellas al igual que Z1 ($10 \log \text{ UFC/mL} \pm 1$) y G1 ($9,33 \log \text{ UFC/mL} \pm 0,577$), aunque estas dos últimas difirieron claramente del resto.

Tabla 2.2 Recuento en placa de los aislamientos de *L. monocytogenes* en la condición 3 % p/v de NaCl durante 48 horas.

NaCl 3 % p/v	
Cepas	Recuento (log UFC/mL)
B7	$7,33 \pm 0,577$ bcd
C5	$6,33 \pm 0,577$ ab
G1	$9,33 \pm 0,577$ e
GG5	$5,67 \pm 0,577$ a
G7	$11,67 \pm 0,577$ f
HH5	$11,67 \pm 0,577$ f
L5	$7,67 \pm 0,577$ cd
N7	$6,67 \pm 0,577$ abc
R7	$7,67 \pm 0,577$ cd
U1	8 ± 1 d
V7	$6,33 \pm 0,577$ ab
W1	6 ± 1 a
Z1	10 ± 1 e

Referencias: Los datos se expresan como promedio \pm SD de tres repeticiones en tres determinaciones independientes. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$).

Los estudios realizados permitieron establecer que hubo diferencias significativas en el comportamiento de las cepas en las dos concentraciones de NaCl estudiadas. Esto pudo determinar la variabilidad fenotípica que presentaban los aislamientos al estar sometidos a condiciones de salinidad elevada. De los análisis, se deduce que en ambas concentraciones (1,5 y 3 % p/v respectivamente) los aislamientos que presentaron una mejor performance fueron las cepas G7 y HH5, ya que luego de los ensayos se obtuvieron los máximos recuentos. En tanto, las cepas GG5 y V7 fueron las más susceptibles en los niveles de NaCl estudiados, obteniéndose recuentos inferiores respecto a los demás aislamientos.

Por otra parte, los aislamientos se comportaron de manera específica según la condición osmótica en la cual crecían (Figura 9). En la Tabla 3 puede observarse el recuento obtenido para cada aislamiento en las condiciones de NaCl evaluadas. Los resultados mostraron que 8 de las 13 cepas evaluadas (61 %) mantuvieron su habilidad de crecimiento al 3 % p/v de NaCl con recuentos similares a los obtenidos con 1,5 % p/v de NaCl. Sin embargo, el resto de los aislamientos (39 %) presentaron recuentos inferiores cuando crecían en una concentración de NaCl más elevada, sugiriendo que estas cepas podrían estar menos adaptadas y ser más sensibles que las primeras y *a priori* resultar menos problemáticas para su control. Particularmente, las cepas G1, G7, HH5, L5, R7, U1, V7 y Z1 no sufrieron cambios significativos en su recuento poblacional cuando crecieron en una condición de mayor osmolaridad. Posiblemente, estas cepas sean más resistentes a niveles osmóticos elevados al presentar mecanismos que les permitan adaptarse al estrés salino. De interés, la cepa V7 si bien presentó bajos recuentos respecto al resto, su crecimiento no se vio afectado a altas concentraciones de NaCl. Por su parte, las cepas B7, C5, GG5, N7 y W1 evidenciaron diferencias significativas en los recuentos obtenidos cuando las concentraciones de

NaCl superaban el 1,5 % p/v. En este caso, al aumentar el doble la concentración salina en el medio de cultivo, se observó una notable reducción de crecimiento, sugiriendo que estas cepas son más sensibles a las condiciones osmóticas elevadas de NaCl.

Tabla 3. Recuento en placa de los aislamientos de *L. monocytogenes* creciendo en dos concentraciones de NaCl durante 48 horas.

Cepas	NaCl 1,5 % p/v	NaCl 3 % p/v
	Recuento (log UFC/mL)	Recuento (log UFC/mL)
B7	11,33 b	7,33 a
C5	8,67 b	6,33 a
G1	8,67 a	9,33 a
GG5	7,33 b	5,67 a
G7	12 a	11,67 a
HH5	13 a	11,67 a
L5	8,67 a	7,67 a
N7	8,67 b	6,67 a
R7	7,67 a	7,67 a
U1	8,33 a	8 a
V7	6,67 a	6,33 a
W1	8,67 b	6 a
Z1	9,33 a	10 a

Referencias: Los datos se expresan como promedio \pm SD de tres repeticiones en tres determinaciones independientes. Valores seguidos por la misma letra dentro de cada fila no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$).

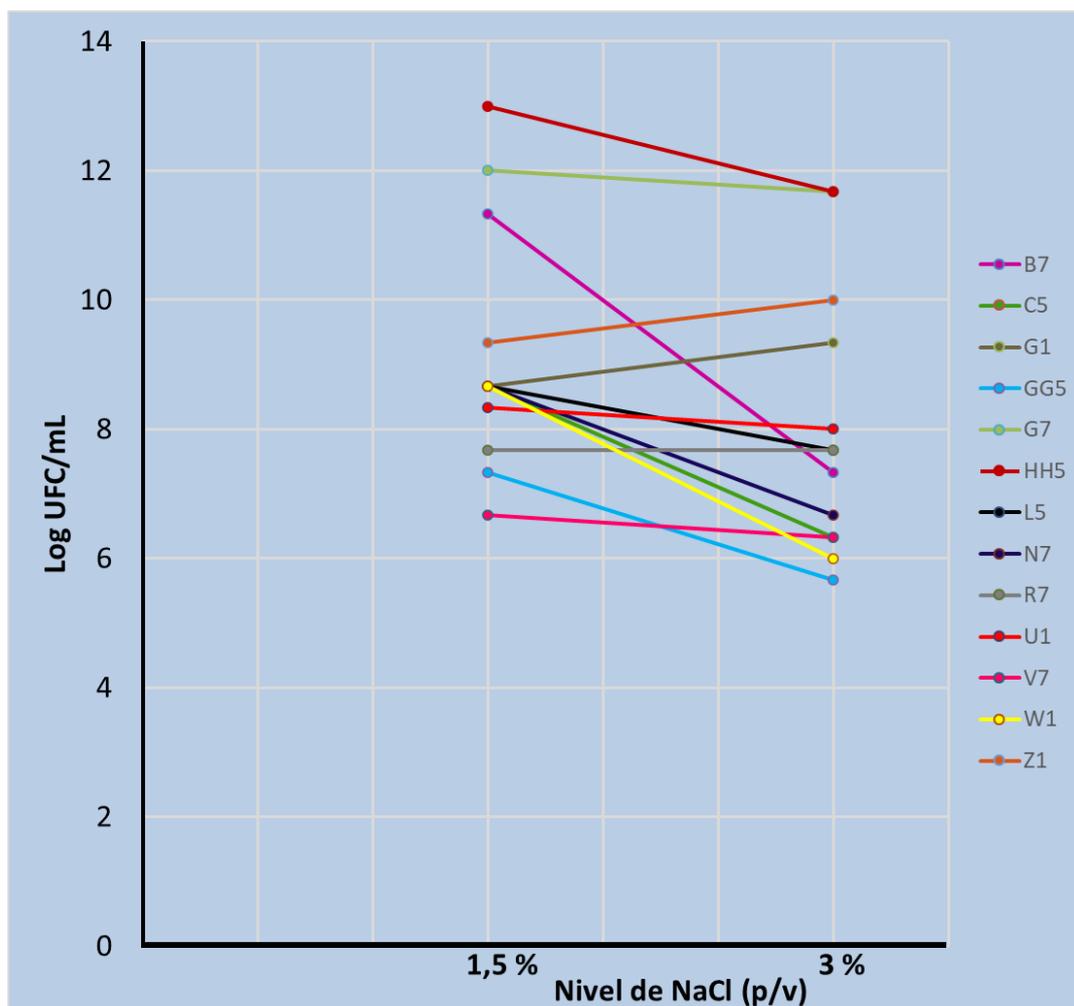


Figura 9. Comportamiento de las 13 cepas de *L. monocytogenes* ensayadas creciendo en 2 condiciones de NaCl (1,5 y 3 % p/v) durante 48 horas.

Los resultados presentados aquí marcan un efecto diferencial del potencial osmótico en el crecimiento de las cepas evaluadas. Esto sugiere la existencia de plasticidad fenotípica dentro de una misma especie bacteriana y demuestra diferentes niveles de tolerancia al NaCl dentro de los aislamientos estudiados.

La variabilidad obtenida en los recuentos según las condiciones del medio sugiere considerar patrones ecológicos específicos de cada aislamiento en particular. En concordancia con los estudios presentados aquí, los recuentos podrían estar relacionados a los parámetros cinéticos que determinan el crecimiento de un microorganismo,

específicamente el tiempo de latencia, el tiempo de generación y la velocidad de crecimiento. Los estudios realizados por Madigan *et al.*, (1997) sostienen que tanto las condiciones ambientales (composición del medio) como el genotipo, influyen la fase de crecimiento exponencial del microorganismo. Por esta razón, los cambios en el medio fisicoquímico pueden alterar estos parámetros y condicionar el recuento poblacional de la cepa en estudio (Zwietering *et al.*, 1994; McMeekin *et al.*, 2002).

En este estudio para la realización de los ensayos se emplearon cultivos frescos de 24 horas para promover la activación de las cepas, lo que probablemente redujo la posibilidad de una fase de latencia larga inducida por estrés (Whiting & Bagi, 2002). Esto también concuerda con los estudios realizados por Augustin *et al.*, (2000) quienes asumen que los cultivos de *L. monocytogenes* que crecen activamente se ajustan de forma más rápida a los cambios que aquellos extraídos de la fase de latencia o la fase estacionaria.

Por otro lado, la respuesta al estrés salino y en consecuencia al estrés hídrico, podría estar determinada por diversos factores, entre los que se incluye las condiciones previas a las que estuvo sometido el microorganismo. En este aspecto, el fenotipo bacteriano puede depender de la historia fisiológica de la población (Buchanan & Cygnarowicz, 1990; McMeekin 1993). Asimismo y en concordancia con otras investigaciones (Gray *et al.*, 2004; Ward *et al.*, 2004; Bergholz *et al.*, 2018), las características fenotípicas de cada cepa en particular observadas en el presente estudio, pueden tener relación con los ambientes donde estos microorganismos desarrollaron sus nichos ecológicos antes de contaminar la carne de pollo. Los estudios realizados por Poimenidou, *et al.*, (2016) sugieren que la respuesta adaptativa al estrés osmótico de *L. monocytogenes*, está condicionada por el ambiente de pre-exposición. En contrapartida, los estudios realizados por Kale *et al.*, (2017) establecen que no hay una correlación entre la

tolerancia al estrés osmótico de los aislamientos de *L. monocytogenes* y la fuente de origen, aunque la tolerancia puede estar vinculada a serotipos específicos.

Los resultados obtenidos en esta Tesis, revelan la necesidad de considerar distintos patrones fenotípicos aún dentro de aislamientos provenientes de una misma fuente. Si bien existen estudios vinculados al crecimiento de *L. monocytogenes* frente a diversos factores para predecir su comportamiento (Valero *et al.*, 2007; Carrasco *et al.*, 2007), adecuar la inestabilidad intraespecífica entre los aislamientos, es fundamental para una información más precisa en el estudio del patógeno. Debido a esta heterogeneidad, los resultados presentados aquí, revelan que *L. monocytogenes* presenta variabilidad fenotípica dentro de la misma población y sugieren que no todas las cepas pueden ser representativas para la construcción de modelos predictivos. En concordancia a esto, Begot *et al.*, (1997) observaron diferencias fenotípicas en cepas de *L. monocytogenes* aisladas de productos cárnicos creciendo bajo diferentes condiciones de actividad agua. Estos autores sugirieron que la variabilidad observada entre las cepas podría plantear interrogantes en la evaluación cuantitativa del riesgo. Por otra parte, esta variabilidad fenotípica también puede evidenciarse aún dentro de un mismo serotipo frente a variables físicas (Pin *et al.*, 2001).

Por otro lado, la tolerancia de *L. monocytogenes* al NaCl ha sido relacionada con la temperatura de crecimiento. Se ha establecido que las temperaturas altas son más perjudiciales en la adaptación al estrés osmótico en algunos aislamientos comparado con las temperaturas de refrigeración (Trepal Quílez, 2002). Los estudios realizados por Bergholz *et al.*, (2010) asumen que cepas provenientes de distinto linaje, solo presentan diferencias en el crecimiento a 37 °C. Debido a que, en los ensayos realizados aquí, se emplearon solo temperaturas de incubación de 37 °C, se podría sugerir que las cepas fueron sometidas a un doble efecto de estrés, aumentando aún más la selección de

cepas adaptadas de acuerdo a los resultados obtenidos. En efecto, Cole *et al.*, (1990) señalan que a una concentración entre 2 y 2,5 % p/v de NaCl, se necesita una temperatura de 10 °C para el adecuado crecimiento de *L. monocytogenes*.

Debido a que actualmente se promueve el consumo de alimentos con bajos niveles de NaCl, las concentraciones empleadas en este Trabajo para evaluar la tolerancia osmótica de *L. monocytogenes* fueron menores que las que se describen en otros estudios. Sin embargo, esta bacteria tiene capacidad de crecer en medios con 10 % p/v de NaCl, sobrevivir en soluciones hasta 20-30 % p/v de NaCl o detectarse en sal pura después de 150 días a 22 °C (Gnanou Besse *et al.*, 2000; Duché *et al.*, 2002). Según los datos del presente estudio, la discrepancia observada en la capacidad de proliferación de cada cepa, posiblemente indique diferencias en el estado de adaptación o tolerancia al NaCl. Así, el efecto negativo de osmolitos sobre las cepas más sensibles y la falta de esta respuesta en otras, puede ser explicado por la capacidad de la bacteria de hacer frente al estrés salino, el cual produce una reducción sustancial de la actividad agua del medio (dos Santos, 2007). Este factor influye en mayor o menor medida en la sobrevivencia y crecimiento bacteriano y juega un rol fundamental en la resistencia a las condiciones de alta osmolaridad del medio. Sin embargo, a pesar de haber obtenido diferencias en el recuento tras las condiciones ensayadas, en todos los cultivos realizados fue posible obtener bacterias viables de los aislamientos, evidenciando la capacidad osmotolerante de *L. monocytogenes*. Varios estudios sugieren que los mecanismos de tolerancia se basan en la acumulación de trimetilaminoácidos como la carnitina y la betaína (trimetilglicina) a través de transportadores específicos, los cuales participan también en la criotolerancia. Estos osmolitos podrían ser adquiridos de los alimentos al igual que la prolina, previniendo daños estructurales y funcionales causados por el estrés osmótico (Duché *et al.*, 2002; Sleator *et al.*, 2003; Burgess *et al.*,

2016). De interés para los estudios presentados, la carne de pollo puede presentar altos niveles de estos osmoprotectores comparados con otros alimentos (de Zwart *et al.*, 2003), lo que posiblemente explique la capacidad adaptativa al NaCl de los aislamientos durante los ensayos realizados. Otras estrategias incluyen la expresión de carboxipeptidasas que escinden enlaces cruzados de peptidoglucano, el antiportador *Mrp*, involucrado en el transporte de Na^+/H^+ o la activación de factores de transcripción específicos (Bergholz *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2014). Por otro lado, considerando que las cepas evaluadas fueron aisladas de carne de pollo refrigerada, la aclimatación previa a condiciones subóptimas (bajas temperaturas) pudo haber resultado favorable en la osmotolerancia posterior, produciéndose un efecto de protección cruzada (Bucur *et al.*, 2018). Según Francois *et al.*, (2007), la preincubación de *L. monocytogenes* en condiciones de baja temperatura genera una fase de letargo más corta promoviendo resistencia al estrés. Por su parte, los estudios realizados por Bergholz *et al.*, (2010) concuerdan que el comportamiento de *L. monocytogenes* en condiciones de alta salinidad (6 % p/v NaCl) es mejor cuando las cepas son previamente expuestas a temperaturas de refrigeración. Respecto a esto, se ha propuesto que los mecanismos empleados para resistir condiciones de bajas temperaturas participan también en la tolerancia a la osmolaridad elevada (Raimann *et al.*., 2009; Schmid *et al.*., 2009). Por lo tanto, la inducción al frío podría promover la expresión de genes que involucran transportadores de solutos, de importante participación en el estrés salino posterior (Bayles & Wilkinson, 2000).

En correlación con los resultados presentados aquí, la variabilidad fenotípica ha sido demostrada en diversos estudios. Bergholz *et al.*, (2010) encontraron diferencias en los parámetros de crecimiento trabajando con aislamientos de *L. monocytogenes*. Estos autores asociaron las diferencias fisiológicas a componentes genéticos y a la historia

evolutiva de cada cepa según la filogenia. En este aspecto, se ha demostrado que las cepas de distinto linaje además de su divergencia genética pueden diferir en su resistencia al estrés, presentando características fenotípicas específicas en condiciones de cultivo (Nightingale *et al.*., 2006; Barmalia Davis *et al.*, 2008). Incluso estas diferencias pueden manifestarse dentro de un mismo linaje, debido a factores epigenéticos (Bergholz *et al.*, 2018). En este estudio, si bien no se analizaron las cepas por linaje, la variabilidad fenotípica observada en los aislamientos estudiados, podría estar relacionada al linaje correspondiente y en consecuencia a su genoma (Bergholz *et al.*, 2010). Por otro lado, los mecanismos procariontes para desarrollar variación genética natural como la conjugación o la transformación (den Bakker *et al.*, 2008), no deberían descartarse para explicar la fisiología y la capacidad adaptativa específica de las cepas evaluadas. De interés para los resultados presentados, los estudios realizados por Katharios Lanwermyer *et al.*, (2012) sostienen que las *Listeria* spp. no patogénicas podrían funcionar como reservorio de genes de resistencia al estrés y luego ser transferidos por conjugación a *L. monocytogenes*.

Por otra parte, el estudio de la variabilidad fenotípica en *L. monocytogenes* es destacada por la División de Productos de Salud y Alimentos de Health Canadá (HPFB, 2011). Este Organismo Internacional recomienda que, debido a las diferencias en los patrones de crecimiento y sobrevivencia que presentan algunos de los aislamientos, los diseños experimentales deberían realizarse con un *pool* de al menos tres a cinco cepas diferentes.

Desde el punto de vista epidemiológico, los resultados presentados sugieren que las cepas no afectadas por el aumento en la osmolaridad del medio (G1, G7, HH5, L5, R7, U1, V7 y Z1) podrían adaptarse efectivamente al medio gastrointestinal del huésped, tomando en cuenta las condiciones de estrés osmótico propias de este ambiente. Esta

relación ha sido observada por otros investigadores (Kapetanakou *et al.*, 2017). Por otro lado, todas las cepas evaluadas fueron capaces de desarrollarse en condiciones de salinidad creciente y a 37 °C (temperatura normal de mamíferos), sugiriendo ventajas competitivas en cuanto a la sobrevivencia y posibilidad de infección. Incluso, además de vislumbrar la aptitud de los aislamientos frente a los niveles osmóticos estudiados, los ensayos realizados también indujeron indirectamente el comportamiento de las cepas al ion cloruro (Cl⁻). Se ha demostrado que la presencia de este anión en el fagosoma, genera una señal de escape para *L. monocytogenes* favoreciendo su ciclo intracelular dentro del huésped (Radtke *et al.*, 2011). En este aspecto, las características fenotípicas observadas, pueden ser de utilidad en estudios preliminares para determinar el potencial patógeno de las cepas de *L. monocytogenes* presentes en la carne de pollo. Respecto a esto, se ha establecido una asociación entre determinados fenotipos resistentes a estrés y su capacidad de virulencia (Bergholz *et al.*, 2018). Asimismo, y en concordancia con las investigaciones realizadas por Angelo *et al.*, (2017) y Kremer *et al.*, (2017), las cepas que resultaron mejor adaptadas a las condiciones ensayadas, podrían presentar características propias que le permitan sobrevivir en determinados ambientes de la industria y contaminar con más frecuencia los alimentos. Por otro lado, los resultados obtenidos sugieren que el empleo de NaCl podría ser efectivo para inhibir la proliferación de aquellas cepas sensibles, las cuales disminuyeron su recuento cuando la concentración de esta sal aumentó al 3 % p/v (B7, C5, GG5, N7 y W1). Este principio funcionaría como control microbiano en la industria alimentaria, especialmente en la elaboración de productos procesados de pollo que presentan niveles osmóticos elevados. Contrariamente, en el resto de las cepas esta estrategia no sería de utilidad, debido a que la mayor concentración salina ensayada no modificó la densidad microbiana, lo que sugiere que dichas cepas poseen tolerancia a condiciones de estrés osmótico o presentan

plasticidad frente a los cambios de actividad agua del medio donde se desarrollan.

Los estudios presentados aquí, muestran que la tolerancia al NaCl en *L. monocytogenes* puede variar considerablemente entre las cepas. Esto concuerda con otras investigaciones donde la variabilidad fenotípica ha sido examinada dentro de complejos clonales, linajes y serotipos (Ribeiro & Destro 2014; Hingston *et al.*, 2017). En tanto, dentro del rango de las concentraciones de NaCl estudiadas, los resultados obtenidos pueden contrastar con otros autores. Esto se atribuye a que la mayoría de los estudios se basan en ensayos con cepas de referencia (Thomas & Wimpenny 1996; Acosta Chávez, 2015), las cuales pueden presentar características ecológicas muy diferentes respecto a los aislamientos provenientes de la carne de pollo.

En correlación a los resultados obtenidos, los estudios realizados por Chukwu *et al.*, (2007) sostienen que las bajas concentraciones de NaCl son inefectivas sobre el control *L. monocytogenes* e incluso favorecerían la recuperación de cepas estresadas. Por lo expuesto, esto podría tener implicaciones desfavorables para la salud pública. Por otra parte, Malekmohammadi *et al.*, (2017) señalan que las cepas de *L. monocytogenes* habituadas al estrés osmótico por NaCl, adquieren resistencia a los tratamientos con nisina.

Los resultados obtenidos indican que dentro de las 13 cepas evaluadas de *L. monocytogenes*, existe heterogeneidad fenotípica, por lo tanto no todos los aislamientos deben ser considerados similares al momento de evaluar parámetros de control o al realizar estudios de susceptibilidad. Estos resultados, tampoco descartan la existencia de más de un serotipo en los aislamientos ensayados, sugiriendo realizar más evaluaciones para determinar qué tipos de patrones moleculares presentan estas cepas y poder establecer relaciones con muestras ambientales y clínicas.

Es probable, que la capacidad de adaptación al aumento de salinidad del medio en las cepas analizadas, se asocie con diversos factores presentes en la industria avícola,

los cuales podrían ejercer un mecanismo de selección natural y regular de manera específica el comportamiento de *L. monocytogenes*. De este modo, es posible que estos condicionantes repercutan posteriormente en el crecimiento *in vitro* de cada aislamiento frente a concentraciones crecientes de NaCl.

CAPÍTULO III

INCIDENCIA DE LA DIETA EN EL RECUENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) PRESENTES EN EXCRETAS DE POLLOS



CAPÍTULO III: INCIDENCIA DE LA DIETA EN EL RECuento DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) PRESENTES EN EXCRETAS DE POLLOS

1.1 Sustentabilidad en la producción avícola y seguridad alimentaria

En la industria avícola, es común el empleo de antibióticos promotores de crecimiento (APC) de amplio espectro. Estos son utilizados en la dieta de las aves con el fin de mejorar el desarrollo del animal, disminuir trastornos diarreicos y prevenir enfermedades. A pesar de esto, el uso excesivo e inapropiado de los mismos, trajo como consecuencia trastornos en el balance de la microbiota intestinal de los animales (Barton, 2000). Asimismo, la presencia de residuos en los productos cárnicos y en el medio ambiente conduce a un incremento del riesgo en la seguridad alimentaria (Errecalde, 2004).

La posibilidad de desarrollar resistencia cruzada por transferencia de poblaciones bacterianas desde los animales a los humanos, derivó en la prohibición del uso de los APC en la Unión Europea, USA y Australia (Peinado, 2015) y en la búsqueda de alternativas sustentables que puedan sustituirlos. Entre estas estrategias, surgió el empleo de promotores de crecimiento a base de probióticos, ácidos orgánicos, enzimas, extractos vegetales, entre otros. Estos aditivos naturales en la dieta pueden modular el desarrollo de diversos microorganismos intestinales indeseables, resultando inocuos para la salud humana y el medio ambiente (Chila Covachina, 2014). Particularmente, la utilización de probióticos en la dieta, constituyó una herramienta de manejo prometedora y cuya eficacia fue evaluada en numerosos estudios (Mountzouris *et al.*, 2007; Awad *et al.*, 2010; Shim *et al.*, 2010).

Asimismo, la implementación de programas para minimizar el uso de antibióticos, promovida por distintos grupos de investigación y por la OMS (Organización Mundial de la Salud) condujo al empleo de ingredientes no tradicionales en la alimentación de aves. El objetivo de estas técnicas, fue lograr que el alimento de los pollos además de garantizar el crecimiento y desarrollo en el animal, contribuya a la obtención de productos nutracéuticos e inocuos desde el punto de vista de la salud pública. Por otro lado, debido a que en todos los eslabones de la cadena productiva avícola intervienen numerosos factores que influyen en la sustentabilidad del sistema, la dieta de los animales constituye un pilar fundamental en este aspecto.

1.1.1 Uso de probióticos en la dieta de aves

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que administrados en la dieta pueden causar modificaciones en la microbiota asociada al tracto gastrointestinal del hospedador y generar efectos benéficos en la producción, en la resistencia a enfermedades y en la salud del huésped (Mutus *et al.*, 2006). Los microorganismos con capacidad probiótica más estudiados comprenden levaduras y bacterias. Entre estos se destacan; *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. y *Bacillus* spp. (Millán, 2007; Díaz López *et al.*, 2017). Particularmente, la utilización de *Bacillus subtilis* como aditivo en la alimentación animal ha sido considerada segura e inocua (Medina Saavedra *et al.*, 2017).

B. subtilis es una bacteria Gram positiva y anaeróbica facultativa que comúnmente es encontrada en el suelo. Puede proliferar en el tracto gastrointestinal, presentando capacidad de exclusión competitiva contra microorganismos potencialmente patógenos (Torres *et al.*, 2015). Es tolerante a condiciones ambientales extremas debido a la capacidad de formar una endospora resistente. Dicha característica le confiere aptitud

para soportar largos tiempos de almacenaje, altas presiones y temperaturas, de importancia durante la manufactura del alimento balanceado. La EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) establece que *B. subtilis* es una especie con evaluación QPS (*Qualified Presumption of Safety*) por lo tanto es sensible a antibióticos y no posee potencial toxigénico. Por este motivo, es considerada un aditivo seguro para aves sin riesgo para el consumidor ni el ambiente (EFSA, 2007).

Las ventajas del empleo de probióticos en la producción avícola, se basan en las funciones benéficas que ejercen en la salud animal (Pourakbari *et al.*, 2016). En la interacción con la microbiota intestinal, los probióticos pueden competir con patógenos por sitios de unión y nutrientes y algunos de ellos son capaces de producir sustancias antimicrobianas (López Acevedo *et al.*, 2013).

1.1.2 Empleo de alimentos no tradicionales en la producción avícola

Ciertos residuos agrícolas provenientes de la industria pueden ser utilizados como componentes de la dieta en la alimentación animal, contribuyendo con un alto aporte de proteína y ácidos grasos esenciales. Entre estos se incluyen subproductos de la industria aceitera como la harina de chía (*Salvia hispánica* L.).

La planta de chía es una especie anual de crecimiento estival originada de Centroamérica y su cultivo se lleva a cabo en las provincias del noroeste argentino (NOA) abarcando Catamarca, Salta, Jujuy, Tucumán y parte de Santiago del Estero y Formosa. Debido al aumento en la producción en los últimos años, Argentina se situó entre los tres principales productores del mundo de chía junto con Paraguay y Bolivia (Scalise, 2014). Esto se debe a que sus semillas presentan importantes propiedades nutricionales entre las que se destacan un alto nivel de ácidos grasos esenciales con un 60 % de Omega 3 (ácido α -linolénico) y un 20 % de Omega 6 (ácido linoleico) (Suri *et*

al., 2016). Las semillas también son fuente de proteína y fibra dietética y poseen elevadas concentraciones de minerales. Tras la extracción del aceite, la harina resultante constituye un excelente producto para la alimentación animal, siendo de calidad superior a la harina de soja (Busilacchi *et al.*, 2015). La harina de chía contiene un 30 % de proteína compuesta de aminoácidos esenciales entre los que se destacan la lisina, metionina y cistina. Presenta un elevado nivel de fibra (40 %) de la cual un 5 % se encuentra como fibra soluble o mucílago (Peiretti & Gai, 2009). Este mucílago está constituido por un polisacárido no amiláceo de elevado peso molecular compuesto por D-xilosa, D-glucosa, D-arabinosa, ácido galacturónico y glucurónico (Timilsena *et al.*, 2016). La harina, además contiene compuestos polifenólicos con actividad antioxidante entre los que se incluyen: ácidos (protocatéquico, gálico, clorogénico y cafeico), flavonoides (quercetina, kaempferol y epicatequina) y el glucósido rutina (Taga *et al.*, 1984; Marcinek & Krejpcio, 2017).

Los estudios señalan que el aporte de ácidos grasos saturados y en particular, el de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en la dieta de aves, promueve efectos beneficiosos en las comunidades microbianas presentes en el íleon y ciego (Geier *et al.*, 2009; Seidavi & Simões, 2015).

1.2 Rol de la microbiota intestinal de los pollos

Debido a que, en el pollo recién nacido el intestino delgado se encuentra en estado inmaduro, su desarrollo requiere de cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares. Estas modificaciones relevantes ocurren durante las dos primeras semanas de vida, estableciéndose una comunidad microbiana en creciente complejidad junto al desarrollo de un perfil microbiano específico en cada tramo del intestino (Gong *et al.*, 2008).

A diferencia de los sistemas de crianza extensiva, donde la colonización del aparato digestivo de los pollos se da de manera espontánea por la microbiota del entorno, en la producción intensiva el tracto gastrointestinal (TGI) de las aves de engorde está influenciada principalmente por la dieta, el manejo y cuidado de los productores (Peinado, 2013a). La población de microorganismos del TGI se compone tanto de hongos, protozoos y en su mayoría de bacterias. Dentro de este último grupo, las especies más abundantes corresponden al género *Lactobacillus* en primer lugar, y luego a las familias Clostridiaceae, Streptococcaceae y Enterococcaceae (Londero, 2012). La prevalencia del género *Lactobacillus* puede evidenciarse en diferentes zonas del TGI de los pollos. Fuller & Brooker (1974) y Lu *et al.*, (2003) constataron la presencia de *Lactobacillus* spp. en el buche y en el íleon respectivamente. En tanto, la variabilidad en la comunidad microbiana está influenciada por la composición química del alimento digerido, por lo que la diversidad de la población bacteriana cambia en las diferentes regiones del intestino al igual que la densidad, aumentando desde la parte proximal a la distal (Apajalahti & Kettunen, 2003).

Por otra parte, la integridad y salud intestinal del broiler (pollo de carne) juega un rol fundamental en la producción avícola, debido a que los parámetros de peso y conversión de alimento óptimas (performance productiva) en una determinada línea genética, son altamente dependientes de la microbiota que presentan (Palacios, 2009). En relación a esto, una comunidad microbiana nativa “saludable” contribuye a disminuir el costo energético en el huésped, manteniendo un sistema inmune activo contra determinados patógenos (Diaz Carrasco *et al.*, 2019). Sin embargo, la homeostasis intestinal o eubiosis puede ser alterada frente a distintos estímulos de estrés resultantes del manejo, como desequilibrios nutricionales, vacunaciones, suministro de antibióticos, alta densidad de población, cambios abruptos de temperatura y humedad,

entre otros. Estos factores perturban el valor del pH intestinal e inducen cambios en la microbiota (Viera Osorio, 2015). Cuando esto sucede en la producción intensiva, ciertos patógenos pueden proliferar (Rondon *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2003) y colonizar el intestino. Estos eventos conducen a respuestas inflamatorias, infecciones localizadas y sistémicas o a la síntesis de compuestos tóxicos, que pueden perjudicar la salud del animal durante la crianza y/o provocar una zoonosis (Londero, 2012).

Determinadas enfermedades en la producción avícola, pueden provocar pérdidas económicas importantes. Por este motivo, en los últimos años ha surgido el interés de manipular la microbiota intestinal a través de la dieta, con el fin de prevenir la colonización de enteropatógenos y aumentar el rendimiento productivo de los animales (Blajman *et al.*, 2015). Por otra parte, durante el sacrificio, gran parte de la microbiota de las aves se mantiene, lo que puede desencadenar la contaminación de carcasas en los lugares de procesamiento de la carne. Como fue mencionado, especies como *L. monocytogenes* son habitantes naturales en el intestino de aves, por lo que en este aspecto las estrategias para su control deben ser fundamentales también para garantizar la salud humana (McMullen & Freitag, 2015).

1.3 Generalidades de las Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Este grupo microbiano pertenece al filo Firmicutes y al orden Lactobacillales el cual comprende alrededor de 20 géneros, dentro de los se incluyen los cuatro tradicionales: *Streptococcus* (actualmente subdividido en *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* y *Enterococcus*), *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. A los mencionados se adicionan *Weissella*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* y *Carnobacterium* (Cintas *et al.*, 2001, Rojas & Vargas, 2008).

Las BAL están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversos ambientes, incluyendo: alimentos, suelo, agua de mar, entre otras fuentes. Son habitantes naturales de la filosfera, como así también del tracto digestivo (mucosas) y genital de mamíferos (Azadnia *et al.*, 2011). Este grupo comprende a un conjunto de bacterias Gram positivas, no esporuladas e inmóviles que en general, poseen morfología bacilar o cocoide. Son microorganismos microaerófilos o anaerobios facultativos y carecen de complejos citocromos y catalasa *sensu stricto* (Monroy, 2009). La principal característica es que producen ácido láctico como principal producto del metabolismo fermentativo (BAL homofermentativas) o ácido láctico y otros productos secundarios como acetato, etanol y dióxido de carbono (BAL heterofermentativas) (Savadogo, 2006). El primer grupo (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*) posee la enzima fructosa-bisfosfato aldolasa, degradando los azúcares por la vía metabólica de Embden-Meyerhoff-Panas. En tanto, las bacterias heterofermentativas (*L. brevis*, *Leuconostoc*, etc.) presentan enzimas fosfocetolasas (fructosa-6-fosfato fosfocetolasa y xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa) para metabolizar la glucosa, siendo menos eficientes energéticamente (Hernández *et al.*, 2007; Gálvez, 2007).

De acuerdo a su temperatura ideal de crecimiento, las BAL pueden clasificarse en especies mesófilas o termófilas (Bertrand *et al.*, 2003). Las primeras se desarrollan óptimamente entre los 20 y 25 °C con un tiempo de incubación entre 18 y 20 horas. Mientras que las especies termófilas como *Lactobacillus casei*, *L. plantarum* y *L. acidophilus* crecen más favorablemente a temperaturas entre 40 y 45 °C (Blanco *et al.*, 2006).

Las BAL presentan la capacidad de sobrevivir y desarrollarse en ambientes de bajo pH. Este mecanismo está favorecido por un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y de protones al exterior celular, el cual además de contribuir con la

homeostasis del pH interno, origina energía (Vásquez *et al.*, 2009). El metabolismo de las BAL es quimiorganotrófico, por lo que utilizan carbohidratos fermentables y alcoholes como fuentes de carbono y energía. Sin embargo, debido a su limitada capacidad biosintética, las BAL son nutricionalmente exigentes. Por este motivo, para su crecimiento requieren determinados factores de crecimiento más o menos complejos como aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Parra, 2010). Esto conduce a que la búsqueda de comunidades de BAL se haga generalmente en ambientes ricos en nutrientes.

2. HIPÓTESIS

Se ha señalado que la composición de la dieta influye de manera fundamental sobre la estructura de las poblaciones microbianas (Owens *et al.*, 2008; Geier *et al.*, 2009; Adil *et al.*, 2011). Sin embargo, es insuficiente la información disponible referida a los efectos combinados en la dieta de un probiótico y una fuente de AGPI sobre la microbiota intestinal, especialmente en la población de BAL. Estas han sido consideradas por su rol en la conservación, vida útil e inocuidad de los alimentos, ya que mediante productos metabólicos inhiben la proliferación de patógenos y bacterias responsables de su alteración o deterioro (Agudelo Londoño *et al.*, 2015; Vijayakumar & Muriana 2017; Camargo *et al.*, 2018). En base a esta información se formuló la siguiente hipótesis:

- Es posible aislar BAL de las excretas de pollos sometidos a un manejo de producción intensiva, como así también favorecer la población de estos microorganismos benéficos a través de la incorporación de un probiótico y harina de chía en la dieta de los animales.

3. OBJETIVOS

En base a los criterios mencionados se propusieron los siguientes objetivos:

3.1 Objetivo general:

- Determinar la presencia de BAL en las excretas de pollos broiler bajo un sistema de producción intensiva.

3.2 Objetivo particular:

- Investigar el efecto de diferentes dietas sobre el recuento de BAL en las excretas, incluyendo al probiótico *B. subtilis* y a la harina de chía en la dieta de los pollos.

4. METODOLOGÍA

4.1 Localización e Instalaciones

La investigación se llevó a cabo en la Unidad de Experimentación Avícola (UEA) del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires (38°41' Lat. S y 62°15' Long. O). La región se halla comprendida entre las isohietas de 500 y 700 mm al O y E, respectivamente. El período experimental se desarrolló entre los meses de Septiembre y Noviembre.

Se empleó un galpón acondicionado de tipo cerrado de 7 x 5 m, con ventilación forzada, calefacción y aire acondicionado e iluminación artificial, con el fin de contribuir a mantener las condiciones adecuadas de temperatura de acuerdo a la edad del animal. El monitoreo de las temperaturas máximas y mínimas (mañana y tarde) dentro del galpón se llevó a cabo mediante la utilización de un termómetro.

Los corrales fueron construidos en madera y alambre hexagonal, ensamblados con 4 bloques cada uno de 1 m² de capacidad para alojar hasta 15 animales (Cobb, 2013). La distribución de los mismos permitió generar pasillos y acceder a todos los corrales por igual, maximizando el uso de la superficie disponible.

4.2 Animales y Manejo

Se emplearon 192 pollos parrilleros de la línea Cobb provenientes de una incubadora comercial. Al momento del ingreso, los animales fueron pesados ($37 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$) y sexados por el método del ala con el fin de construir lotes uniformes. Se conformaron 16 grupos de 12 animales cada uno (6 machos y 6 hembras) los cuales fueron colocados al azar en cada corral.

Durante los primeros 21 días, se colocaron comederos bandeja y bebederos provistos de un depósito invertido de 4 L de capacidad para garantizar el acceso de los animales al agua. Posteriormente, se instalaron bebederos automáticos tipo nipple y comederos tolva de 20 kg. Se utilizó cama de viruta de madera particionada a un tamaño de 15 cm la cual se recambió semanalmente.

En los bebederos y solo en el primer día, se aplicó un antimicrobiano sintético de amplio espectro ENRO (enrofloxacin quimioterápico 1 mL/L) y un compuesto polivitamínico (1gr/L). Posteriormente, los pollos fueron vacunados a los 7 y 15 días de edad contra Newcastle + Bronquitis Infecciosa y Gumboro, respectivamente.

Durante las tres primeras semanas, las condiciones de temperatura fueron reguladas mediante la utilización de 4 campanas calefactoras con lámpara infrarroja de 250 watts y calefactores eléctricos portátiles. Posteriormente, la temperatura óptima ambiental fue mantenida mediante la utilización de extractores de aire y un equipo portátil de aire acondicionado. El plan de iluminación se estableció de acuerdo a las recomendaciones del Manual de Cobb (Cobb, 2013).

Los ensayos y experimentos comprendieron un período inicial de exposición a tratamientos dietarios específicos, para finalmente realizar los muestreos y el análisis de las excretas. El manejo de los animales y los protocolos experimentales respetaron las normas establecidas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

4.3 Dietas Experimentales

Durante las primeras 4 semanas, los animales consumieron *ad libitum* un alimento “iniciador” (Tabla 4) y a partir de los 29 días hasta los 49 días de edad consumieron *ad libitum* las dietas experimentales (Tabla 5). Para esto, se utilizó el probiótico comercial Nutrallys BSN (Biotay S.A.) conteniendo esporas viables de una cepa seleccionada de

Bacillus subtilis (250 g/tn; 1×10^9 UFC/g) y como fuente de Omega 3 se empleó harinade chía (DESUS S.A.) cuya composición química se presenta en la Tabla 6.

Tabla 4. Ingredientes y composición química del alimento iniciador (0-29 días).

INGREDIENTES (%)	
Maíz	50,00
Trigo	2,75
Harina de Soja	36,00
Harina de Carne	6,00
Conchilla	0,50
Aceite vegetal	3,50
Sal	0,25
Núcleo Vitamínico Mineral	0,50
DL-metionina	0,19
Inerte	0,31
COMPOSICIÓN QUÍMICA	
EM (Kcal/kg)	3226
PB (%)	22,17
Calcio (%)	1,00
Fósforo total (%)	0,72
Metionina + Cistina (%)	0,91
Lisina (%)	1,21

Lípidos (%)	7,17
Fibra (%)	3,08

Referencias. EM: Energía Metabolizable. PB: Proteína Bruta.

Tabla 5. Ingredientes y composición química de las dietas experimentales (29-49 días).

INGREDIENTES (%)	C	W ₃	W ₃ +P	P
Maíz	60,56	49,20	49,20	60,56
Trigo	6,73	13,00	13,00	6,73
Harina de Soja	23,27	14,10	14,10	23,27
Harina de Carne	5,80	4,30	4,30	5,80
Harina de Chía	-	15,00	15,00	-
Conchilla	0,40	0,55	0,55	0,40
Aceite vegetal	2,35	3,10	3,10	2,35
Sal	0,25	0,25	0,25	0,25
Núcleo Vitamínico Mineral	0,50	0,50	0,50	0,50
DL-metionina	0,14	-	-	0,14
Probiótico	-	-	SÍ	SÍ
COMPOSICIÓN QUÍMICA				
EM (Kcal/kg)	3471	3418	3418	3471
PB (%)	18,12	17,62	17,62	18,12
Calcio (%)	0,91	0,91	0,91	0,91
Fósforo total (%)	0,67	0,64	0,64	0,67

Metionina + Cistina (%)	0,75	0,75	0,75	0,75
Lisina (%)	0,90	1,29	1,29	0,90
Lípidos (%)	6,33	9,01	9,01	6,33
Fibra (%)	2,62	5,90	5,90	2,62

Referencias. C: control; W₃: dieta con 15 % de harina de chía; W₃ + P: dieta con 15 % de harina de chía y probiótico y P: dieta con probiótico (*B. subtilis* 250 g/tn; 1x10⁹ UFC/g). EM: Energía Metabolizable. PB: Proteína Bruta.

Tabla 6. Composición química de la Harina de Chía

Parámetro	Valor	Unidad
Materia Grasa	18	%
Proteínas	27,3	% (N x 6,25)
Ácido palmítico	7,76	%
Ácido esteárico	3,62	%
Ácido oleico	7,55	%
Ácido linoleico	20,5	%
Ácido linolénico	59,7	%
Valor energético	349	Kcal/100g
Cenizas	5,8	%
Hidratos de carbono	19,55	%
Humedad	7,9	%

4.4 Diseño Experimental

Se utilizó un diseño de parcela dividida, por lo que los 16 corrales se distribuyeron en 4 bloques (Figura 10). Los tratamientos dentro de cada bloque se distribuyeron de manera completamente aleatorizada. Las dietas ensayar fueron: Control (C); dieta con harina de chía (W3); dieta con harina chía y probiótico (W3 + P) y dieta con probiótico (P). Cada tratamiento tenía 4 repeticiones de 12 animales cada uno, con un total de 48 pollos por dieta. La excreta recolectada de estos 48 pollos constituyó la unidad experimental para evaluar el efecto de la dieta en la población de BAL.

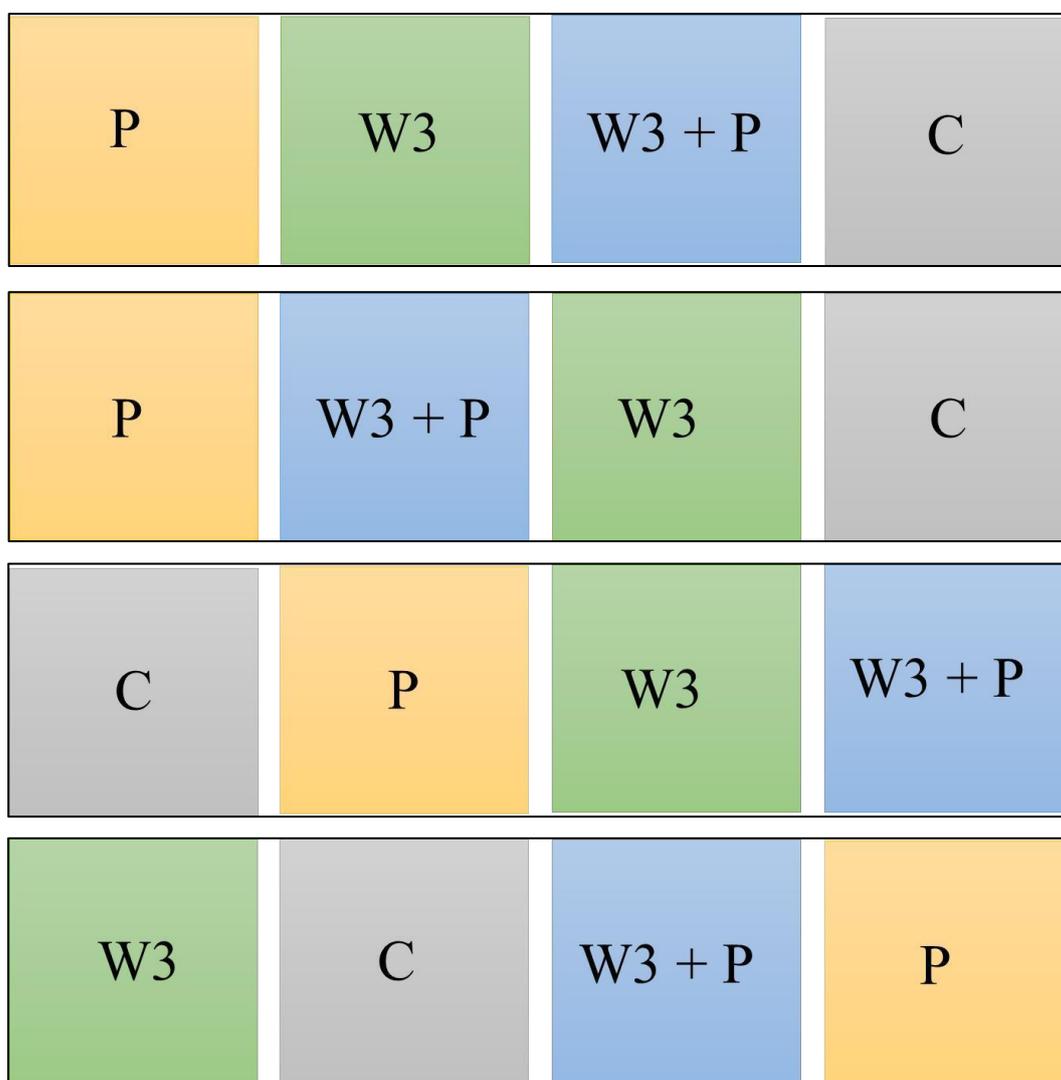


Figura 10. Diseño experimental. Control (C); dieta con harina de chía (W3); dieta con harina chía y probiótico (W3 + P) y dieta con probiótico (P).

4.5 Toma de muestras y aislamiento de BAL

Se realizaron 3 muestreos en la fecha próxima a la faena (7 semanas de crianza). Para los estudios se recolectaron de cada corral 25 g de excreta, obteniéndose por vez 100 g de excretas correspondientes a cada dieta experimental. Las muestras fueron colocadas en recipientes de polietileno estéril, transportadas inmediatamente al laboratorio de Microbiología Agrícola de la Universidad Nacional del Sur y procesadas dentro de las 24 horas siguientes. Las muestras representativas (25 gramos) de cada tratamiento se suspendieron en un frasco conteniendo 225 mL de *Buffer* Fosfato Salino (BFS) (Anexo 1.15). Posteriormente, los frascos se colocaron en un agitador orbital a 450 rpm durante 10 minutos.

Para el aislamiento y cultivo de BAL, se extrajeron alícuotas de 1 mL de las suspensiones salinas de cada muestra y se inocularon en tubos conteniendo 9 mL de Caldo Man, Rogosa & Sharp (MRS, de Man *et al.*, 1960) (Anexo 1.16) como medio de enriquecimiento para *Lactobacillus* spp. (Ramírez López & Vélez Ruiz, 2016). Todos los caldos se incubaron de forma estática en jarra Gas-Pack a 33 °C durante 48 horas en condiciones de microaerobiosis (atmósfera con 5-8 % de CO₂). Para esto, se utilizaron sobres generadores de CO₂ y se colocaron indicadores de anaerobiosis (Merck).

Posteriormente se realizó el recuento en placa de BAL para cada tratamiento, empleando el método de las diluciones seriadas. Las diluciones se realizaron en tubos conteniendo 9 mL de BFS y la siembra de cada dilución se realizó en Agar MRS (Anexo 1.17) a razón de 0,1 mL por caja. Estos medios de cultivo se prepararon adicionando 1,5 % agar p/v (Britania) al Caldo MRS. Las placas se incubaron a 33 °C durante 72 a 96 horas con tensión disminuida de O₂, utilizando la misma técnica descripta anteriormente para los caldos (Marguet *et al.*, 2011). Luego de la

incubación, se seleccionaron las placas que contenían entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias (UFC) y se efectuó la estimación del número de BAL para cada tratamiento, empleando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ Colonias} * \text{inversa de la dilución}}{0,1 \text{ mL}}$$

Los resultados fueron expresados como log UFC/mL del promedio de tres réplicas.

4.6 Confirmación microbiológica de las BAL aisladas mediante pruebas fenotípicas

Las colonias de BAL crecidas en placa se reaislaron nuevamente en Agar MRS por el método de siembra en estría (técnica por agotamiento), con el fin de obtener aislamientos puros. Estas placas se incubaron en las mismas condiciones descriptas anteriormente. Luego, se seleccionaron 15 aislamientos de BAL representativos de cada tratamiento que presentaban mejor desarrollo y se repicaron a tubos conteniendo Agar MRS. El procedimiento de selección se realizó en función de las características culturales: forma, tamaño, color, elevación y bordes de las colonias (González *et al.*, 2000; Ammor *et al.*, 2005; Greco *et al.*, 2005; Bucio *et al.*, 2006; Itoi *et al.*, 2008). Estos mismos aislamientos fueron posteriormente utilizados para los ensayos de antagonismo (Capítulo IV).

Los aislamientos se analizaron en función a los siguientes indicadores: respuesta a la tinción de Gram, morfología, ausencia de enzima catalasa y citocromo oxidasa, sin producción de H₂S ni de indol e inmovilidad en medio SIM y formación de ácido a partir de glucosa y lactosa. Las pruebas fenotípicas fueron realizadas de acuerdo al *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Garrity, 2005) y la metodología empleada fue la misma a la descripta en el Capítulo I (Punto 3.3: Pruebas bioquímicas).

La morfología y tipo de coloración de las células bacterianas se determinó mediante microscopía óptica. En tanto, para determinar la capacidad fermentativa de los azúcares glucosa y lactosa, se empleó el indicador rojo fenol y se incorporó una campana Durham en cada tubo para verificar la producción de dióxido de carbono.

Luego de la confirmación fenotípica, las cepas fueron identificadas con letras y números correspondientes a la condición experimental donde fueron aisladas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Las excretas de pollos broiler son fuente de BAL nativas (endógenas)

Mediante el cultivo de enriquecimiento y siembra en Agar MRS se obtuvieron: colonias blanquecinas, pequeñas a medianas, convexas, de bordes enteros y de aspecto cremoso. Los 15 aislamientos seleccionados de cada uno de los tratamientos presentaron características fenotípicas típicas de especies de BAL (Figura 11).

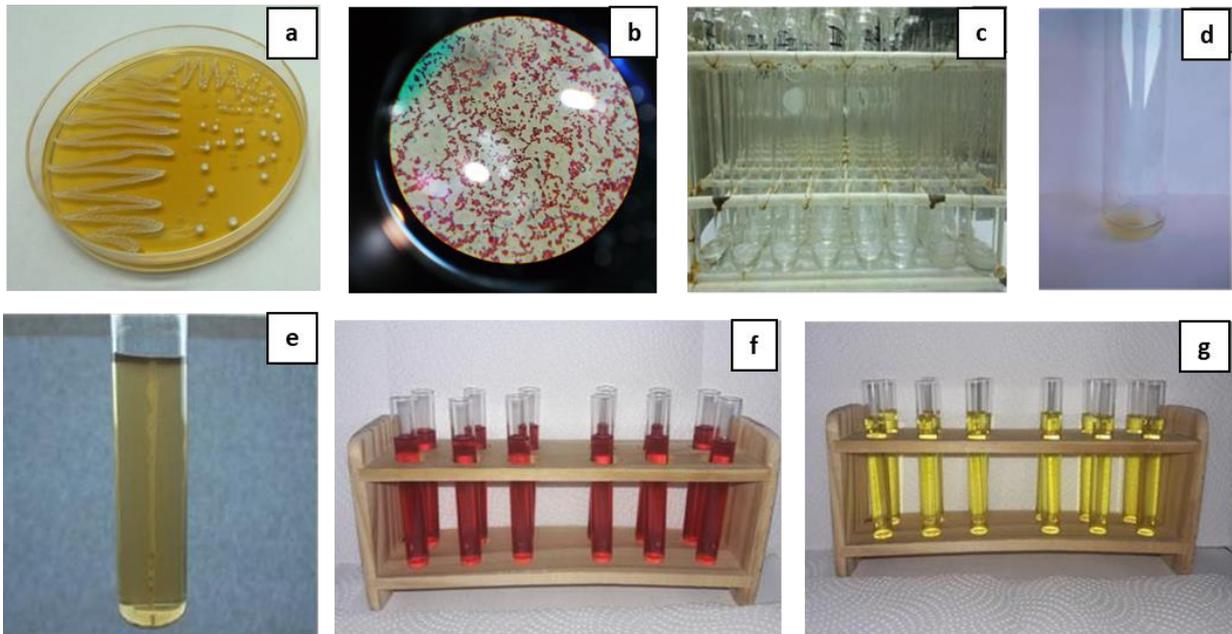


Figura 11. Aislamiento de BAL y pruebas fenotípicas realizadas para su confirmación. a) Crecimiento en medio MRS b) Tinción de Gram c) Prueba de la catalasa d) Prueba de la oxidasa e) Movilidad en medio SIM f) Aislamientos en medios con lactosa o glucosa g) Aislamientos en medios con lactosa o glucosa luego de 48 horas de incubación. Notar el viraje del rojo fenol hacia un color amarillo debido a la presencia de ácido.

Estos aislamientos correspondieron a cocobacilos Gram positivos no formadores de esporas. Las cepas evaluadas no produjeron H₂S ni indol, tampoco presentaron movilidad en el medio SIM y resultaron negativas para las pruebas de oxidasa y catalasa (características propias del grupo BAL). Todas estas cepas tenían capacidad para fermentar la glucosa y el azúcar lactosa, con producción de ácido sin formación de gas.

Los resultados obtenidos demuestran que es posible aislar BAL de las excretas de pollos bajo un sistema de producción intensiva. Estos estudios sugieren que el análisis de la materia fecal de los pollos podría resultar útil como un indicador de la microbiota intestinal en un momento determinado. El aislamiento de BAL de las excretas podrían reflejar los complejos requerimientos nutricionales que presentan estas bacterias cuando se las cultiva *in vitro*. Ciertas especies de este grupo se encuentran colonizando de forma activa el tracto intestinal de las aves. En concordancia con los resultados presentados aquí, Shiva & Jara (2013) aislaron diversas especies de BAL pertenecientes al género *Lactobacillus* del material de cama de pollos de engorde. Otras investigaciones, sostienen que las especies de *Lactobacillus* provenientes de granjas de pollos, son muy efectivas como productoras de ácido láctico (Ibourahema *et al.*, 2008). Por otra parte, las BAL procedentes de las excretas podrían tolerar determinadas condiciones de estrés al estar adaptadas al TGI de los pollos y así presentar cierta habilidad competitiva potencial contra otros microorganismos. Respecto a esto, se han reportado BAL antagonistas de patógenos con capacidad de soportar altas concentraciones osmóticas (Marguet *et al.*, 2011).

Considerando el medio de cultivo empleado en este Trabajo, se sugiere que los aislamientos obtenidos de las excretas analizadas pertenecen a *Lactobacillus* spp. El medio MRS se desarrolló para obtener particularmente microorganismos de este tipo y ha sido empleado para diferenciar estas especies de otras pertenecientes al grupo de

BAL (Ramírez López & Vélez Ruiz, 2016). Esto concuerda también con las investigaciones que sostienen que *Lactobacillus* es el género predominante en el intestino de las aves (Londero, 2012; Dec *et al.*, 2017). En correlación, varias especies de *Lactobacillus* han sido aisladas de los pollos de engorde en muestras de íleon, ciego y cloaca (Cauwerts *et al.*, 2006; Rondón *et al.*, 2008; Majidzadeh Heravi *et al.*, 2011). Entre las especies identificadas se incluyen *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. gallinarum*, *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, entre otras. Esto demuestra que es posible obtener algunas de estas BAL de la microbiota gastrointestinal de pollos a través del análisis de las excretas (Shiva & Jara, 2013).

Si bien son escasos los estudios de aislamientos de BAL nativas en excretas o material de cama de aves comerciales, las investigaciones realizadas por Paço *et al.*, (2003) reportan que *Lactobacillus* spp. están presentes en estos sustratos. Sin embargo, el rol de estas BAL en la comunidad microbiana tanto en las excretas como en el sistema endógeno de la microbiota intestinal, son desconocidos. Ciertas investigaciones han evaluado el potencial uso como probiótico de BAL aisladas de excrementos de broiler con resultados favorables (Lee *et al.*, 2008; Hidayat *et al.*, 2018). Respecto a esto, las evaluaciones microbiológicas realizadas por García *et al.*, (2008) corroboran que este grupo bacteriano es el predominante en las excretas y que su nivel se mantiene estable durante el crecimiento de los animales, sugiriendo posibilidades de empleo como probióticos. Por lo tanto, estas bacterias autóctonas provenientes de ambientes naturalizados serían de interés en el desarrollo de estrategias para la colonización del intestino de los pollos y la mejora de su salud, previniendo el desarrollo de bacterias patógenas. Por otra parte, Shiva & Jara (2013) sostienen que las BAL procedentes de las excretas de pollos, pueden ser efectivas en el control de especies con actividad ureasa que generan gases perjudiciales para la salud de los animales. En este sentido,

el empleo de BAL en las granjas avícolas como bacterias controladoras de la microbiota productora de amoníaco, cobra una especial atención.

Desde un enfoque productivo, las BAL aisladas en este Trabajo podrían ser consideradas como agentes inocuos y resultar benéficas al ser incorporadas a una formulación dietaria. Su procedencia, promueve un manejo eficiente y potencialmente seguro dentro de la producción avícola. Además, sería sumamente importante su aprovechamiento en el control de patógenos que frecuentemente contaminan las carcasas de pollos durante y después del sacrificio (Cisek & Binek, 2014).

5.2 La composición de la dieta de los pollos influye en el recuento de BAL de las excretas

De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que el tipo de dieta que consumen los pollos afecta significativamente el número medio de BAL presentes en las excretas (Tabla 7 y Figura 12). En los tratamientos con harina de chíá (W3) y harina de chíá suplementado con el probiótico *B. subtilis* (W3 + P), se obtuvieron recuentos de BAL de 4,11 log UFC/mL y 4,09 log UFC/mL respectivamente. Estos recuentos fueron superiores respecto a los observados en la condición control (C) y en el tratamiento que solo contenía el probiótico *B. subtilis* (P) adicionado, con 3,82 log UFC/mL y 3,78 log UFC/mL de BAL respectivamente. Por su parte, los recuentos de BAL obtenidos en los tratamientos W3 y W3 + P no difirieron de forma significativa. Los resultados evidenciaron un aumento en el número de BAL independientemente de la presencia del probiótico. Por otro lado, los recuentos de BAL obtenidos en las excretas del tratamiento P, no difirieron significativamente de la condición control. Esto reveló la imposibilidad de estimular el desarrollo de las BAL intestinales, en los animales alimentados con dietas que únicamente contenían al probiótico como aditivo.

Tabla 7. Recuento de BAL en excretas de pollos broiler de 49 días de edad alimentados con distintas dietas durante el período comprendido entre los 21 y 49 días de edad.

	Recuento de BAL (Log₁₀ UFC/mL)			
	C	W3	P	W3 + P
	3,86385796	4,13385813	3,80651913	4,12716961
	3,79281177	4,08685792	3,74842062	4,07532793
	3,83295575	4,11421053	3,78532984	4,09401668
Promedio	3,82987516	4,11164219	3,78008986	4,09883808
Desvío (±)	0,03562314	0,02360513	0,02940157	0,02625499

```

Análisis de la varianza
Variable  N  R²  R² Aj  CV
Log10 UFC/mL  12  0,98  0,97  0,73

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)
F.V.  SC  gl  CM  F  p-valor
Modelo  0,27  3  0,09  108,26  <0,0001
Tratamientos  0,27  3  0,09  108,26  <0,0001
Error  0,01  8  8,4E-04
Total  0,28  11

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,05473
Error: 0,0008 gl: 8
Tratamientos Medias n  E.E.
P  3,78  3  0,02  A
C  3,83  3  0,02  A
W3 + P  4,10  3  0,02  B
W3  4,11  3  0,02  B
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)
    
```

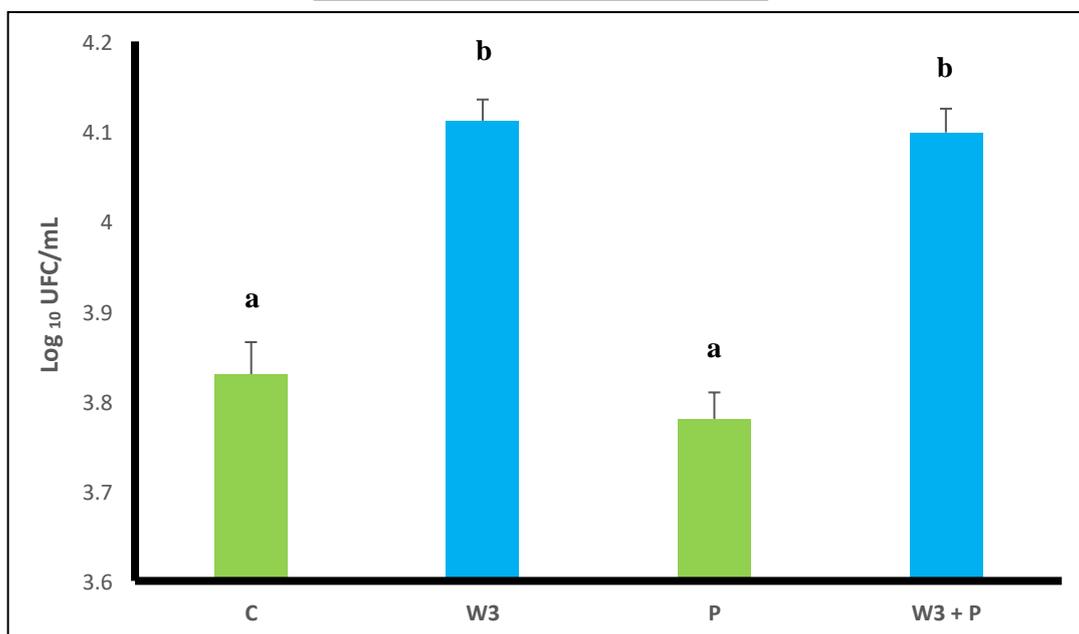


Figura 12. Recuento de BAL en las excretas de pollos sometidos a diferentes dietas experimentales. Los valores se expresan en Log₁₀ UFC/mL como promedio ± SD de tres repeticiones. Tratamientos con la misma letra no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$). Referencias: C: control; W₃: dieta con 15 % de harina de chíá; P: dieta con probiótico (*B. subtilis* 250 g/tn; 1×10^9 UFC) y W₃ + P: dieta con 15 % de harina de chíá y probiótico.

Los experimentos demostraron que mediante el manejo de las dietas se pudo intervenir, al menos en parte, en la microbiota intestinal benéfica de las aves. Específicamente, se observó que cuando los pollos fueron alimentados con una dieta conteniendo una fuente de AGPI como la harina de chía, el recuento de la población de BAL en las excretas fue superior respecto a los demás tratamientos.

El estado de eubiosis influye considerablemente en las funciones fisiológicas, bioquímicas e inmunológicas de los animales. Los resultados presentados demuestran que el alimento es un factor fundamental en el balance de la microbiota intestinal. En este aspecto, diversos autores destacan que si bien el genotipo y edad de los animales, así como las condiciones ambientales de la granja y el manejo de las parvadas determinan en cierta medida la composición de la microbiota de los pollos, la dieta y los aditivos constituyen los factores más importantes (Lu *et al.*, 2003, Zulkifli *et al.*, 2009; Danzeisen *et al.*, 2011).

Como se mencionó, la composición de la microbiota intestinal es determinante para la salud de los pollos e influye en gran medida en su performance productiva (Palacios, 2009). El control ecológico de la microbiota del TGI es fundamental en animales bajo cría intensiva (Bengmark, 2017) y las BAL dentro de este perfil microbiano son claves para el mantenimiento y la estabilidad del individuo (Díaz López *et al.*, 2017). Por lo tanto, los tratamientos que promovieron un recuento superior de BAL (W3 y W3+P) proporcionarían mayores beneficios sobre estos animales al disminuir la disbiosis. De este modo, las BAL estarían favoreciendo la homeostasis intestinal. Se ha establecido que los lactobacilos son responsables de mantener la integridad del intestino a través de varios mecanismos, incluyendo: constitución de nichos ecológicos (competencia por nutrientes), protección contra procesos inflamatorios, estimulación de la secreción de mucina por las células calciformes, modulación de la respuesta inmune innata y adquirida y promoción del crecimiento de células epiteliales y su diferenciación.

Por otro lado, varias de estas BAL presentan proteínas de superficie que funcionan como factores de adhesión. Esta capacidad le permite a las BAL inhibir el establecimiento de patógenos intestinales a través de la exclusión competitiva y proteger al huésped contra infecciones (Cisek & Binek, 2014). Desde un enfoque de la salud pública, mejorar el estado sanitario de los pollos implicaría prevenir en parte la transmisión de patógenos durante el procesado de las carcasas, reduciendo así la contaminación de la carne y los posibles riesgos de ocurrencia de una ETA. En concordancia con los resultados obtenidos, los beneficios sobre la salud de los pollos fueron constatados por estudios preliminares realizados por Fernández *et al.*, (2015). Estos autores sin bien no hallaron diferencias en los parámetros productivos estudiados, demostraron que los animales alimentados con harina de chía presentaban mejores parámetros inmunológicos (mayor peso de la bolsa de Fabricio). Dichos resultados pueden tener una relación indirecta con el recuento de la población de BAL analizado en el presente estudio. Los efectos estarían correlacionados a la utilización de AGPI presentes en la harina de chía por las BAL intestinales, las cuales se recuperaron en las excretas en un mayor número en los tratamientos W3 y W3 + P. Esto último estaría indicando que la población de BAL se desarrolló eficientemente en el TGI de los pollos bajo estas condiciones. Por lo tanto, los estudios presentados sugieren que las BAL podrían aprovechar estos componentes mayoritarios en la harina de chía, para potenciar su desarrollo en el intestino y ejercer cambios en la salud de los animales alimentados con este aditivo. Respecto a esto, se ha comprobado que los AGPI, concretamente el ácido linolénico y el ácido linoleico, son sustratos de ciertas especies de BAL. Las mismas transforman estos AGPI en isómeros de ácidos grasos conjugados (AGC), de creciente importancia en los últimos años (Ogawa *et al.*, 2001; Fontes *et al.*, 2018). En este sentido, Kishino *et al.*, (2002) informan que estos AGC

pueden ser almacenados como ácidos grasos libres dentro de las células microbianas, las cuales pueden emplearse posteriormente como fuente energética para el huésped.

Los resultados obtenidos señalan que los AGPI de la harina chía podrían funcionar como promotores del crecimiento de BAL en el intestino de los pollos. La interacción entre dieta y microbiota del TGI, ha sido planteada por Bomba *et al.*, (2003) y Nemcova *et al.*, (2012) quienes observaron un incremento de poblaciones de lactobacilos en la mucosa yeyunal de cerdos alimentados con AGPI del tipo omega 3. En concordancia con los resultados presentados aquí, Mudroňová *et al.*, (2018) informaron altos recuentos de BAL en el intestino ciego de pollos broiler alimentados con dietas ricas en ácido linolénico. Por su parte, Seidavi & Simões (2015) establecieron que, si bien los recuentos de BAL no se modifican, el reemplazo del aceite de soja por el de pescado puede contribuir a preservar el equilibrio de la microbiota intestinal. En tanto, los estudios realizados en esta Tesis demuestran el importante rol de los AGPI en la microbiota específicamente en las BAL. Estos resultados sugieren que los efectos en el recuento microbiano serían adjudicados en parte a la presencia de AGPI, los cuales inducirían la proliferación de las BAL. Sin embargo, los mayores recuentos de BAL obtenidos en las excretas de pollos alimentados con harina de chía, contrastan con investigaciones que revelan una disminución del recuento de bacterias Gram positivas por efecto de los AGPI. Estos estudios sugieren que dichos ácidos presentes en la dieta, pueden alterar la fluidez de las membranas microbianas de las bacterias Gram positivas y disminuir la viabilidad (Henderson 1973; Jae Suk *et al.*, 2013).

Por otro lado, los mayores recuentos obtenidos de BAL en los tratamientos W3 y W3 + P podrían ser explicados por nutrientes específicos presentes en la harina de chía, que resultan favorables para este grupo bacteriano. Laurencio Silva *et al.*, (2008)

proponen que los microorganismos de la biota intestinal, difieren en cuanto al tipo de sustrato empleado y a las necesidades para su crecimiento, por lo que la composición química del alimento es un factor de relevancia en la estructura poblacional. En este contexto, es posible que la abundancia y distribución de BAL en el TGI de los pollos haya sido determinada por componentes dietarios resistentes al ataque de los fluidos digestivos. Así, las diferencias observadas en el recuento de BAL podrían atribuirse a la fibra soluble, mucílago o polisacárido no almidonoso (PNA) contenido en la harina de chía. Este mucílago presenta gran capacidad de retención de agua y aumenta la viscosidad del contenido luminal, el peristaltismo y la velocidad de tránsito intestinal (Capitani, 2013; Balanza, 2008). Al respecto, Snart *et al.*, (2006) hallaron que dietas ricas en nutrientes viscosos promovían el enriquecimiento de lactobacilos en el ciego de ratas. También se ha comprobado que algunas cepas de BAL pueden inhibir los efectos contraproducentes de factores antinutritivos en un proceso de predigestión. Entre estos sustratos se incluyen: ácido fólico, glucosinolatos, inhibidores tríplicos, lectinas y polisacáridos no amiláceos (fibra dietética) (Rodríguez Membibre, 1994). Por otra parte, las investigaciones realizadas por Bustos *et al.*, (2017) determinaron que las BAL pueden metabolizar la harina de chía produciendo cantidades significativas de ácidos orgánicos y compuestos fenólicos como el ácido clorogénico y el ácido ferúlico. Otros estudios avalan esta capacidad fermentativa de las BAL (Gautam & Sharma, 2014).

Como se ha mencionado la harina de chía es fuente de potentes antioxidantes (Marcinek & Krejpcio, 2017; García Salcedo *et al.*, 2018), por lo tanto, los resultados del presente estudio pueden ser correlacionados a esta característica nutricional de las dietas experimentales W3 y W3 + P. Tzounis *et al.*, (2008) demostraron que ciertos polifenoles podían ser metabolizados por grupos bacterianos comensales. Estos autores

hallaron que los flavanoles, catequina y epicatequina, incrementaban significativamente el número de especies de BAL. Por su parte, Khan *et al.*, (2018) informaron que diversos compuestos antioxidantes eran producidos por el metabolismo de las BAL. En tanto, los estudios realizados por Haddadin (2010), sugieren que los compuestos polifenólicos favorecen el crecimiento y actividad de *L. acidophilus*, una BAL presente en las heces de los pollos broiler (Lee *et al.*, 2008).

Una eficiente utilización de los compuestos presentes en la harina de chíá por parte de las BAL, explicaría el mayor recuento obtenido en los tratamientos que la contienen (W3 y W3 + P). Por lo tanto, la mayor disponibilidad de estos nutrientes aportados en la dieta, favorecería considerablemente el desarrollo de las BAL intestinales de los pollos broiler. En el presente estudio, los resultados obtenidos sugieren que las dietas de elevado nivel energético, no alteran las poblaciones de BAL sino más bien ejercen un efecto positivo en su densidad microbiana. Esto podría proveer mayor versatilidad en cuanto al manejo y formulación de las dietas en la cría de pollos, sin generar cambios contraproducentes en la microbiota intestinal.

Otro aspecto de importancia, es que las BAL aisladas de los correspondientes tratamientos son nativas y endógenas. Aquí, surge un especial interés en investigar si estas bacterias resultan útiles como agentes probióticos, ya que estos son la base de futuros estudios en la alimentación avícola (Díaz López *et al.*, 2017). En este aspecto, tendrían ciertas ventajas relacionadas al ambiente de origen. Esto estaría asociado a las actividades metabólicas propias que presentan las bacterias intestinales, entre las que se incluyen: fermentación de fibra dietaria no digestible, síntesis de vitaminas, biotransformación de ácidos biliares, entre otras (Cisek & Binek, 2014; Mosso *et al.*, 2018). Asimismo, la capacidad de degradación de moléculas indigestibles puede proveer beneficios en los animales hospederos, mejorando la digestión y la absorción de nutrientes.

Por otra parte, el menor recuento de BAL en el tratamiento con probiótico (P) respecto a las dietas ricas en AGPI (W3 y W3 + P), podría explicarse por la mayor capacidad competitiva de *B. subtilis* por los nutrientes disponibles en dietas que no contienen harina de chía. Bajo estas condiciones, la eficiente propagación y germinación de las esporas del probiótico en el ambiente intestinal, resultaría en un mayor aprovechamiento de los sustratos por parte de *B. subtilis* en comparación con las BAL. Sin embargo, como se mencionó, el recuento de BAL no se afectó por la presencia de *B. subtilis* cuando la harina de chía estaba presente en la dieta. Los estudios parecen evidenciar que el efecto sinérgico entre los AGPI de la dieta y las BAL en el intestino de los animales, se produce también en presencia del probiótico *B. subtilis*. Esto indicaría que el probiótico no compite tan eficientemente con las BAL en dietas ricas en AGPI. Lo mencionado posiblemente se asocie a la susceptibilidad de *B. subtilis* por este tipo de dieta en contraste con las BAL. Respecto a esto, los AGPI de la harina de chía estarían afectando la fluidez de la membrana de *B. subtilis* (Gram positiva), disminuyendo su capacidad de adhesión y supervivencia en el intestino. En particular, se ha observado que el aporte de AGPI en la dieta, inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas a través de la desestabilización de la membrana bacteriana, el desacople de la síntesis de ATP y la formación de ácidos grasos hidroperóxidos (Sheu & Freese, 1972; Jae Suk *et al.*, 2013). Por otro lado, el mucílago presente en la harina de chía, podría recubrir las paredes del intestino y producir una mayor velocidad de paso de la digesta, comprometiendo la germinación de la endospora y la adhesión de *B. subtilis* a la superficie intestinal (Capitani, 2013; Fernández *et al.*, 2015). Por lo tanto, estos factores serían considerados componentes antinutritivos para el crecimiento de *B. subtilis*, lo que contribuiría a explicar la ausencia de capacidad competitiva con las BAL en el tratamiento W3 + P. De acuerdo a esto, los resultados obtenidos sugieren que las

BAL presentan ciertos mecanismos de adaptación a los cambios del ambiente intestinal en comparación a *B. subtilis*. Esto reivindicaría la posibilidad de incluir BAL provenientes del mismo animal (nativas) en la dieta y/o de favorecer su proliferación intestinal a través de la suplementación con AGPI en el alimento balanceado.

Se conoce que *B. subtilis* produce una variedad de antibióticos (polipéptidos y principalmente lipopéptidos) que contribuyen a la exclusión de bacterias en el intestino (Grethel *et al.*, 2008). Esta capacidad junto a la formación de endosporas, le confiere a *B. subtilis* la ventaja de multiplicarse en el ambiente intestinal (Clements *et al.*, 2001). Respecto a esto, en los resultados obtenidos no se hallaron diferencias significativas en el recuento de BAL entre la condición control y el tratamiento P, por lo que en principio se descartaría una posible producción de sustancias antimicrobianas de *B. subtilis* con efectos adversos sobre las BAL. De cualquier manera, se demostró que la adición de *B. subtilis* por sí solo a la dieta, no logra aumentar los niveles de BAL en las excretas.

Las investigaciones realizadas aquí, sugieren que el manejo de incluir solo el probiótico *B. subtilis* a la dieta de los pollos, sería contraproducente para la microbiota de las BAL. En contrapartida, Sen *et al.*, (2012) y Zhang *et al.*, (2013) sostienen que el efecto de la adición de *B. subtilis* al alimento basal, es beneficioso para las comunidades microbianas que habitan naturalmente en el intestino del pollo. Dichos autores sugieren que el probiótico favorece la competitividad y potencia el desarrollo de la microbiota nativa. Otras investigaciones también exhiben resultados disímiles en cuanto a la administración de *B. subtilis* y la población de BAL. Según estos estudios, la aplicación de probióticos con *B. subtilis* en las dietas de los pollos, induce numerosas respuestas positivas en la salud del huésped al estabilizar la microbiota intestinal, reducir los microorganismos patógenos e incrementar la población de *Lactobacillus* spp. en el tubo digestivo (Grethel *et al.*, 2008). Por su parte, Anon (1998 b) y Cortés *et al.* (2000)

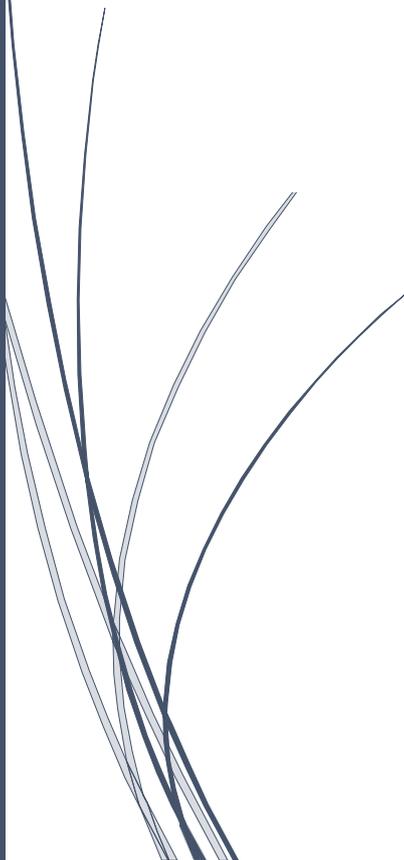
constatan que el empleo de endosporas viables de *Bacillus* spp. en el alimento, contribuye a una disminución de la acidez del intestino de las aves, promoviendo el crecimiento de especies de *Lactobacillus*. En concordancia, se ha observado que al suministrar *B. subtilis* en la dieta de los pollos, se produce un aumento en el número de BAL y una reducción en el de coliformes (Milián *et al.*, 2013). Similares efectos fueron observados por Teo & Tan (2007), Mountzouris *et al.*, (2010) y Hassan & Ryu (2012). Las discrepancias con los resultados obtenidos, podrían atribuirse presumiblemente a la composición de la dieta, la cual determinaría mejores o peores condiciones al desarrollo de *B. subtilis* y en consecuencia, afectaría en mayor o menor magnitud la abundancia de BAL en el intestino de los animales.

Los estudios realizados en esta Tesis, sugieren que el recuento de BAL en las excretas de los pollos, podría funcionar como un indicador indirecto de la salud de los animales y/o actuar como una variable que evalúa la respuesta de los microorganismos benéficos frente a cambios dietarios específicos.

Por último, se debe considerar que este estudio se realizó al final de la etapa de crianza de los pollos para revelar los cambios finales producidos en la microbiota intestinal. De esta manera, se sugiere que las recomendaciones en cuanto al manejo de la dieta, tendrían que establecerse en base al uso de aditivos, selección de métodos y/o combinaciones de ingredientes que resulten apropiados para favorecer las poblaciones de BAL en la microbiota endógena, sin provocar disturbios en la homeostasis del animal. Debido a que las investigaciones referidas al aislamiento de BAL en las excretas de pollos son escasas, los resultados presentados resultarán útiles para posteriores evaluaciones vinculadas a la salud animal y humana.

CAPÍTULO IV

**ACTIVIDAD ANTAGONISTA
DE BAL AISLADAS DE
EXCRETAS DE POLLO
SOBRE CEPAS DE
L. MONOCYTOGENES
PROCEDENTES DE LA
CARNE AVIAR**



CAPÍTULO IV: ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE BAL AISLADAS DE EXCRETAS DE POLLO SOBRE CEPAS DE *L. MONOCYTOGENES* PROCEDENTES DE LA CARNE AVIAR

1.1 Importancia de las BAL como antagonistas de patógenos presentes en alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen uno de los principales problemas para la salud pública. En este aspecto, los alimentos cárnicos son los principales vehículos de microorganismos indeseables, debido a un manejo higiénico deficiente durante su procesamiento y/o manipulación. Como se ha detallado en el Capítulo I, *L. monocytogenes* es una de las bacterias más importantes, presentando la mayor tasa de mortalidad en humanos dentro de los patógenos alimentarios (McMullen & Freitag, 2015). Debido a su capacidad de adaptación y a los mecanismos de sobrevivencia en condiciones subóptimas, esta bacteria es prevalente en las plantas de alimentos y se convierte en un foco silencioso de contaminación (Rivera & Vanegas, 2007).

La aparición y propagación de cepas potencialmente patógenas a través de los alimentos, ha conducido a la exploración de diversos compuestos antimicrobianos con relativa eficacia. Sin embargo, la demanda del sector consumidor particularmente en los últimos años, se ha inclinado hacia alimentos sin conservantes químicos o con niveles ínfimos de estos. Por este motivo, la industria alimentaria ha iniciado la búsqueda de nuevas alternativas basadas en el empleo de antimicrobianos naturales con el objeto de eliminar o inhibir la proliferación de potenciales patógenos causantes de ETA (Bedolla Bernal, 2004; Bertrand *et al.*, 2003). Entre las estrategias de control, los productos del metabolismo de las BAL han resultado tener el mayor impacto e interés, por presentar

efectos antagónicos sobre bacterias perjudiciales. En consecuencia, se han desarrollado diversas técnicas para aprovechar de manera efectiva este potencial antimicrobiano de las BAL (Parra, 2010).

Los fenómenos de antagonismo microbiano fueron evidenciados hace ya varios años. De hecho, una de las técnicas más antiguas utilizadas para aumentar la vida útil y el período de consumo de alimentos percederos, lo constituyen los procesos de transformación biológica basados en fermentaciones (McKay & Baldwin, 1990). En 1877, Louis Pasteur y Jules Joubert propusieron que las sustancias producidas por microorganismos podían tener un potencial uso terapéutico y el fenómeno de acción antagónica pasó a denominarse antibiosis. Este concepto engloba a todas aquellas asociaciones entre microorganismos en las que al menos uno de ellos se ve desfavorecido (Babel, 1977).

Las capacidades fisiológicas necesarias para la multiplicación bacteriana en un alimento, se restringen a unas pocas especies que soportan las condiciones a las que estos son sometidos. La mayoría de las BAL pueden proliferar en estas circunstancias compitiendo con especies patógenas o determinando su inhibición. El antagonismo de BAL se basa en la generación de productos metabólicos de distinta naturaleza que ejercen su bioactividad a través de mecanismos específicos e inespecíficos (Early 2000; Duboc & Mollet, 2001). Sin embargo, la competencia por sustratos esenciales, producción de enzimas bacteriolíticas, acumulación de D-aminoácidos, descenso del potencial óxido- reducción y la coagregación, también contribuyen a las estrategias de sobrevivencia llevadas a cabo por las BAL (Castellano *et al.*, 2008).

La identificación de sustancias antimicrobianas en la producción de derivados lácteos, condujo al descubrimiento de moléculas de naturaleza proteica denominadas bacteriocinas, lo que originó posteriormente el desarrollo de nuevas aplicaciones y

herramientas en la industria alimentaria (Heredia Castro *et al.*, 2017). Uno de los primeros reportes de antagonismo por este tipo de moléculas ha sido el de Rogers (1928) quien demostró que un cultivo iniciador de *Streptococcus lactis* era efectivo para producir nisina. La aplicación de estas moléculas de origen microbiano se ha vislumbrado no solo en la bioconservación de los alimentos, sino también en diversas áreas de investigación dentro de la medicina y el saneamiento ambiental (de la Fuente Salcido & Barboza Corona, 2010).

1.2 Sustancias antimicrobianas producidas por las BAL

Además de inferir en las características reológicas y sensoriales de ciertos alimentos, el empleo de BAL en la industria alimentaria se debe a que varios de sus metabolitos se consideran seguros para el consumo humano y en consecuencia son clasificados como GRAS. Como se mencionó, estas sustancias cumplen un importante rol principalmente como preservantes de alimentos al inhibir la proliferación de bacterias alterantes o patógenas, aunque también pueden ser empleadas como desinfectantes naturales de superficies (Nahuelquín, 2008). A continuación, se describen las principales moléculas producidas por las BAL que presentan mayor relevancia en este aspecto.

1.2.1 Ácidos orgánicos

El factor primario en que se basa la actividad antimicrobiana de las BAL es la gran capacidad de producción de ácidos (principalmente láctico y acético) a partir de la fermentación de carbohidratos. Esto ocasiona un descenso del pH en el medio circundante que inhibe el crecimiento de un gran número de microorganismos, exceptuando aquellos que poseen tolerancia a este ambiente como las levaduras, los hongos y las propias BAL. El mecanismo de acidificación adquiere especial

importancia en alimentos no procesados, ya que estos por lo general presentan una alta actividad agua y una concentración de nutrientes favorables a la proliferación de bacterias indeseables (Daeschel, 1998).

En su forma no disociada, los ácidos pueden difundir pasivamente a través de la membrana plasmática, disminuir el pH del interior de la célula (acidificación del citoplasma) y alterar las funciones claves del metabolismo celular. Entre los mecanismos de acción de los ácidos se incluyen: el colapso del gradiente de protones (potencial electroquímico), la pérdida de la permeabilidad de la membrana celular y la interferencia en los sistemas de transporte de sustrato (Ammor *et al.*, 2006).

1.2.2 Otros metabolitos

El efecto inhibitorio de las BAL también se produce por la actividad de metabolitos inespecíficos que son sintetizados en menor cantidad. Entre estos se encuentran derivados del metabolismo del oxígeno (O₂) como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radicales superóxidos (O⁻²) y oxhidrilos (OH⁻). Otras moléculas incluyen al dióxido de carbono (CO₂), compuestos aromáticos (diacetilo y acetaldehído), derivados deshidratados del glicerol (reuterina) y benzoato (Lindgren & Dobrogosz, 1990; Piard & Desmazeaud, 1991; Piard & Desmazeaud, 1992; Rodríguez, 2002; O'Bryan *et al.*, 2015a).

Particularmente, el H₂O₂ es un metabolito con propiedades altamente oxidantes y debido a que las BAL no presentan la enzima catalasa, se acumula en el medio de crecimiento (Daeschel, 1998). La formación de este compuesto se lleva a cabo en presencia de O₂ por diferentes reacciones enzimáticas de óxido-reducción catalizadas por la α -glicerofostato oxidasa (en *Lactobacillus* spp.) o la NADH oxidasa (en *Lactococcus* spp.) (Mital & Satyendra, 1995; Macedo *et al.*, 2002). Posteriormente, los

radicales libres producen la peroxidación de lípidos de membrana y la destrucción de la estructura de proteínas, causando efectos citotóxicos sobre microorganismos susceptibles (Mital & Satyendra, 1995; Ouwehand, 1998).

Por otra parte, el diacetilo es producido por la mayoría de BAL a través de la fermentación del citrato. Este metabolito inactiva enzimas microbianas mediante modificación o bloqueo de la región catalítica (Requena & Pelaez, 1995; O’Keeffe & Hill, 2000) y posee función antagónica contra bacterias Gram negativas por interferencia en la utilización de arginina (Daeschel, 1998).

1.2.3 Bacteriocinas

Estas moléculas antimicrobianas son péptidos de síntesis ribosomal producto del metabolismo secundario de varias especies de BAL. Debido a su efectividad, especificidad e inocuidad son los metabolitos de mayor interés en la industria alimentaria (Siamansouri *et al.*, 2013). Si bien algunas bacteriocinas pueden acomplejarse con lípidos o carbohidratos, su parte proteica es un componente clave para ejercer la función biológica (Medina *et al.*, 1992). Estos compuestos presentan variabilidad en cuanto al espectro de actividad antimicrobiana, peso molecular, origen genético y estructura química. Además, cada bacteriocina presenta un mecanismo de acción específico (Abee *et al.*, 1995).

El control de las bacteriocinas de BAL se restringe a microorganismos Gram positivos ya que los Gram negativos presentan menor susceptibilidad (Medina *et al.*, 1992). Se ha establecido que estos péptidos tienen una implicancia directa en la inhibición de microorganismos patógenos y/o alterantes de los alimentos (O’Sullivan *et al.*, 2002).

1.2.3.1 Clasificación de las bacteriocinas

Las bacteriocinas de BAL han sido clasificadas de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas y acción biológica, distinguiéndose en la actualidad cuatro grupos (Chen & Hoover, 2003; Beshkova & Frengova, 2012).

A) Clase I (Lantibióticos)

En esta clase se incluyen péptidos pequeños que sufren modificaciones postraduccionales y son sensibles al calor, aunque algunos presentan resistencia a los tratamientos térmicos (Riley & Wertz, 2002a; Kemperman *et al.*, 2003; Heredia Castro *et al.*, 2017). Las moléculas están formadas por aminoácidos poco comunes como lantionina, β -metil-lantionina, dehidroalanina y dehidrobutirina (Mondragón Preciado *et al.*, 2013).

Los lantibióticos se unen a la pared celular mediante interacciones electrostáticas y luego provocan poros en la membrana celular alterando su permeabilidad (Devlieghere *et al.*, 2004). La muerte del microorganismo se produce por la pérdida de iones potasio, aminoácidos y caída del potencial electroquímico que reduce la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (McAuliffe *et al.*, 2001).

La bacteriocina más representativa de este grupo es la nisina, producida por *Lactococcus lactis* la cual es una importante inhibidora de *L. monocytogenes*. Esta molécula presenta autorización para su uso en alimentos y es empleada a nivel comercial en varios países (Chen & Hoover, 2003).

B) Clase II

Este grupo está conformado por moléculas anfipáticas lineales sin aminoácidos modificados que presentan estabilidad al calor y al pH (Beshkova & Frengova, 2012). Las bacteriocinas de la clase II actúan uniéndose a receptores de las células blanco, por lo que desestabilizan la membrana plasmática conduciendo a su despolarización (Hu *et al.*, 2006). La clase se divide en cinco subclases (IIa, IIb, IIc, IId y IIe) de acuerdo a sus características estructurales y propiedades bioactivas (Heredia Castro *et al.*, 2017). Dentro de la clase IIa se encuentra la pediocina PA-1 y la sakacina P que poseen una importante actividad antimicrobiana contra *Listeria* spp. (Mondragón Preciado *et al.*, 2013). Estas bacteriocinas son la más estudiadas por sus aplicaciones potenciales en alimentos (Zouhir *et al.*, 2010). Particularmente la pediocina es sintetizada por las BAL del género *Pediococcus* (Naidu *et al.*, 2006).

C) Clase III

Este grupo incluye moléculas termolábiles de alto peso molecular (>30 kDa) denominadas “bacteriolisinas” (Abriouel *et al.*, 2011). Las moléculas más representativas son la helveticina J producida por *Lactobacillus helveticus* y la enterocina producida *Enterococcus faecium* (Naidu *et al.*, 2006). Estas, actúan directamente sobre la pared celular de las bacterias Gram positivas conduciendo a la muerte por lisis celular (Cotter *et al.*, 2005).

D) Clase IV

Las bacteriocinas de esta clase son péptidos grandes y complejos cuya parte proteica se asocia a glúcidos (glicoproteínas) o a lípidos (lipoproteínas) (Kemperman *et al.*, 2003).

1.2.3.2 Empleo de bacteriocinas en la industria alimentaria

Las bacteriocinas son una alternativa al uso de conservantes químicos y pueden funcionar solas o en combinación con otros métodos en la biopreservación de los alimentos (Cintas *et al.*, 2001). Su potencial beneficio se ha extendido en carnes, productos lácteos, alimentos enlatados, pescado, bebidas, ensaladas, huevo, productos de panificación, vegetales, alimentos fermentados, entre otros (Naidu *et al.*, 2006; de la Fuente Salcido & Barboza Corona, 2010). Las bacteriocinas pueden formularse como ingredientes bioactivos en polvo o ser adicionadas a los alimentos directamente de forma purificada o semipurificada (Cleveland *et al.*, 2001). Entre los métodos de aplicación de estos péptidos se incluyen la aspersion o su empleo como componentes de envases bioactivos (Blanco Massani *et al.*, 2007). Se ha destacado la efectividad de preparados a base de BAL en forma líquida sobre superficies de trabajo y equipos, y mediante cápsulas en desagües y otros lugares de difícil acceso (Nahuelquín, 2008).

El desempeño de estas sustancias en el control microbiano sobre los alimentos, depende entre otros factores, de la estabilidad química que presenten en la matriz del mismo. De todas formas, su manejo está condicionado por criterios de regulación que deben ser considerados para su empleo en los productos alimenticios (O’Keeffe & Hill, 2000; Gautam & Sharma, 2009). Así, las bacteriocinas a emplear deben cumplir con los siguientes requerimientos:

- Ser reconocidas y aceptadas por una autoridad reguladora
- Ser viables económicamente
- Resistir las condiciones de almacenaje y/o procesado del alimento
- Poseer actividad antimicrobiana a bajas concentraciones

- Presentar un espectro de inhibición contra microorganismos patógenos o tener actividad contra uno en particular
- Mejorar la seguridad en los productos donde se adiciona
- No afectar las características organolépticas propias del producto
- No ser tóxicas para el consumidor

Dentro de las bacteriocinas comerciales utilizadas como biopreservantes se incluyen la nisina y la pediocina. La nisina fue la primera bacteriocina reconocida y aprobada por la FAO/WHO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/ Organización Mundial de la Salud) para su utilización en la industria alimentaria. Posteriormente la FDA (*Food and Drug Administration*) la certificó como aditivo, estableciéndola en el Código Federal de Regulaciones (CFR). Esta bacteriocina se permite en productos enlatados para controlar el crecimiento de termófilos esporulados (Delves Broughton, 2005). También se utiliza en quesos fermentados para la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* en procesos de pasteurización, fijando un límite máximo de 250 ppm en el producto terminado (FDA, 2017).

Particularmente, la aplicación de nisina se destaca en productos cárnicos donde a una concentración de 400 UI/gr a 800 UI/gr o en combinación con 2 % p/v de NaCl logra inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* satisfactoriamente. Sin embargo, la acción bacteriostática de esta molécula se reduce al bajar la temperatura de refrigeración. De forma específica, la enterocinas A y B se han empleado en pechuga de pollo presentando un efecto antilisteria elevado. Al mismo efecto, la pediocina y la leucocina resultan igualmente efectivas (de la Fuente Salcido & Barboza Corona, 2010).

La actividad antagonica que ejerce la pediocina en *L. monocytogenes* la convierte en un péptido con potencial aplicación en los alimentos. Por ese motivo se han registrado varias patentes europeas y norteamericanas para su empleo como bioconservante (Chen & Hoover, 2003; Ekbal *et al.*, 2012). Asimismo, en los tratamientos de sanitización se demostró que la acción conjunta de diversas bacteriocinas puede presentar un efecto sinérgico para inhibir patógenos y este efecto se podría potenciar en combinación con métodos físicos o químicos (de la Fuente Salcido & Barboza Corona, 2010).

Por su parte, existen factores que influyen en la síntesis y actividad de las bacteriocinas en condiciones *in vitro*. Entre estos se destacan la composición y el pH del medio de cultivo, como así también la fase de crecimiento de la bacteria que las produce. Sin embargo, para que la producción de bacteriocinas tenga lugar, es necesario que las BAL dispongan de un medio de crecimiento enriquecido con carbohidratos, minerales e hidrolizados proteicos, principalmente aminoácidos. Por lo general, la producción máxima de péptidos antimicrobianos ocurre naturalmente durante y al final de la fase logarítmica del desarrollo bacteriano (Vásquez *et al.*, 2009). En tanto, una incubación extensa de las BAL en el medio de cultivo, puede dar lugar a la pérdida de actividad de la bacteriocina en cuestión. Esto es debido a eventos de proteólisis o a la acumulación de ácidos generados durante las fases finales del crecimiento (Medina *et al.*, 1992).

2. HIPÓTESIS

Como se evidenció en el Capítulo I, *L. monocytogenes* está presente en la carne cruda de pollo como consecuencia de la contaminación cruzada de las carcasas. En tanto, en el capítulo anterior fue posible determinar que las excretas podían ser fuente de BAL. En base a estos criterios y considerando la importancia que representan algunos metabolitos producidos por las BAL en el control de patógenos, en esta sección se planteó la siguiente hipótesis:

- Las BAL aisladas, provenientes de las excretas de pollos broiler, son capaces de producir sustancias (tipo bacteriocinas) que resultan antagonistas contra las cepas de *L. monocytogenes* contaminantes de la carne de pollo.

3. OBJETIVOS

Debido a que no existen estudios del empleo de BAL nativas en el control de aislamientos de *L. monocytogenes* contaminantes de la carne de pollo, se propusieron los siguientes objetivos:

- Determinar si las BAL nativas obtenidas de las excretas de pollos producen sustancias con capacidad antagonista sobre las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de la carne aviar.
- Evaluar el antagonismo de los sobrenadantes de BAL según la efectividad y el grado de inhibición que presenten sobre las cepas de *L. monocytogenes* en estudio.
- Analizar si existe variabilidad en el antagonismo dentro de las cepas de *L. monocytogenes* que resulten inhibidas.

4. METODOLOGÍA

Los ensayos realizados en este capítulo consistieron en determinar la actividad biológica de los sobrenadantes de BAL (antagonismo) provenientes de las excretas (Capítulo III) sobre las 13 cepas de *L. monocytogenes* aisladas en la carne de pollo (Capítulo I).

4.1 Obtención de los sobrenadantes de BAL

Las 15 cepas de BAL correspondientes a cada tratamiento (C; W3; P; W + P) se incubaron en Caldo MRS a 33 °C durante 48 horas. Luego del período de incubación, los cultivos se homogenizaron y se ajustaron a una concentración de 2 en la escala McFarland *Standard* (Biomérieux) correspondiente a 6×10^8 UFC/mL. Estos cultivos se centrifugaron a 7000 r.p.m a 4 °C durante 30 min para obtener los sobrenadantes libres de células (SLC). Posteriormente, los SLC se colocaron en tubos estériles con micropipeta y se midió el pH (Figura 13). Los sobrenadantes crudos se trataron con NaOH 0,5 N hasta alcanzar la neutralidad y una vez neutralizados se sometieron a una temperatura de 100 °C durante 5 minutos (Floriano *et al.*, 1998; Marguet *et al.*, 2011).



Figura 13. Sobrenadantes libres de células (SLC) obtenidos de BAL cultivadas en Caldo MRS.

4.2 Reactivación de cepas de *L. monocytogenes*

Las 13 cepas de *L. monocytogenes* identificadas fenotípicamente (Capítulo I y II) se incubaron en Caldo FRASER a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, los cultivos se ajustaron a una concentración de 2 en la escala McFarland *Standard* (Biomérieux) y se emplearon en el ensayo de antagonismo. Las actividades se realizaron dentro de una Cabina de Seguridad Biológica Clase II.

4.3 Prueba de antagonismo

El ensayo de antagonismo se realizó por el método de difusión en placa (Floriano *et al.*, 1998; Yaakoubi *et al.*, 2009) empleando el Agar Mueller Hinton (AMH) (Anexo 1.18), medio indicado en pruebas de sensibilidad. Para desarrollar el procedimiento, las cajas de Petri conteniendo AMH, se sembraron con 200 µL de inóculo de cada cultivo de *L. monocytogenes* (punto 4.2). El cultivo se diseminó en el medio con una espátula de Drigalsky estéril para lograr una distribución homogénea. A continuación, las cajas se colocaron en posición inclinada cubiertas parcialmente dentro del flujo laminar durante 10 minutos. Posteriormente, empleando sacabocados metálicos estériles, se practicaron 6 pocillos de 10 mm de diámetro y 2 mm de profundidad sobre el medio agarificado de cada caja. En 5 pocillos se depositaron 20 µL de sobrenadante del aislamiento a evaluar (punto 4.1). El pocillo restante se llenó con Caldo MRS sin inocular para descartar una posible actividad inhibitoria del medio. Finalmente, las placas se mantuvieron a 4 °C durante 2 horas para permitir la difusión de los sobrenadantes en el agar y luego se incubaron en estufa a 37 °C durante 48 horas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

La observación de un halo de inhibición sobre el cultivo de *L. monocytogenes* se consideró positiva para antagonismo. El halo se midió en milímetros (mm) con un

calibre tipo Vernier desde el perímetro de cada pocillo. La efectividad del antagonismo de los sobrenadantes evaluados de cada BAL se estableció de acuerdo al espectro de control ejercido sobre las cepas de *L. monocytogenes* (% de cepas inhibidas). Para el grado de inhibición, se utilizó una escala arbitraria que permitió clasificar los SLC según la actividad antagónica presente: alta (halo mayor a 2 mm), media (halo entre 1,45 mm y 2 mm) o leve (halo menor a 1,45 mm). Complementariamente a este criterio, se estudió la variabilidad en el antagonismo de las cepas que resultaron inhibidas.

4.4 Análisis estadístico.

La evaluación de los datos se realizó mediante el Análisis de la Varianza (ANOVA) (nivel de confianza del 95 %) utilizando el programa estadístico estándar *InfoStat System* (Córdoba, Argentina) (Di Rienzo *et al.*, 2013). Las medias de cada tratamiento fueron separadas mediante la prueba de comparación múltiple de Fisher (test de diferencias mínimas significativas (DMS)).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Rol de los sobrenadantes de BAL nativas en el antagonismo de las cepas de *L. monocytogenes* provenientes de la carne de pollo

Los resultados evidenciaron que del total de SLC ensayados, solo algunos presentaron capacidad inhibitoria sobre las 13 cepas de *L. monocytogenes* en estudio (Figura 14). El halo de inhibición se manifestó como una zona clara alrededor de cada pocillo. Los SLC que fueron mejores antagonistas, mostraron un halo de inhibición bien marcado debido al contraste con la zona de crecimiento de la bacteria. En tanto, este contraste fue difuso con los SLC de menor antagonismo, donde se observó un halo de inhibición más estrecho. De 15 SLC evaluados en cada tratamiento, solamente 3 de la condición control (20 %), 9 del tratamiento W3 (60 %), 2 del tratamiento P (13,33 %) y 3 del tratamiento W3 + P (20 %), presentaron antagonismo en al menos una de las cepas de *L. monocytogenes*.

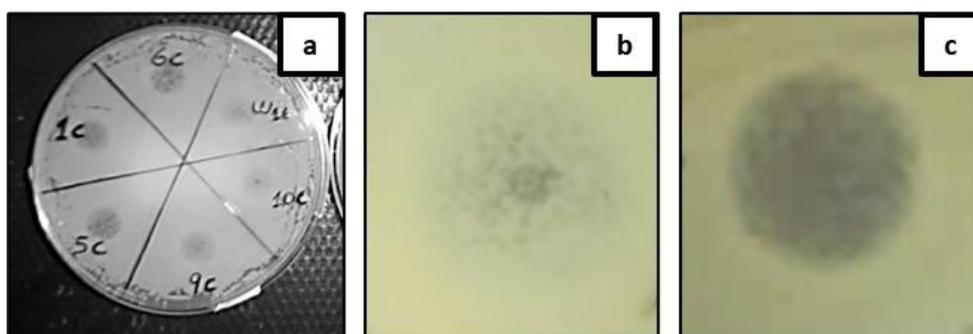


Figura 14. Capacidad de inhibición de los SLC. a) Prueba de antagonismo b) Sin halo de inhibición c) Con halo de inhibición.

Los resultados obtenidos respecto a la actividad inhibitoria de los SLC, posiblemente se deban a diferencias en el metabolismo de las BAL analizadas. En todos los SLC, el valor del pH del medio de cultivo fue menor que antes de iniciar la incubación de las BAL, lo que indicó que todas las cepas fueron capaces de producir ácidos orgánicos en las condiciones ensayadas. Sin embargo, debido a que los productos ácidos fueron posteriormente neutralizados en los SLC, el antagonismo observado sugirió la presencia de sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica tipo bacteriocina. Este efecto resaltó la capacidad de las BAL provenientes de las excretas, para producir moléculas inhibitorias sobre las cepas de *L. monocytogenes* contaminantes de la carne de pollo. Por otra parte, el tratamiento térmico de los SLC luego de la neutralización, demostró la estabilidad del principio activo en los SLC que presentaron actividad antilisteria. Debido a que la capacidad antimicrobiana no se alteró en las condiciones impuestas, los resultados indican que las moléculas involucradas en este efecto son termoestables. Como se mencionó en la Introducción, la estabilidad térmica de moléculas con actividad específica contra *L. monocytogenes*, se asocia a péptidos de bajo peso molecular y es característica del grupo de bacteriocinas clase IIa (Chen & Hoover, 2003; Mokoena, 2017). Los resultados obtenidos concuerdan con los estudios realizados por Marguet *et al.*, (2011), quienes demostraron que la actividad antilisteria de BAL no se modificaba cuando los SLC eran neutralizados y tratados térmicamente. Por otra parte, se ha observado que la sensibilidad a la temperatura depende del estado de purificación de la bacteriocina, siendo la estabilidad térmica decreciente en bacteriocinas que han sido total o parcialmente purificadas (Cintas *et al.*, 2001). Una excepción lo constituiría la nisina (clase lantibióticos) que en forma pura puede permanecer activa hasta después de un calentamiento a 100 °C

durante 10 min y en condiciones extremadamente ácidas (Medina *et al.*, 1992; Cintas *et al.*, 2001). Respecto a esto, si bien en el presente Trabajo no se han purificado las sustancias provenientes de las BAL, se sugiere que los SLC que exhibieron actividad inhibitoria contra las cepas de *L. monocytogenes*, podrían contener algún tipo de molécula estructuralmente similar a la nisina o a la pediocina, ya que estas moléculas presentan una comprobada efectividad contra *Listeria* spp. y son estables a altas temperaturas (Heredia Castro *et al.*, 2017). La característica de termorresistencia de algunas de las bacteriocinas, parece estar relacionada con péptidos pequeños que carecen de estructura terciaria, a diferencia de las bacteriocinas termolábiles que poseen mayor peso molecular y probablemente una estructura molecular más compleja (Piard & Desmazeaud, 1992). De todas formas, no se descartaría que otras sustancias de naturaleza peptídica distintas a las mencionadas, hayan participado en la acción inhibitoria contra las cepas de *L. monocytogenes* ensayadas. En este aspecto, Zhu *et al.*, (2014) resaltan que los lactobacilos pueden producir metabolitos antilisteria de fuerte estabilidad al calor y al pH. Por otro lado, se ha demostrado que algunos extractos bioactivos de *Lactobacillus* spp. presentan resistencia al calentamiento, propiedad sumamente importante para asegurar el control de microorganismos cuando los alimentos se someten a ciertos procesos de la industria alimentaria (Piard & Desmazeaud, 1992; Gutiérrez *et al.*, 2005).

5.2 Efecto antagónico de los SLC según las BAL aisladas en los distintos tratamientos

Como se mencionó en la Metodología (MT), el antagonismo de los SLC se estableció en base a la efectividad (% de cepas inhibidas) y al grado de inhibición o actividad antagónica exhibida (alta-media-leve). Posteriormente, se analizó el nivel

de variabilidad de los SLC de acuerdo al antagonismo ejercido sobre las cepas de *L. monocytogenes* (B7, C5, G1, G7, GG5, HH5, L5, N7, R7, U1, V7, W1 y Z1) (Anexo 4). A continuación, se describen los resultados obtenidos en cada caso.

5.2.1 SLC obtenidos de las BAL provenientes de la condición control

Los SLC con capacidad antagonista de este grupo se identificaron como: 4C, 16C y 20C (Anexo 4.1). El SLC 4C presentó un 38 % de efectividad sobre las 13 cepas de *L. monocytogenes* analizadas. El espectro de control involucró a las cepas Z1, HH5, R7, V7, U1 y L5 con diferentes grados de inhibición (Figura 15). Este SLC ejerció una actividad antagónica media sobre Z1, HH5 y R7 y leve sobre V7, U1 y L5 de acuerdo a la escala descrita en MT.

Se observó variabilidad en la medida de los halos de inhibición. Los halos presentes en Z1 ($1,48 \text{ mm} \pm 0,076$), HH5 ($1,47 \text{ mm} \pm 0,09$), R7 ($1,45 \text{ mm} \pm 0,105$) y V7 ($1,38 \text{ mm} \pm 0,029$) difirieron significativamente del observado en L5 ($1,23 \text{ mm} \pm 0,068$) que fue el de menor calibre. A su vez, el halo de inhibición sobre U1 ($1,34 \text{ mm} \pm 0,036$) presentó diferencias solo con el de Z1.

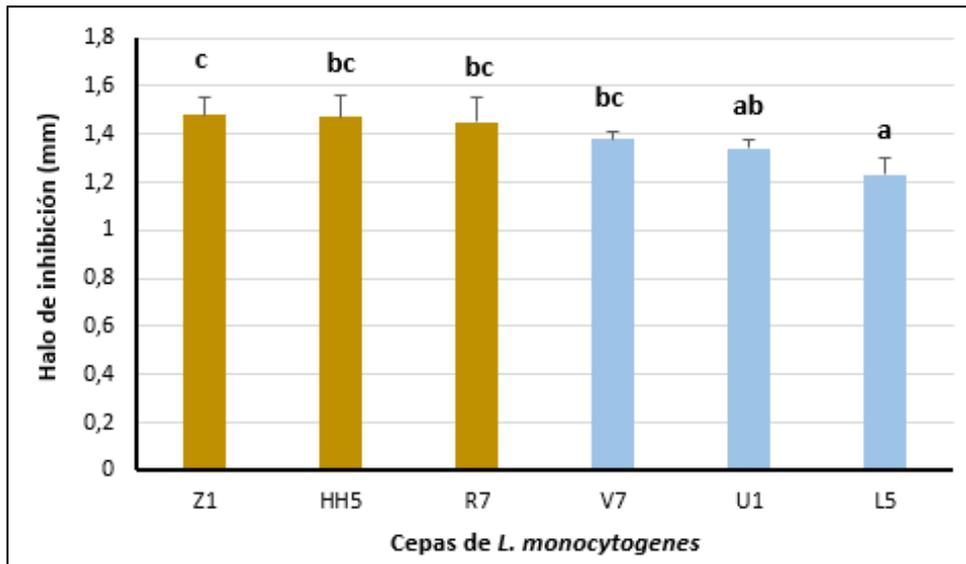


Figura 15. Antagonismo del SLC 4C en distintas cepas de *L. monocytogenes*. Los halos de inhibición (mm) se expresan como promedio \pm SD de tres repeticiones. Cepas con la misma letra (extremo superior de la barra) no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$). La actividad antagónica se clasificó según la siguiente escala: alta (halo mayor a 2 mm), media (halo entre 1,45 mm y 2 mm) o leve (halo menor a 1,45 mm). Esta actividad fue media en Z1, HH5 y R7 (barras color oro) y leve sobre V7, U1 y L5 (barras color azul).

El SLC 16C presentó un 69 % de efectividad sobre las 13 cepas de *L. monocytogenes* analizadas. El espectro de control involucró a las cepas R7, HH5, Z1, V7, U1, L5, W1, G1 y B7 con diferentes grados de inhibición (Figura 16). Este SLC ejerció una actividad antagónica alta sobre R7, HH5 y Z1, media sobre V7 y U1 y leve sobre L5, W1, G1 y B7 de acuerdo a la escala descrita en MT. Se observó variabilidad en el calibre de los halos de inhibición. Los halos de inhibición en R7 ($2,47 \text{ mm} \pm 0,102$) y HH5 ($2,35 \text{ mm} \pm 0,055$) difirieron significativamente del resto. Por su parte, las cepas V7 ($1,62 \text{ mm} \pm 0,091$) y U1 ($1,6 \text{ mm} \pm 0,095$) no presentaron diferencias entre ellas respecto a este parámetro al igual que L5 ($1,41 \text{ mm} \pm 0,09$), W1 ($1,4 \text{ mm} \pm 0,045$) y G1 ($1,36 \text{ mm} \pm 0,06$). En tanto el halo de inhibición observado en B7 ($1,16 \text{ mm} \pm 0,053$), fue el menor respecto a los demás.

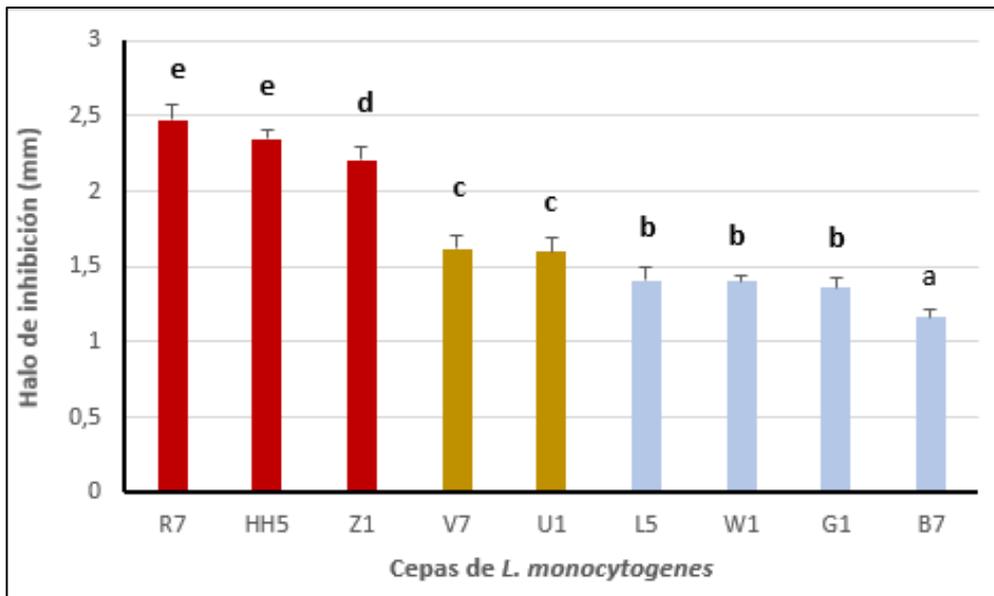


Figura 16. Antagonismo del SLC 16C en distintas cepas de *L. monocytogenes*. Los halos de inhibición (mm) se expresan como promedio \pm SD de tres repeticiones. Cepas con la misma letra (extremo superior de la barra) no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$). La actividad antagonica se clasificó según la siguiente escala: alta (halo mayor a 2 mm), media (halo entre 1,45 mm y 2 mm) o leve (halo menor a 1,45 mm). Esta actividad fue alta en R7, HH5 y Z1 (barras color rojo), media en V7 y U1 (barras color oro) y leve sobre L5, W1, G1 y B7 (barras color azul).

El SLC 20C presentó un 54 % de efectividad sobre las 13 cepas de *L. monocytogenes* evaluadas. El espectro de control involucró a las cepas G1, Z1, C5, L5, U1, V7 y W1 con diferentes grados de inhibición (Figura 17). Este SLC ejerció una actividad antagonica media sobre todas las cepas mencionadas, excepto en W1 donde el grado de inhibición fue leve según la escala descrita en MT. Se observó variabilidad en la medida de los halos de inhibición. El halo de inhibición presente en G1 ($1,81 \text{ mm} \pm 0,06$) difirió significativamente del resto, aunque fue similar al observado en la cepa Z1 ($1,72 \text{ mm} \pm 0,104$). En tanto, los halos observados en C5 ($1,62 \text{ mm} \pm 0,076$), L5 ($1,53 \text{ mm} \pm 0,07$) y U1 ($1,51 \text{ mm} \pm 0,075$) no difirieron entre sí, al igual que los de V7 ($1,46 \text{ mm} \pm 0,093$) y W1 ($1,33 \text{ mm} \pm 0,064$).

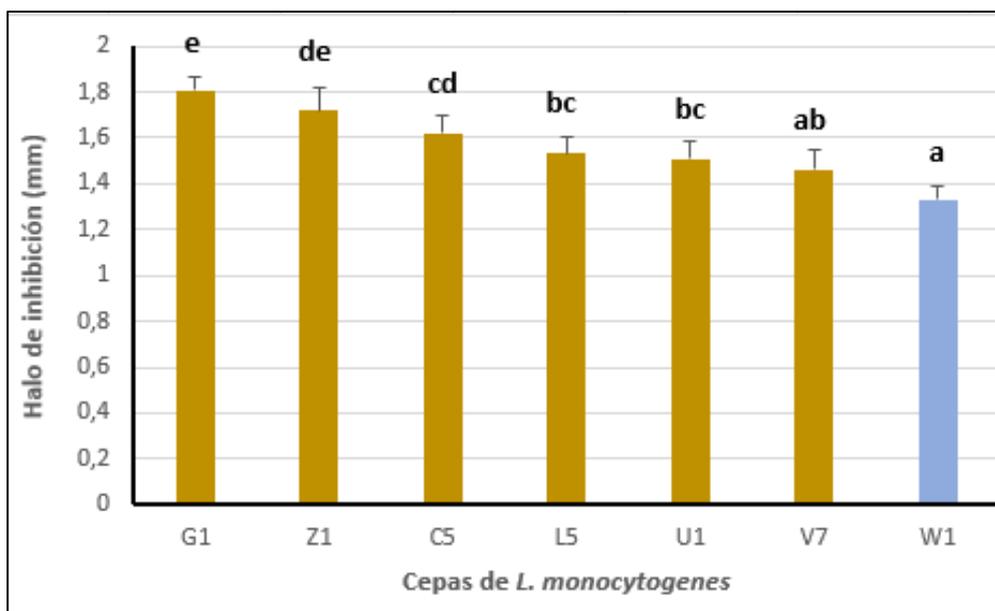


Figura 17. Antagonismo del SLC 20C en distintas cepas de *L. monocytogenes*. Los halos de inhibición (mm) se expresan como promedio \pm SD de tres repeticiones. Cepas con la misma letra (extremo superior de la barra) no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$). La actividad antagonista se clasificó según la siguiente escala: alta (halo mayor a 2 mm), media (halo entre 1,45 mm y 2 mm) o leve (halo menor a 1,45 mm). Esta actividad fue media en G1, Z1, C5, L5, U1 y V7 (barras color oro) y leve sobre W1 (barra color azul).

5.2.2 SLC obtenidos de las BAL provenientes del tratamiento W3

Los SLC con capacidad antagonista de este grupo se identificaron como: O1, O2, O4, O5 y O6, O8, O9, O10 y O11 (Anexo 4.2). El SLC O1 presentó un 46 % de efectividad sobre las 13 cepas de *L. monocytogenes* evaluadas. El espectro de control involucró a las cepas W1, U1, V7, Z1, G1 y L5 con diferentes grados de inhibición (Figura 18). Este SLC ejerció una actividad antagonista alta sobre W1, media sobre U1, V7 y Z1 y leve sobre G1 y L5 de acuerdo a la escala descrita en MT. Se observó variabilidad en el tamaño de los halos de inhibición. Los halos observados tanto en W1 ($2,1 \text{ mm} \pm 0,1$) como en Z1 ($1,54 \text{ mm} \pm 0,04$) difirieron significativamente del resto. Por su parte, los halos de inhibición correspondientes a U1 ($1,76 \text{ mm} \pm 0,096$) y V7 ($1,75 \text{ mm} \pm 0,061$) no presentaron diferencias significativas entre sí al igual que los obtenidos en G1 ($1,33$

mm \pm 0,065) y L5 (1,27 mm \pm 0,067).

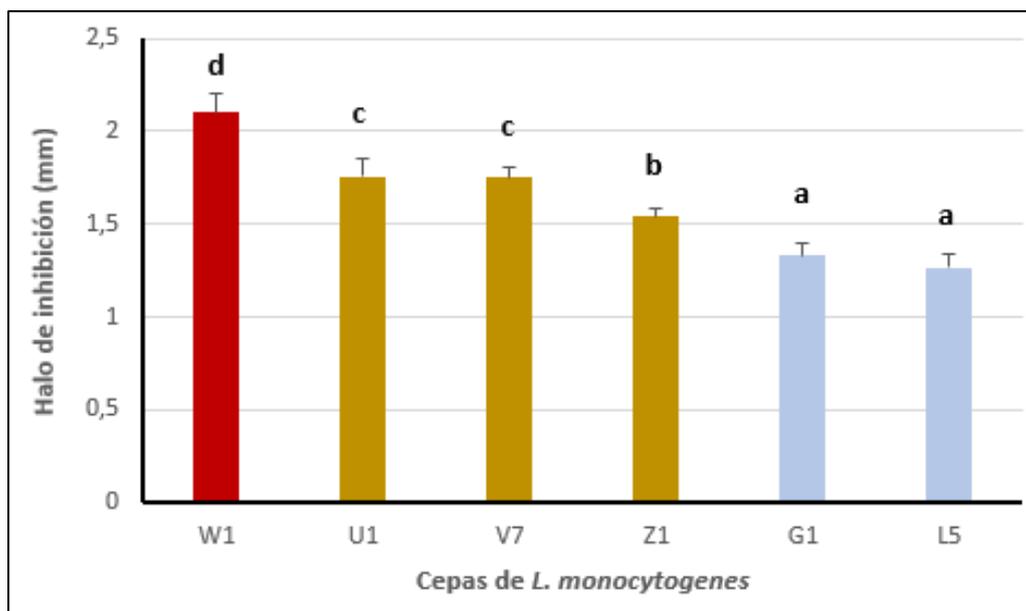


Figura 18. Antagonismo del SLC O1 en distintas cepas de *L. monocytogenes*. Los halos de inhibición (mm) se expresan como promedio \pm SD de tres repeticiones. Cepas con la misma letra (extremo superior de la barra) no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$). La actividad antagonista se clasificó según la siguiente escala: alta (halo mayor a 2 mm), media (halo entre 1,45 mm y 2 mm) o leve (halo menor a 1,45 mm). Esta actividad fue alta en W1 (barra color rojo), media en U1, V7 y Z1 (barras color oro) y leve sobre G1 y L5 (barras color azul).

El SLC O2 presentó un 31 % de efectividad sobre las 13 cepas de *L. monocytogenes* testeadas. El espectro de control involucró a las cepas L5, G1, U1 y W1 con diferentes grados de inhibición (Figura 19). Este SLC ejerció una actividad antagonista alta en L5 y G1 y media sobre U1 y W1 según la escala descrita en MT. Se observó variabilidad en los halos de inhibición correspondientes a cada cepa con diferencias significativas entre sí. El mayor antagonismo se observó en L5 (2,53 mm \pm 0,12), seguido por G1 (2,13 mm \pm 0,09), U1 (1,85 mm \pm 0,093) y W1 (1,62 mm \pm 0,085).

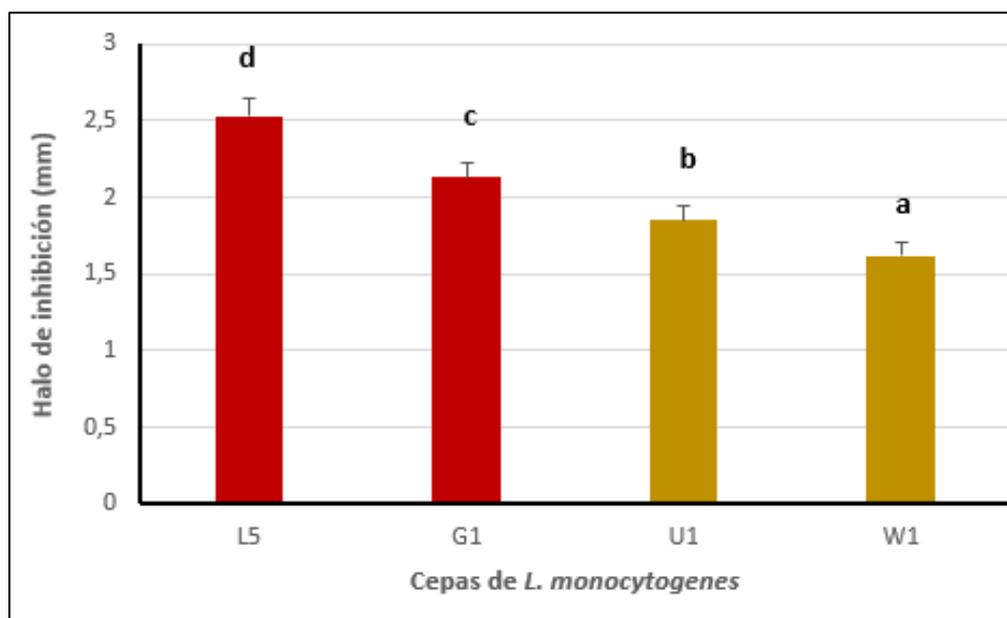


Figura 19. Antagonismo del SLC O2 en distintas cepas de *L. monocytogenes*. Los halos de inhibición (mm) se expresan como promedio \pm SD de tres repeticiones. Cepas con la misma letra (extremo superior de la barra) no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$). La actividad antagónica se clasificó según la siguiente escala: alta (halo mayor a 2 mm), media (halo entre 1,45 mm y 2 mm) o leve (halo menor a 1,45 mm). Esta actividad fue alta en L5 y G1 (barras color rojo) y media en U1 y W1 (barras color oro).

El SLC O4 presentó un 69 % de efectividad sobre las 13 cepas de *L. monocytogenes* evaluadas. El espectro de control involucró a las cepas L5, Z1, V7, U1, G7, GG5, G1, W1 y N7 con diferentes grados de inhibición (Figura 20). Este SLC ejerció una actividad antagónica alta sobre L5 y Z1, media sobre V7, U1, G7, GG5 y G1 y leve sobre W1 y N7 de acuerdo a la escala descripta en MT. Se observó variabilidad en el calibre de los halos de inhibición. El halo de inhibición correspondiente a la cepa L5 fue el de mayor tamaño ($2,32 \text{ mm} \pm 0,21$) aunque este, no difirió significativamente del observado en Z1 ($2,13 \text{ mm} \pm 0,162$). Por su parte, los halos de inhibición en las cepas G7 ($1,73 \text{ mm} \pm 0,162$), GG5 ($1,68 \text{ mm} \pm 0,223$), G1 ($1,49 \text{ mm} \pm 0,18$), W1 ($1,43 \text{ mm} \pm 0,142$) y N7 ($1,42 \text{ mm} \pm 0,19$) no presentaron diferencias significativas entre sí. En tanto, los halos de V7 ($1,87 \pm 0,151$) y U1 ($1,81 \pm 0,193$) fueron similares a los de G7 y GG5.

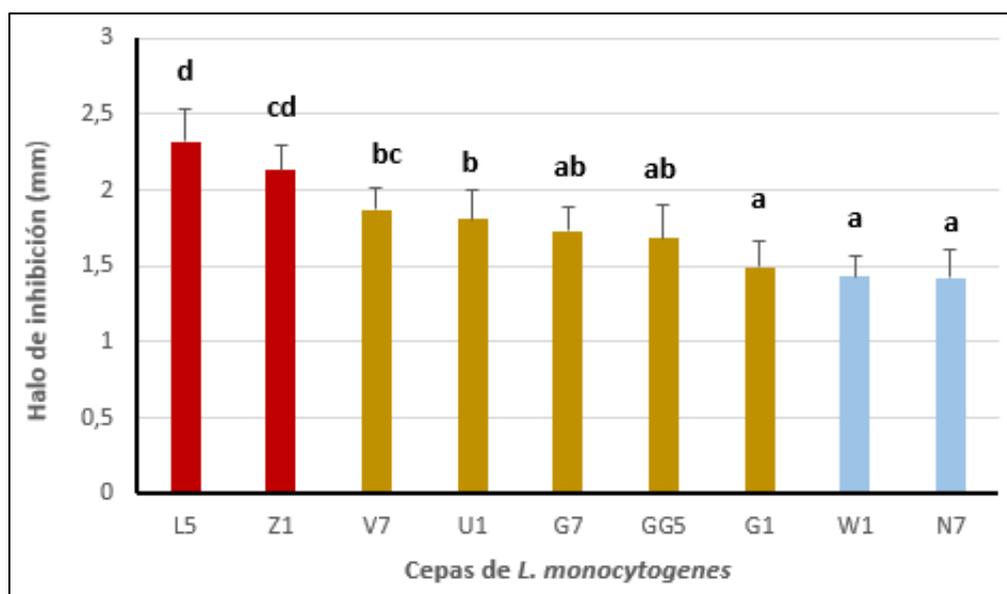


Figura 20. Antagonismo del SLC O4 en distintas cepas de *L. monocytogenes*. Los halos de inhibición (mm) se expresan como promedio \pm SD de tres repeticiones. Cepas con la misma letra (extremo superior de la barra) no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$). La actividad antagonista se clasificó según la siguiente escala: alta (halo mayor a 2 mm), media (halo entre 1,45 mm y 2 mm) o leve (halo menor a 1,45 mm). Esta actividad fue alta en L5 y Z1 (barras color rojo), media en V7, U1, G7, GG5 y G1 (barras color oro) y leve sobre W1 y N7 (barras color azul).

El SLC O5 presentó un 69 % de efectividad sobre las 13 cepas de *L. monocytogenes* evaluadas. El espectro de control involucró a las cepas L5, Z1, G7, W1, U1, G1, N7, V7 y GG5 con diferentes grados de inhibición (Figura 21). Este SLC ejerció una actividad antagonista alta sobre L5 y media en las demás cepas, de acuerdo a la escala descrita en MT. Se observó variabilidad en la medida de los halos de inhibición. El halo correspondiente a L5 ($2,12 \text{ mm} \pm 0,151$) se diferenció significativamente del resto, pero no del observado en Z1 ($1,91 \text{ mm} \pm 0,19$). En tanto, los halos de inhibición observados en W1 ($1,77 \text{ mm} \pm 0,155$), U1 ($1,73 \text{ mm} \pm 0,16$), G1 ($1,69 \text{ mm} \pm 0,14$), N7 ($1,67 \text{ mm} \pm 0,125$), V7 ($1,65 \text{ mm} \pm 0,11$) y GG5 ($1,53 \text{ mm} \pm 0,175$) no difirieron entre sí. Por su parte, el halo de G7 ($1,83 \text{ mm} \pm 0,193$) tampoco tuvo diferencias con los mencionados,

pero sí presentó diferencias con los obtenidos en L5 y GG5.

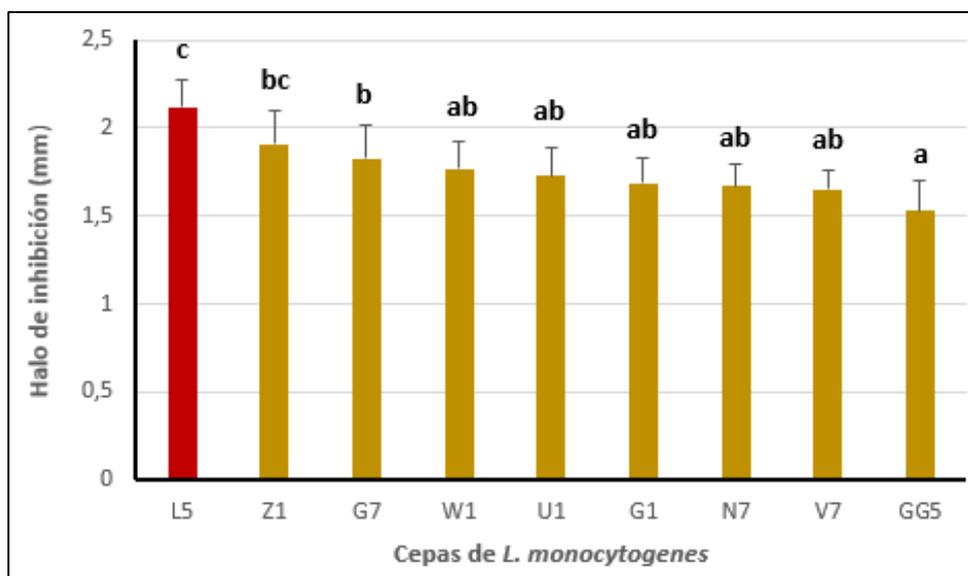


Figura 21. Antagonismo del SLC O5 en distintas cepas de *L. monocytogenes*. Los halos de inhibición (mm) se expresan como promedio \pm SD de tres repeticiones. Cepas con la misma letra (extremo superior de la barra) no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$). La actividad antagonica se clasificó según la siguiente escala: alta (halo mayor a 2 mm), media (halo entre 1,45 mm y 2 mm) o leve (halo menor a 1,45 mm). Esta actividad fue alta en L5 (barra color rojo) y media sobre Z1, G7, W1, U1, G1, N7, V7 y GG5 (barras color oro).

El SLC O6 presentó un 77 % de efectividad sobre las 13 cepas de *L. monocytogenes* evaluadas. El espectro de control involucró a las cepas L5, G7, V7, GG5, G1, Z1, U1, N7, W1 y HH5 con diferentes grados de inhibición (Figura 22). Este SLC ejerció una actividad antagonica alta sobre L5, media en G7, V7, GG5, G1, Z1, U1, N7 y leve sobre W1 y HH5 de acuerdo a la escala descripta en MT. Se observó variabilidad en el calibre de los halos de inhibición. El mayor halo de inhibición se obtuvo en la cepa L5 (2,18 mm \pm 0,102). Los halos de inhibición correspondientes a G7 (1,94 mm \pm 0,094) y V7 (1,84 mm \pm 0,06) no difirieron significativamente y la última tampoco presentó diferencias con GG5 (1,78 mm \pm 0,043). En tanto, los halos observados en W1 (1,44 mm \pm 0,085)

y HH5 (1,37 mm \pm 0,058) fueron estadísticamente similares y los de menor tamaño. Sin embargo, el halo de inhibición en la cepa N7 (1,49 mm \pm 0,097) fue semejante al de W1. Tampoco se observaron diferencias entre U1 (1,65 mm \pm 0,065), Z1 (1,64 mm \pm 0,065) y G1 (1,66 mm \pm 0,032).

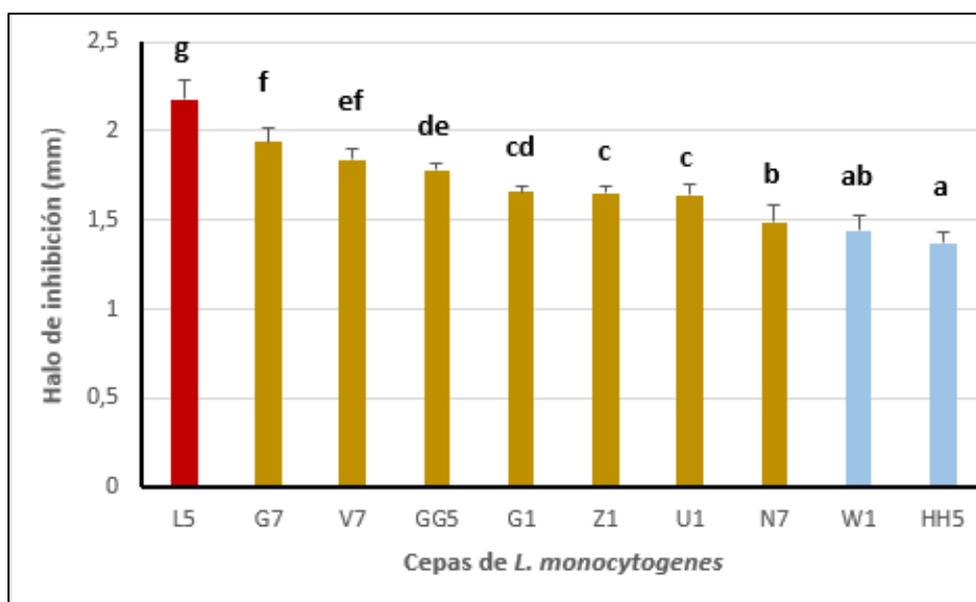


Figura 22. Antagonismo del SLC O6 en distintas cepas de *L. monocytogenes*. Los halos de inhibición (mm) se expresan como promedio \pm SD de tres repeticiones. Cepas con la misma letra (extremo superior de la barra) no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$). La actividad antagonica se clasificó según la siguiente escala: alta (halo mayor a 2 mm), media (halo entre 1,45 mm y 2 mm) o leve (halo menor a 1,45 mm). Esta actividad fue alta en L5 (barra color rojo), media en G7, V7, GG5, G1, Z1, U1 y N7 (barras color oro) y leve sobre W1 y HH5 (barras color azul).

El SLC O8 presentó un 31 % de efectividad sobre las 13 cepas de *L. monocytogenes* ensayadas. El espectro de control involucró a las cepas L5, U1, G1 y W1 con diferentes grados de inhibición (Figura 23). Este SLC exhibió una actividad antagonica alta sobre L5, media en U1 y G1 y leve sobre W1 de acuerdo a la escala descrita en MT. Se observó variabilidad en el calibre de los halos de inhibición. El halo de inhibición en L5

(2,28 mm \pm 0,074) fue el de mayor calibre respecto a las demás cepas. Por su parte, los halos correspondientes a U1 (1,77 mm \pm 0,058) y G1 (1,67 mm \pm 0,032) no presentaron diferencias entre sí, pero fueron significativamente mayores al observado en la cepa W1 (1,43 mm \pm 0,025).

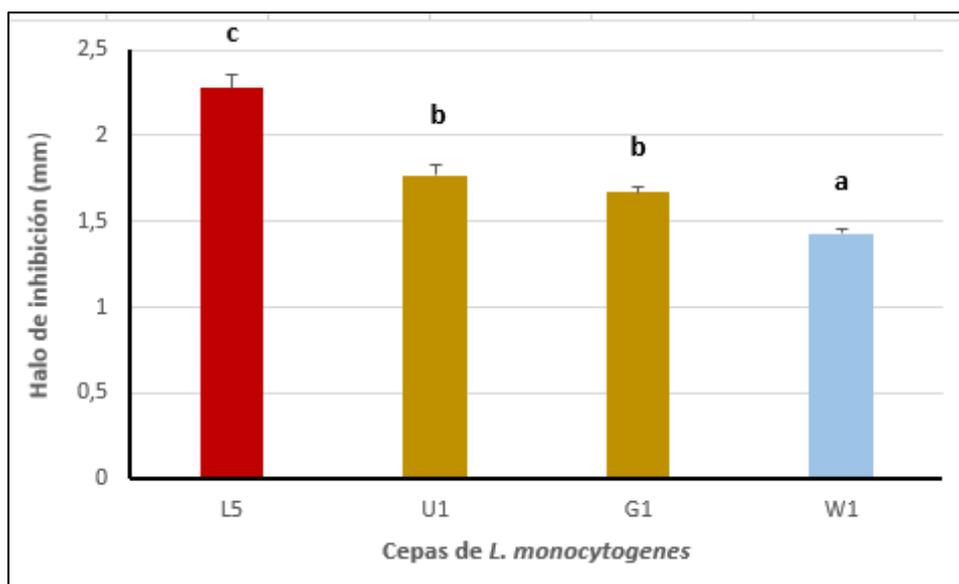


Figura 23. Antagonismo del SLC O8 en distintas cepas de *L. monocytogenes*. Los halos de inhibición (mm) se expresan como promedio \pm SD de tres repeticiones. Cepas con la misma letra (extremo superior de la barra) no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$). La actividad antagónica se clasificó según la siguiente escala: alta (halo mayor a 2 mm), media (halo entre 1,45 mm y 2 mm) o leve (halo menor a 1,45 mm). Esta actividad fue alta en L5 (barra color rojo), media en U1 y G1 (barras color oro) y leve sobre W1 (barras color azul).

El SLC O9 presentó un 38 % de efectividad sobre las 13 cepas de *L. monocytogenes* analizadas. El espectro de control involucró a las cepas U1, G1, L5, Z1 y W1 con diferentes grados de inhibición (Figura 24). Este SLC exhibió una actividad antagónica alta en U1, media en G1 y leve sobre L5, Z1 y W1 de acuerdo a la escala descrita en MT. Se observó variabilidad en el tamaño de los halos de inhibición. El mayor halo se evidenció en la cepa U1 (2,2 mm \pm 0,09). En tanto, los halos correspondientes a las

cepas L5 (1,41 mm \pm 0,06) y Z1 (1,33 mm \pm 0,121) no presentaron diferencias significativas entre sí, pero se diferenciaron de los halos observados en G1 (1,71 mm \pm 0,083) y W1 (1,13 mm \pm 0,058).

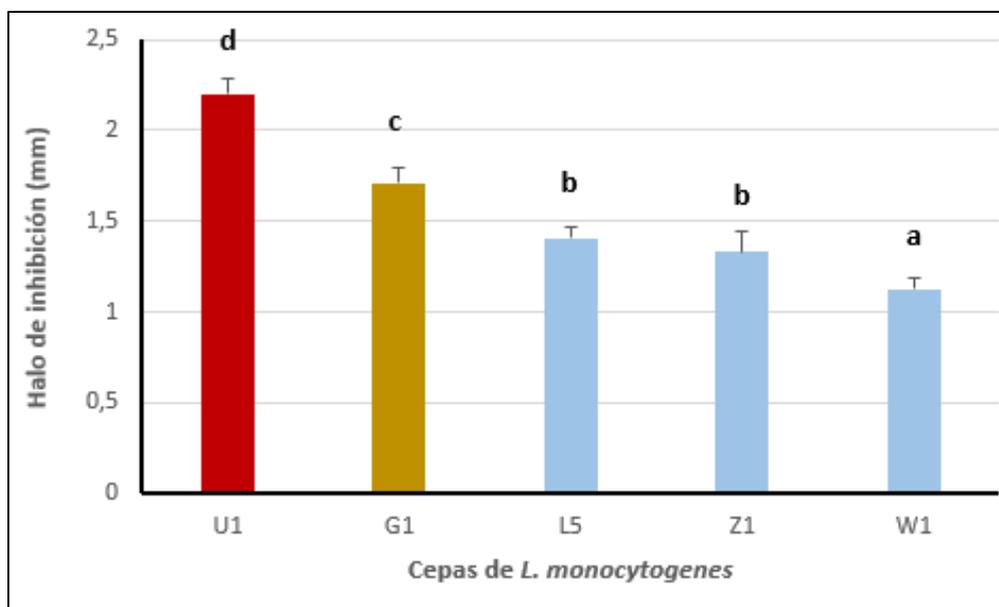


Figura 24. Antagonismo del SLC O9 en distintas cepas de *L. monocytogenes*. Los halos de inhibición (mm) se expresan como promedio \pm SD de tres repeticiones. Cepas con la misma letra (extremo superior de la barra) no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$). La actividad antagonica se clasificó según la siguiente escala: alta (halo mayor a 2 mm), media (halo entre 1,45 mm y 2 mm) o leve (halo menor a 1,45 mm). Esta actividad fue alta en U1 (barra color rojo), media en G1 (barra color oro) y leve sobre L5, Z1 y W1 (barras color azul).

El SLC O10 presentó un 46 % de efectividad sobre las 13 cepas de *L. monocytogenes* analizadas. El espectro de control involucró a las cepas U1, G1, W1, L5, V7 y Z1 con diferentes grados de inhibición (Figura 25). Este SLC ejerció una actividad antagonica alta en U1, media en G1 y leve sobre W1, L5, V7 y Z1 de acuerdo a la escala descripta en MT. Se observó variabilidad en la medida de los halos de inhibición. El halo de inhibición correspondiente a la cepa U1 (2,22 mm \pm 0,106) fue el de mayor tamaño. En tanto, el halo de la cepa G1 (1,62 mm \pm 0,202) no presentó diferencias

significativas con los observados en W1 (1,38 mm \pm 0,19) y L5 (1,37 mm \pm 0,161) pero sí con los halos de V7 (1,33 mm \pm 0,153) y Z1 (1,23 mm \pm 0,12) los cuales fueron estadísticamente similares.

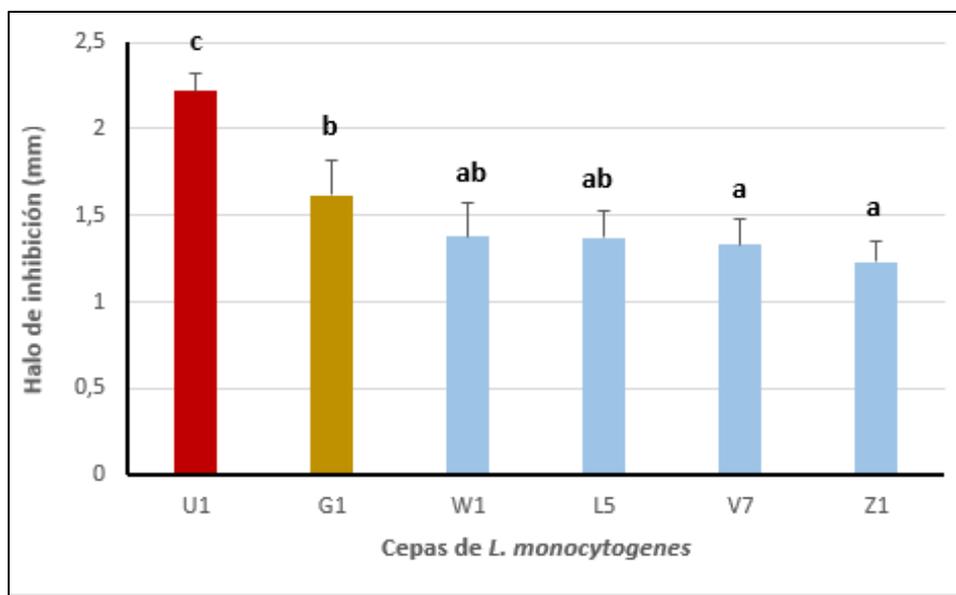


Figura 25. Antagonismo del SLC O10 en distintas cepas de *L. monocytogenes*. Los halos de inhibición (mm) se expresan como promedio \pm SD de tres repeticiones. Cepas con la misma letra (extremo superior de la barra) no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$). La actividad antagonica se clasificó según la siguiente escala: alta (halo mayor a 2 mm), media (halo entre 1,45 mm y 2 mm) o leve (halo menor a 1,45 mm). Esta actividad fue alta en U1 (barra color rojo), media en G1 (barra color oro) y leve sobre W1, L5, V7 y Z1 (barras color azul).

El SLC O11 presentó un 62 % de efectividad sobre las 13 cepas de *L. monocytogenes* analizadas. El espectro de control involucró a las cepas C5, G1, W1, Z1, U1, L5, V7 y N7 con diferentes grados de inhibición (Figura 26). Este SLC exhibió una actividad antagonica media en C5, G1, W1, Z1 y U1 y leve sobre L5, V7 y N7 de acuerdo a la escala descrita en MT. Se observó variabilidad en el calibre de los halos de inhibición. Los halos de C5 (1,8 mm \pm 0,1) y G1 (1,76 mm \pm 0,144) fueron los de mayor tamaño respecto al resto, aunque no difirieron al observado en W1 (1,74 mm \pm

0,125). Por su parte, el halo obtenido en Z1 ($1,52 \text{ mm} \pm 0,115$) difirió significativamente de los correspondientes a L5 ($1,27 \text{ mm} \pm 0,095$), V7 ($1,25 \text{ mm} \pm 0,16$) y N7 ($1,22 \text{ mm} \pm 0,098$) que fueron estadísticamente similares entre sí.

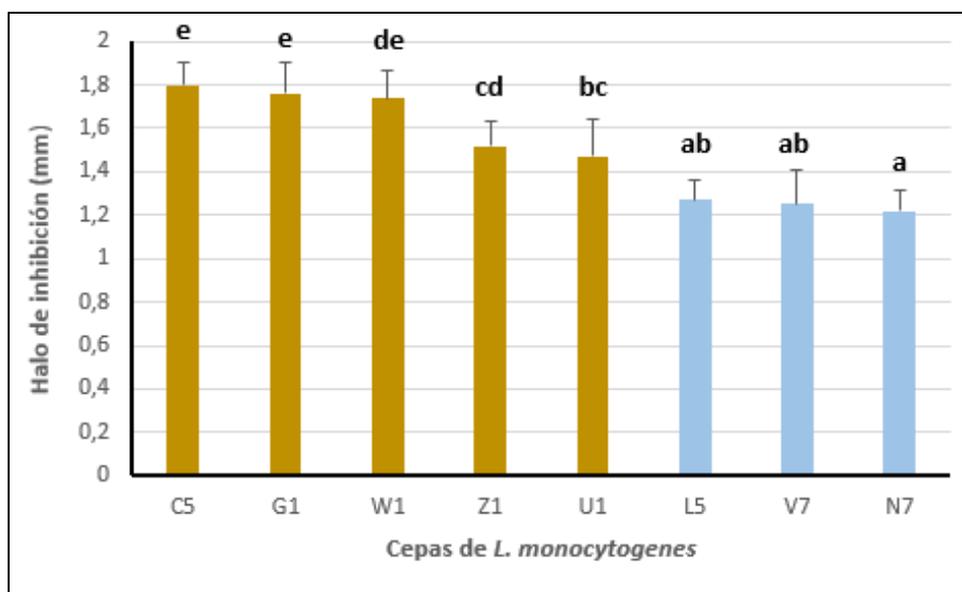


Figura 26. Antagonismo del SLC O11 en distintas cepas de *L. monocytogenes*. Los halos de inhibición (mm) se expresan como promedio \pm SD de tres repeticiones. Cepas con la misma letra (extremo superior de la barra) no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$). La actividad antagonista se clasificó según la siguiente escala: alta (halo mayor a 2 mm), media (halo entre 1,45 mm y 2 mm) o leve (halo menor a 1,45 mm). Esta actividad fue media en C5, G1, W1, Z1 y U1 (barras color oro) y leve sobre L5, V7 y N7 (barras color azul).

5.2.3 SLC obtenidos de las BAL provenientes del tratamiento P

Los SLC con capacidad antagonista de este grupo se identificaron como: Pro01 y Pro02 (Anexo 4.3). El SLC Pro01 presentó un 15 % de efectividad sobre las 13 cepas de *L. monocytogenes* evaluadas. El espectro de control involucró a las cepas G1 y GG5 con diferentes grados de inhibición (Figura 27). Este SLC ejerció una actividad antagonista media sobre G1 y leve sobre GG5 de acuerdo a la escala descrita en MT. El halo de inhibición medido sobre G1 ($1,49 \text{ mm} \pm 0,035$) fue de mayor tamaño que el observado

en GG5 ($1,21 \text{ mm} \pm 0,053$).

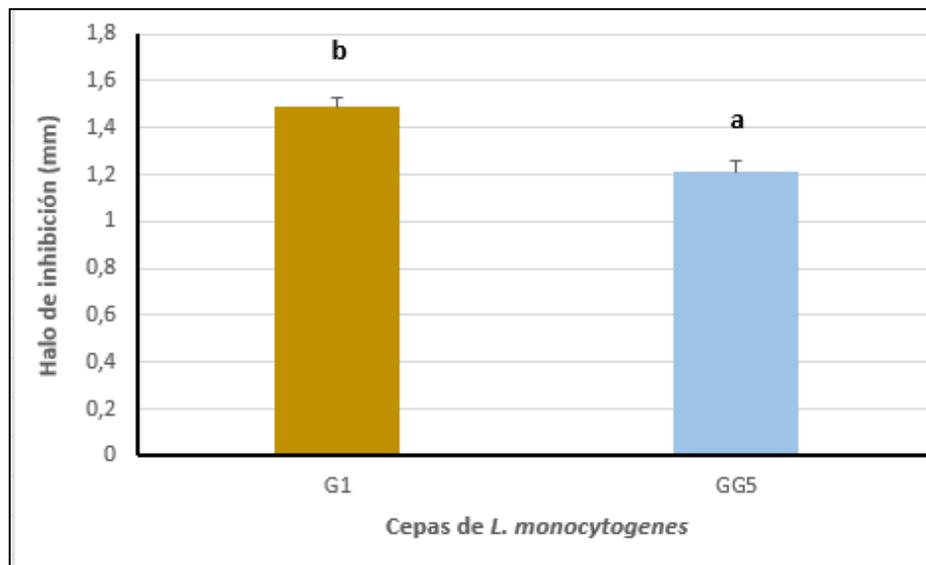


Figura 27. Antagonismo del SLC Pro01 en distintas cepas de *L. monocytogenes*. Los halos de inhibición (mm) se expresan como promedio \pm SD de tres repeticiones. Cepas con la misma letra (extremo superior de la barra) no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$). La actividad antagonista se clasificó según la siguiente escala: alta (halo mayor a 2 mm), media (halo entre 1,45 mm y 2 mm) o leve (halo menor a 1,45 mm). Esta actividad fue media en G1 (barra color oro) y leve sobre GG5 (barra color azul).

El SLC Pro02 presentó un 15 % de efectividad sobre las 13 cepas de *L. monocytogenes* analizadas. El espectro de control involucró a las cepas W1 y L5 con diferentes grados de inhibición (Figura 28). Este SLC exhibió una actividad antagonista media en W1 y leve sobre L5 de acuerdo a la escala descrita en MT. El halo de inhibición medido sobre W1 ($1,37 \text{ mm} \pm 0,071$) resultó ser de mayor calibre que el observado en L5 ($1,16 \text{ mm} \pm 0,065$).

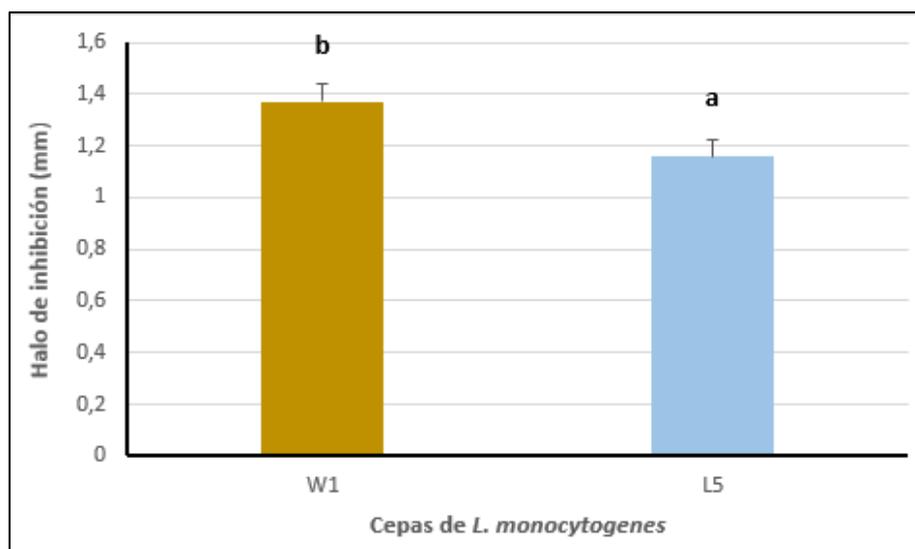


Figura 28. Antagonismo del SLC Pro02 en distintas cepas de *L. monocytogenes*. Los halos de inhibición (mm) se expresan como promedio \pm SD de tres repeticiones. Cepas con la misma letra (extremo superior de la barra) no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$). La actividad antagonista se clasificó según la siguiente escala: alta (halo mayor a 2 mm), media (halo entre 1,45 mm y 2 mm) o leve (halo menor a 1,45 mm). Esta actividad fue media en W1 (barra color oro) y leve sobre L5 (barra color azul).

5.2.4 SLC obtenidos de las BAL provenientes del tratamiento W3 + P

Los SLC con capacidad antagonista de este grupo se identificaron como: OP9, OP4 y OP5 (Anexo 4.4). El SLC OP9 presentó un 61 % de efectividad sobre las 13 cepas de *L. monocytogenes* evaluadas. El espectro de control involucró a las cepas G7, GG5, L5, W1, U1, N7, Z1 y V7 con diferentes grados de inhibición (Figura 29). Este SLC ejerció una actividad antagonista media en G7, GG5, L5, W1, U1, N7 y Z1 y leve sobre V7 de acuerdo a la escala descrita en MT. Se observó variabilidad en el calibre de los halos de inhibición. El halo medido en la cepa G7 ($1,77 \text{ mm} \pm 0,185$) presentó diferencias significativas respecto a los observados en Z1 ($1,46 \text{ mm} \pm 0,171$) y V7 ($1,43 \text{ mm} \pm 0,154$). Sin embargo, no se hallaron diferencias entre los halos mencionados y los halos correspondientes a las cepas N7 ($1,48 \text{ mm} \pm 0,155$), U1 ($1,56 \text{ mm} \pm 0,162$), W1 ($1,57$

mm \pm 0,212), L5 (1,6 mm \pm 0,184) y GG5 (1,62 mm \pm 0,197).

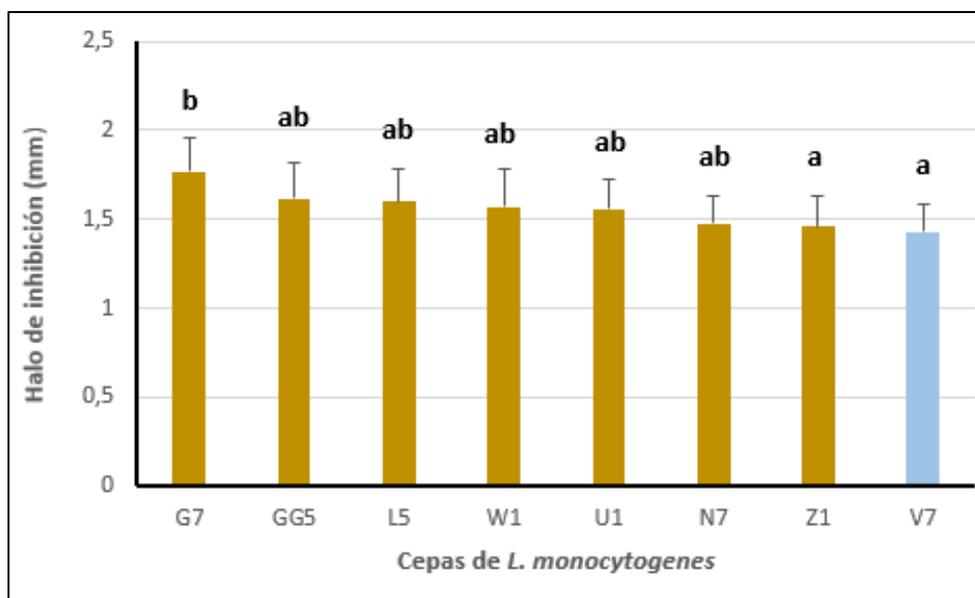


Figura 29. Antagonismo del SLC OP9 en distintas cepas de *L. monocytogenes*. Los halos de inhibición (mm) se expresan como promedio \pm SD de tres repeticiones. Cepas con la misma letra (extremo superior de la barra) no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$). La actividad antagónica se clasificó según la siguiente escala: alta (halo mayor a 2 mm), media (halo entre 1,45 mm y 2 mm) o leve (halo menor a 1,45 mm). Esta actividad fue media en G7, GG5, L5, W1, U1, N7 y Z1 (barras color oro) y leve sobre V7 (barra color azul).

El SLC OP4 presentó un 23 % de efectividad sobre las 13 cepas de *L. monocytogenes* testeadas. El espectro de control involucró a las cepas G1, W1 y B7 con diferentes grados de inhibición (Figura 30). Este SLC ejerció una actividad antagónica media en G1 y leve sobre W1 y B7 de acuerdo a la escala descrita en MT. Se observó variabilidad en el tamaño de los halos de inhibición. Los halos de inhibición medidos en las cepas W1 (1,3 mm \pm 0,055) y B7 (1,21 mm \pm 0,046) no presentaron diferencias significativas entre sí, pero se diferenciaron del halo observado en G1 (1,66 mm \pm 0,071).

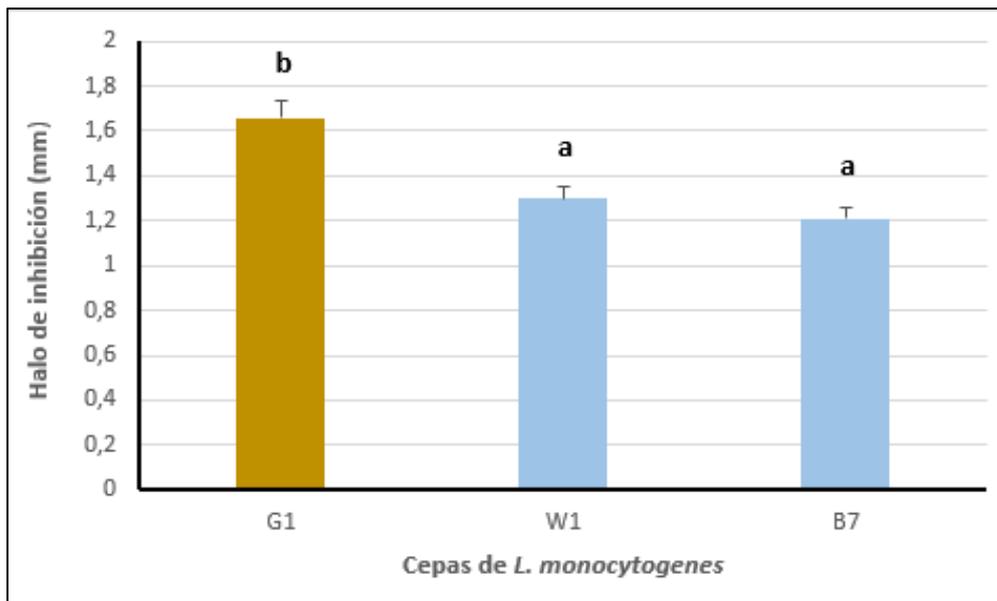


Figura 30. Antagonismo del SLC OP4 en distintas cepas de *L. monocytogenes*. Los halos de inhibición (mm) se expresan como promedio \pm SD de tres repeticiones. Cepas con la misma letra (extremo superior de la barra) no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$). La actividad antagonica se clasificó según la siguiente escala: alta (halo mayor a 2 mm), media (halo entre 1,45 mm y 2 mm) o leve (halo menor a 1,45 mm). Esta actividad fue media en G1 (barra color oro) y leve sobre W1 y B7 (barras color azul).

El SLC OP5 presentó un 61 % de efectividad sobre las 13 cepas de *L. monocytogenes* evaluadas. El espectro de control involucró a las cepas G1, C5, Z1, W1, U1, N7, V7 y L5 con diferentes grados de inhibición (Figura 31). Este SLC ejerció una actividad antagonica media en G1, C5 y Z1 y leve sobre W1, U1, N7, V7 y L5 de acuerdo a la escala descrita en MT. Se observó variabilidad en el calibre de los halos de inhibición. Los mayores halos de inhibición se registraron en las cepas G1 (1,78 mm \pm 0,079) y C5 (1,66 mm \pm 0,065) mientras que los menores halos se observaron en N7 (1,27 mm \pm 0,058), V7 (1,21 mm \pm 0,076) y L5 (1,17 mm \pm 0,094). En tanto, los halos correspondientes a las cepas Z1 (1,46 mm \pm 0,04), W1 (1,44 mm \pm 0,081) y U1 (1,41 mm \pm 0,071) no presentaron diferencias entre sí, pero se diferenciaron de las mencionadas previamente.

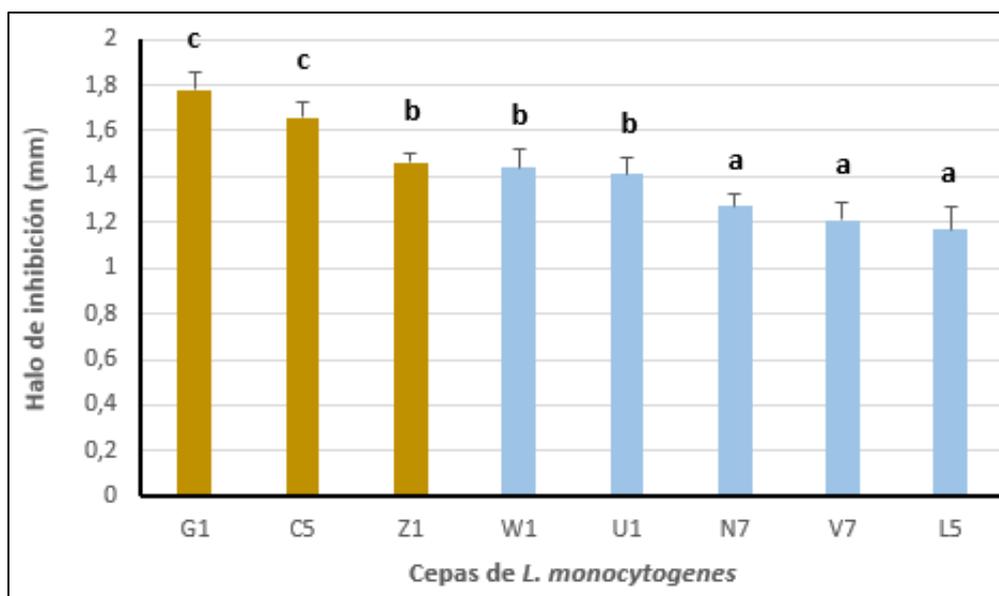


Figura 31. Antagonismo del SLC OP5 en distintas cepas de *L. monocytogenes*. Los halos de inhibición (mm) se expresan como promedio \pm SD de tres repeticiones. Cepas con la misma letra (extremo superior de la barra) no difieren significativamente (DMS, $p \geq 0,05$). La actividad antagónica se clasificó según la siguiente escala: alta (halo mayor a 2 mm), media (halo entre 1,45 mm y 2 mm) o leve (halo menor a 1,45 mm). Esta actividad fue media en G1, C5 y Z1 (barras color oro) y leve sobre W1, U1, N7, V7 y L5 (barras color azul).

Los resultados obtenidos señalan que existe una gran heterogeneidad en cuanto a la efectividad y grado de inhibición de los SLC en los ensayos de antagonismo. Ningún SLC de BAL fue efectivo en las 13 cepas de *L. monocytogenes* ensayadas, sin embargo, al menos una cepa de *L. monocytogenes* pudo ser controlada por los SLC evaluados, demostrando una gran diversidad en la sensibilidad/resistencia entre las cepas de *L. monocytogenes* y las sustancias antimicrobianas producidas por las BAL. Estos resultados concuerdan con los establecidos por Složilová *et al.*, (2014) quienes hallaron discrepancias en la acción inhibitoria de sobrenadantes de BAL sobre cepas de *L. monocytogenes* procedentes de distintas fuentes. Por su parte, Bungenstock *et al.*, (2020) reportaron que de los SLC obtenidos de BAL provenientes de productos fermentados, solo un 12,4 % fueron efectivos contra cepas patrones de

Listeria spp.

De acuerdo a la respuesta obtenida con cada SLC, el nivel de antagonismo ejercido en las cepas de *L. monocytogenes* se asocia en parte a la condición experimental de donde fueron aisladas las BAL. El mayor número de BAL con capacidad antagonista del tratamiento W3, posiblemente se deba al efecto inductor de la harina de chía, aunque en este caso no todas presentaron el mismo patrón de inhibición sobre las cepas evaluadas de *L. monocytogenes*. Como se discutió en el Capítulo III, este componente de la dieta de los pollos repercutió positivamente en la abundancia de BAL aisladas en las excretas, por lo que no se descartaría que también haya influido en la selección de BAL nativas con capacidad antagonista contra *L. monocytogenes*. Respecto a esto, se ha comprobado que el establecimiento y la sobrevivencia de BAL en el TGI, están condicionadas además de la especie y tipo de cepa, por numerosos factores externos donde intervienen fundamentalmente los componentes de la dieta (Terpou *et al.*, 2019). En este caso, la fibra dietaria soluble, los polifenoles y los AGPI presentes en la harina de chía, podrían haber funcionado como productos prebióticos (mejoradores) para el crecimiento de estas BAL en el intestino, lo que explicaría la mayor recuperación de bacterias antagonistas en las excretas analizadas.

Como se mencionó en la Introducción, la aplicación de productos procedentes de BAL se destaca en la preservación de los alimentos. En este aspecto, es de importancia principalmente la búsqueda de metabolitos bioactivos para evitar la proliferación de agentes productores de ETA como *L. monocytogenes* (Abbasiliasi *et al.*, 2017). Los estudios presentados aquí, indican que las BAL extraídas de las excretas de pollos especialmente de la condición C y de los tratamientos W3 y W3 + P, pueden ser efectivas en la producción de moléculas termoestables con efecto antilisteria. Los resultados evidencian que de los 60 SLC de BAL analizados, el 13,33 % (16C, 20C, O4,

O5, O6, O11, OP9 y OP5) ejerció antagonismo en más del 50 % de las cepas de *L. monocytogenes* analizadas, siendo el SLC O6 el de mayor efectividad (77 % de las cepas ensayadas). Esto sugiere que el empleo de los SLC o las sustancias bioactivas extraídas de los mismos, podrían aprovecharse en la industria alimentaria para prevenir o retrasar el desarrollo de un amplio espectro de cepas de *L. monocytogenes* contaminantes de la carne de pollo. En correlación a los resultados expuestos, el efecto antilisteria del metabolismo de las BAL se ha demostrado en diferentes investigaciones (Pinto *et al.*, 2009; Tomé *et al.*, 2009; Olbrich dos Santos 2011; Johnson *et al.*, 2017). Por su parte, si bien en la condición control se obtuvieron pocos SLC de BAL con capacidad antagonista, estos presentaron una gran efectividad. Dicha cualidad es de relevancia, considerando que las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de la carne de pollo poseen comportamientos distintos en condiciones *in vitro* (Capítulo II). Por otro lado, la baja efectividad obtenida de los SLC provenientes del tratamiento P (Pro01 y Pro02) posiblemente se explique por una mayor producción de sustancias antagonistas termolábiles por parte de las BAL implicadas, a la baja estabilidad en medio ácido de las sustancias producidas antes de la neutralización y/o a una cierta especificidad inhibitoria de dichas moléculas en determinadas cepas de *L. monocytogenes*.

Debido a que los ensayos de antagonismo se realizaron en base a la búsqueda de moléculas inhibitorias de naturaleza peptídica, la falta de respuesta en los demás SLC no indicaría necesariamente la incapacidad de las BAL para controlar a *L. monocytogenes*. Es posible que estas BAL provenientes de las excretas, funcionen como antagonistas de patógenos en el intestino de las aves a través de procesos distintos a la antibiosis, garantizando igualmente la salud de los animales. Diversos estudios demuestran que la exclusión, el desplazamiento, la competencia por nutrientes, la auto y co-agregación con patógenos y la producción de ácidos grasos de cadena corta, también forman parte de las estrategias competitivas de las BAL contra microorganismos, en particular en

Lactobacillus spp. (López Acevedo 2013; Cisek & Binek, 2014; Camargo *et al.*, 2018). En este aspecto, es probable que la mayoría de las BAL, especialmente las aisladas del tratamiento P, supriman el crecimiento de bacterias indeseables por algunos de los mecanismos mencionados.

En el presente estudio, los SLC que resultaron antagonistas exhibieron grados de inhibición disímiles contra las cepas de *L. monocytogenes*. Las discrepancias podrían atribuirse tanto a la diversidad, eficacia y/o mecanismo de acción de las sustancias producidas en los SLC, como así también a la variabilidad en la respuesta por parte de cada cepa de *Listeria*. Particularmente, se pudo observar una alta actividad inhibitoria (halo mayor a 2 mm) en los SLC provenientes de la condición control (16C) y del tratamiento W3 (O1, O2, O4, O5, O6, O8, O9 y O10). Sin embargo, el efecto antagónico fue variable dependiendo de la cepa de *L. monocytogenes* evaluada. En concordancia con estos resultados, los estudios realizados por Hartmann *et al.*, (2011) verificaron que la capacidad inhibitoria sobre *L. monocytogenes* dependía del tipo de bacteriocina producida. Por esta razón, no se descartaría que las BAL antagonistas, hayan producido moléculas antimicrobianas estructuralmente distintas durante su cultivo en el medio MRS. Esto también explicaría la variabilidad observada entre los halos de inhibición de las cepas de *L. monocytogenes* frente a un SLC específico. En correlación a estos resultados, las investigaciones llevadas a cabo por Katla *et al.*, (2003) determinaron que la susceptibilidad de 200 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de distintas fuentes, difería según la bacteriocina en estudio. Por su parte Vignolo *et al.*, (2000) también reportaron diferencias en los grados de inhibición de tres bacteriocinas producidas por BAL, observando niveles de sensibilidad variable en distintas cepas de *L. monocytogenes*. Similares resultados fueron obtenidos por Suazo (2002) y Brillet *et al.*, (2004). En tanto, Jones *et al.*, (2008) encontraron variaciones en la actividad antimicrobiana de BAL aisladas de productos cárnicos. Estos autores, asociaron este

evento a la composición del medio y sugirieron mayores evaluaciones en los ensayos de antagonismo para cepas potencialmente patógenas que contaminan la carne refrigerada.

Como se detalló en el Capítulo II, en la carne de pollo se hallaron cepas de *L. monocytogenes* mejor adaptadas que otras a los cambios en las condiciones osmóticas (G1, G7, HH5, L5, R7, U1, V7 y Z1). Debido a que esta plasticidad fenotípica puede resultar un problema desde el punto de vista sanitario (Bergholz *et al.*, 2018), los estudios aquí presentados, sugieren que las BAL aisladas de las excretas podrían ser eficientes para inhibir cepas de *L. monocytogenes* potencialmente patógenas, adaptadas a condiciones de crecimiento subóptimas. En este contexto, Bucur *et al.*, (2018) indican que la ineficiencia de las medidas de descontaminación comúnmente utilizadas, se debe a la resistencia de *L. monocytogenes* a un amplio rango de condiciones de estrés, lo que dificulta su control tanto en la matriz de los alimentos como en los ambientes de procesado. Por lo tanto, los resultados obtenidos resaltan la importancia de considerar que los metabolitos producidos por las BAL con capacidad antagonica, podrían prevenir la contaminación de cepas de *L. monocytogenes* osmotolerantes durante la manipulación de los alimentos o inhibir su crecimiento durante el almacenaje. Además, las BAL son una herramienta biotecnológica potencial para evitar la resistencia de *L. monocytogenes* a desinfectantes y sanitizantes empleados en la industria y/o combatir cepas formadoras de biofilm que resultan difíciles de eliminar en las plantas de procesado (Camargo *et al.*, 2018).

Desde un aspecto general, el antagonismo de los SLC varió dependiendo de la cepa de *L. monocytogenes* en estudio. La mayoría de los SLC que resultaron efectivos, inhibieron a L5 (88,23 %), G1 y U1 (82,35 %) y Z1 (70,58 %). Esto claramente indicó una mayor sensibilidad de estas cepas (respecto a las demás) hacia los metabolitos de las BAL analizadas. Por su parte, solo algunos SLC fueron efectivos contra las cepas G7

(23,53 %) y HH5 (17,65 %), las cuales habían presentado el mayor crecimiento en las condiciones de NaCl evaluadas (Capítulo II). Concretamente, la cepa G7 fue inhibida por los SLC provenientes de los tratamientos W3 (O4, O5 y O6) y W3 + P (OP9). En tanto, la cepa HH5 fue inhibida por los SLC provenientes de la condición control (4C y 16C) y del tratamiento W3 (O6). De particular importancia, el SLC 16C ejerció una elevada actividad inhibitoria (halo mayor a 2 mm) sobre esta cepa. Los estudios realizados también determinaron que el menor efecto antagónico se produjo sobre las cepas B7, C5 y R7. Los únicos SLC antagonistas en este caso, fueron 16C y OP4 para la cepa B7; 20C, O11 y OP5 para la cepa C5 y 4C y 16C para la cepa R7, aunque estos presentaron diferentes grados de inhibición. Posiblemente, esto señale una mayor resistencia de estas cepas de *L. monocytogenes* a las sustancias producidas por las BAL evaluadas. Es probable que las cepas mencionadas, cuenten con mecanismos que le permitan hacer frente a determinadas sustancias inhibitorias producidas por las BAL y hayan podido sobrellevar el efecto antagonista de la mayoría de los SLC analizados. En relación a esto, la caracterización de fenotipos resistentes observados en variantes de cepas de *L. monocytogenes*, fue informada por Gravesen *et al.*, (2002) y Naghmouchi *et al.*, (2005). Estos autores trabajando con cepas de origen alimentario, encontraron que la resistencia a moléculas producidas por ciertas BAL, está asociada a cambios en los niveles de expresión del sistema fosfotransferasa o a las alteraciones ocurridas en los ácidos grasos que componen la membrana bacteriana.

De acuerdo a la gran variabilidad en los efectos antagónicos observados, los resultados sugieren que la combinación de sustancias provenientes de distintos aislamientos de BAL, podría ejercer un control efectivo sobre las cepas de *L. monocytogenes* que presentan niveles de sensibilidad disímiles. Particularmente, sería de interés el empleo de SLC con amplio espectro de acción y una alta actividad inhibitoria, para actuar de forma sinérgica y/o complementaria sobre las cepas de *L.*

monocytogenes que contaminan la carne de pollo. Debido a que estas podrían ser cepas prevalentes y/o representar un potencial peligro para la salud pública, las investigaciones realizadas en este Trabajo son de relevancia para estudios de bioconservación en la industria alimentaria. En correlación a esto, Scatassa *et al.*, (2017) recalcan que una combinación de cepas de BAL en lugar de una sola, puede actuar de manera mucho más eficiente contra *L. monocytogenes*. Por lo tanto, estas estrategias podrían mejorar la calidad microbiológica de los alimentos, reducir el crecimiento de cepas potencialmente patógenas y obtener productos más inocuos para el consumidor.

Desde un enfoque productivo, es posible que las BAL evaluadas en este Trabajo, estén adaptadas al TGI de los animales. Esto sugiere, que las BAL que presentaron capacidad antagonista contra *L. monocytogenes*, podrían ser tolerantes a la exposición de jugos gástricos y ácidos biliares del huésped, soportando condiciones que resultarían desfavorables para otras BAL no habituadas al intestino de las aves. Por esta razón, sería relevante considerar a los aislamientos con mejor comportamiento antilisteria (mayor antagonismo de los SLC), en estudios preliminares para ensayar su potencial capacidad probiótica. La selección de BAL autóctonas en aves con dicha característica, ha sido constatada por Ehrmann *et al.*, (2002). Estos autores sostienen que este método es de bajo costo y permite la obtención de aislamientos más eficientes, adaptados a ecosistemas complejos. En correlación a esto, en el presente Trabajo se consideró que las BAL nativas provenientes de excretas, son especies naturalizadas del intestino de las aves, por lo que su empleo como aditivos naturales en la dieta de los pollos, podría garantizar su inocuidad, prevenir la aparición de enfermedades, favorecer la performance de los animales y/o resultar en un beneficio para la salud de los mismos. Por su parte, como se ha mencionado, el ambiente intestinal de las aves presenta una diversidad de BAL del género *Lactobacillus* productoras de sustancias antimicrobianas

(Shiva & Jara, 2013), por lo que sería oportuno el empleo de estas BAL nativas para promover la homeostasis de la microbiota y contribuir al control de *L. monocytogenes* en el intestino de los animales. Respecto a esto, varias especies de BAL presentes en las excretas de pollos, particularmente del género *Lactobacillus*, han resultado eficientes en inhibir bacterias perjudiciales (Stern *et al.*, 2006; Nazef *et al.*, 2008; Shiva & Jara, 2013) y algunos aislamientos resultaron ser potencialmente probióticos (Lee *et al.*, 2008). En este aspecto, las investigaciones realizadas por Stern *et al.*, (2006) resaltan la importancia de utilizar preparados a base de BAL en la dieta de pollos, para disminuir los niveles de bacterias patógenas previo al sacrificio. De esta manera, los resultados presentados aquí, sugieren que el empleo de BAL antagonistas, podría reducir la probabilidad de contaminación post-faena de los productos cárnicos con *L. monocytogenes*. Además, sería de potencial interés la implementación de estrategias naturales con BAL provenientes del mismo animal, para sustituir el uso de antibióticos. Como se mencionó en la Introducción, hay una tendencia de reducir la utilización de estos agentes en la producción avícola por varias razones; hacer un uso más eficiente en el control de patógenos, no perjudicar a las bacterias benéficas del intestino y/o evitar la resistencia cruzada (Díaz López *et al.*, 2017; Diaz Carrasco *et al.*, 2019).

En este Capítulo, se demuestra que aislamientos nativos de BAL provenientes de excretas de pollos, poseen capacidad antagonista contra cepas de *L. monocytogenes* que contaminan la carne. Son escasos los antecedentes en la búsqueda de BAL autóctonas que produzcan metabolitos inhibidores de bacterias que atentan contra la seguridad alimentaria. Así, los estudios realizados pueden servir de base para investigaciones futuras en la producción avícola, enfocadas en favorecer el estado de eubiosis de los animales y su perfil sanitario. Por otra parte, también se vislumbra el posible empleo de los productos del metabolismo de las BAL en la industria alimentaria. Esta es una alternativa prometedora en el desarrollo de métodos de desinfección biológica.

Por lo mencionado, el empleo de BAL de origen animal, podría ser una importante herramienta biotecnológica para mitigar la propagación y desarrollo de *L. monocytogenes*, un posible productor de ETA con principal importancia en la salud pública.



Conclusiones

6. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en esta Tesis permiten concluir que:

- La presencia de *Listeria* spp. en la carne de pollo, en particular de *L. monocytogenes* durante la etapa de comercialización, constituye un riesgo para la salud del consumidor. La contaminación no se asocia al tamaño de los comercios, pero indica condiciones higiénico-sanitarias deficientes y/o fallas en las BPM durante la producción, procesamiento y/o expendio.
- Si bien los brotes de listeriosis son poco frecuentes, el riesgo de padecer una ETA provocada por *L. monocytogenes* es inminente. El problema se debe a la adaptación que presentan los aislamientos en la carne refrigerada y a su capacidad de crecimiento en NaCl.
- Debido a que los casos de listeriosis pueden ser subestimados, sería necesario relacionar muestras ambientales y de alimentos con estudios epidemiológicos, para revelar la situación actual y proponer soluciones al respecto.
- Se deben establecer medidas adecuadas de prevención y control durante la cadena productiva de los pollos, desde la crianza en la granja hasta la comercialización de la carne, con el fin de reducir la presencia de cepas potencialmente patógenas. Esto debe complementarse con asesoramiento profesional, concientización a través de las Campañas de Seguridad Alimentaria y educación a los manipuladores de alimentos, de tal forma que los productos lleguen a las bocas de expendio con la menor carga microbiana posible y no atenten contra la salud pública.
- Las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de la carne de pollo presentan distinto comportamiento al NaCl en las concentraciones analizadas (1,5 % y 3 % p/v). Se encontraron cepas que no modificaron su densidad poblacional frente a los

cambios de concentración del NaCl (G1, G7, HH5, L5, R7, U1, V7 y Z1). Estas cepas posiblemente estén mejor adaptadas que el resto, al aumento en el nivel de osmolaridad del medio.

- Comparativamente, las cepas G7 y HH5 son las que tuvieron mejor performance frente al aumento de salinidad y en consecuencia soportarían niveles más bajos de actividad agua.
- La composición de la dieta de los pollos altera la microbiota intestinal, modificando el recuento de BAL en las excretas.
- El empleo de aditivos probióticos como *B. subtilis* no produce un incremento en el recuento de BAL en las excretas, como sí lo hace la incorporación de harina de chía en la dieta de las aves. Esto significa, en este caso, que la proliferación de bacterias benéficas pertenecientes a la microbiota intestinal, es favorecida principalmente cuando las aves son alimentadas con una dieta rica en AGPI. De esta forma, una mayor población de BAL sería conveniente para excluir potenciales patógenos y promover la salud de los animales.
- Las BAL aisladas de las excretas (nativas o autóctonas) presentan capacidad de antagonismo frente a las cepas de *L. monocytogenes* contaminantes de la carne de pollo. El efecto puede ser atribuido a la producción de moléculas inhibitorias tipo bacteriocina. Estas sustancias son de naturaleza termoestable.
- Al menos uno de los SLC provenientes de distintos tratamientos (C, W3, P, W3 + P) resultó antagonista contra alguna de las cepas de *L. monocytogenes* ensayadas, aunque estas presentaron diferentes niveles de sensibilidad.
- En excretas de pollos alimentados solo con harina de chía (W3), es posible obtener un mayor número de BAL antagonistas sobre *L. monocytogenes*. La mayoría de los SLC provenientes de este tratamiento, presentan grados de

inhibición elevados (halo mayor a 2 mm) en los ensayos de antagonismo. Sin embargo, la efectividad de antagonismo así como la actividad inhibitoria, difieren según la cepa de *L. monocytogenes* en estudio, presentándose una gran variabilidad en los halos de inhibición medidos.

- El SLC O6 del tratamiento W3 presentó la mayor efectividad, inhibiendo un amplio espectro de cepas de *L. monocytogenes* de origen alimentario (77 %).
- Las cepas B7, C5 y R7 de *L. monocytogenes*, fueron las menos afectadas por las sustancias antimicrobianas producidas por las BAL.
- El SLC 16C de la condición control, manifestó una alta actividad inhibitoria sobre la cepa HH5 (aislamiento muy tolerante a la salinidad).

Los estudios realizados en esta Tesis generan aportes científicos acerca de la variabilidad fenotípica que presenta la especie *L. monocytogenes*, evidenciando diferencias importantes en cuanto a su comportamiento en condiciones *in vitro* y explicando en parte su difícil eliminación en las plantas de procesado. Los resultados obtenidos contribuyen a promover un control integral sobre *L. monocytogenes* durante la cadena de producción avícola, para que los productos cárnicos de origen aviar lleguen a las bocas de expendio con una calidad microbiológica adecuada. Estos datos servirán como base para posteriores investigaciones en diferentes etapas de la cadena productiva.

Debido a su origen natural y a que son consideradas bacterias GRAS, las BAL nativas mejor antagonistas en cuanto a su efectividad y/o grado de inhibición (16C, 20C, O6, O11 y OP5), resultan de especial interés para estudios subsiguientes. En primer lugar, surge la posibilidad de que estos microorganismos puedan evaluarse como potenciales agentes probióticos en la alimentación animal. Asimismo, las sustancias producidas por estas BAL podrían ser aprovechadas como punto de partida en la obtención de sanitizantes naturales o incluso de bioconservantes de alimentos.

El desarrollo de estrategias tendientes a prevenir y/o reducir la propagación de *L. monocytogenes*, es clave para la salud pública. En este aspecto, las medidas basadas en métodos biológicos que incluyan el empleo de BAL nativas, son de particular importancia. Esto representa una herramienta fundamental para promover la inocuidad alimentaria de manera sustentable, segura y eficiente.



Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

Abbasiliasi S, Tanc J.S, Ibrahimdg T.A.T, Bashokouhd F, Ramakrishnane N.R, Mustafa S, Ariff A.B. (2017). Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: A Review. RSC Adv; 7, 29395-29420.

Abee T, Krockel L, Hill C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potential in food preservation and control of food poisoning. International Journal of Food Microbiology; 28, 169-185.

Abriouel H, Franz C.M.A.P, Omar N.B, Gálvez A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. FEMS Microbiology Reviews; 35, (1), 201-232.

Acosta Chávez A.J. (2015). Efecto de dos concentraciones de cloruro de sodio y dos temperaturas en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al Título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras. Disponible en: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4527/1/AGI-2015-002.pdf>

Adamcic M & Clark D.S. (1970). Bacteria-induced biochemical changes in chicken skin stored at 5° C. Journal of Food Science; 35, (2), 103-106.

Adil S, Banday M.T, Bhat G.A, Qureshi S.D, Wan S.A. (2011). Effect of supplemental organic acids on growth performance and gut microbial population of broiler chicken.

Livestock Research for Rural Development; 23 (1), 1-8.

Agudelo Londoño N, Torres Taborda M, Alvarez López C, Vélez Acosta L. (2015). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. *Revista Alimentos Hoy*; 23, (36), 186.

Ahmed S.S, Tayeb B.A, Ameen A.M, Merza S.M, Sharif Y.H.M. (2016). Isolation and detection of *Listeria monocytogenes* in minced meat, frozen chicken and cheese in Duhok Province, Kurdistan Region by using RT-PCR. *J Food Ind Microbiol*; (2), 1.

Alpas H, Kalchayanand N, Bozoglu F, Ray B. (1998). Interaction of pressure, time and temperature of pressurization on viability loss of *Listeria innocua*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*; 14, 251-253.

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 foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*; 60, 33-42.

Alsheikh A.D.I, Mohammed G.E, Abdalla M.A. (2013). Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from retail broiler chicken ready to eat meat products in Sudan. *International Journal of Animal and Veterinary Advances*; 5, (1), 9-14.

Ammor S, Rachman C, Chaillou S, Prevost S, Dousset X, Zagorec M, Dufour E, Chevallier I. (2005). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria

isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*; 22, 373-382.

Ammor S, Tauveron G, Dufour E, Chevallier I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*; 17, 454-461.

Angelo K.M, Conrad A.R, Saupe A, Dragoo H, West N, Sorenson A, Barnes A, Doyle M, Beal J, Jackson K.A, Stroika S, Tarr C, Kucerova Z, Lance S, Gould L.H, Wise M, Jackson B.R. (2017). Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to whole apples used in commercially produced, prepackaged caramel apples: United States, 2014-2015. *Epidemiol Infect*; 145 (5), 848-856.

ANMAT. (2018). Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Argentina. Disponible en: https://www.aam.org.ar/src/img_up/16092018.2.pdf

ANMAT. (2019). Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Argentina. Disponible en:

<http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/Enfermedades%20transmitidas%20por%20alimentos.pdf>

ANMAT. (2020). Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Boletín Oficial de la República Argentina. Legislación y Avisos Oficiales. Disposición 1413/2020. Argentina.

Anon. (1998). Residues and reassurance. *International Pig Topic*; (13), 10.

Apajalahti J.H.A & Kettunen A. (2003). Efecto de la dieta sobre la flora microbiana en el tracto gastrointestinal de aves. *Producción Animal*; 189, (18), 51-59.

Augustin J.C & Carlier V. (2000). Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. *Int J Food Microbiol*; 56, 53-70.

Awad W.A, Ghareeb K, Böhm J. (2010). Effect of addition of a probiotic microorganism to broiler diets on intestinal mucosal architecture and electrophysiological parameters. *Animal Physiology and Animal Nutrition*; 94, 486-494.

Ayaz N.D, Ayaz Y, Kalan Y.Z, Aylin Kasimoglu Dogru A, Aksoy M.H. (2009). Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in chicken carcasses by IMS-PCR. *Annals of Microbiology*; 59 (4), 741-744.

Azadnia P, Zamani M.H, Shah Ahmad Ghasemi, Khalegh Babaki A, Karimi Jashni M, Taarof N. (2011). Isolation and indentification of thermophilic Lactobacilli from tradicional yogurts of tribes of Kaserum. *Journal of Animal and Veterinary Advances*; 10, (6), 774-776.

Babel F. (1977). Antibiosis by lactic cultures bacteria. *Journal of Dairy Science*; 60, 815-821.

Badaoui Najjar M, Chikindas M, Montville T.J. (2007). Changes in *Listeria monocytogenes* membrane fluidity in response to temperature stress. *Appl Environ Microbiol*; 73, (20), 6429-6435.

Bai J, Kim Y.T, Ryu S, Lee J.H. (2016). Biocontrol and rapid detection of food-borne pathogens using bacteriophages and endolysins. *Front Microbiol*; 7, 474.

Balanza Roure R. (2008). Efectos metabólicos-terapéuticos a corto y largo plazo de la suplementación con fibra dietética. Tesis Doctoral. Universitat Rovira i Virgili. ISBN: 978-84-690-7625-5.

Barajas Maldonado A. (2019). Argentina: más de 2 millones de toneladas de pollo en 2019. *Rev Industria Avícola*. Disponible en:
<https://www.industriaavicola.net/mercados-y-negocios/argentina-mas-de-dos-millones-de-toneladas-de-pollo-en-2019/>

Barmpalia Davis I.M, Geornaras I, Kendall P.A, Sofos J.N. (2008). Differences in survival among 13 *Listeria monocytogenes* strains in a dynamic model of the stomach and small intestine. *Appl Environ Microbiol*; 74, 5563-5567.

Barnhart E.T, Sarlin I.L, Caldwell D.J, Byrd J.A, Corrier D.E, Hargis B.M. (1999). Evaluation of potential disinfectants for preslaughter broiler crop decontamination. *Poultry Science*; 78, 32-37.

Barton D. (2000). Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. Australia. *Nutrition Research Reviews*; 13, (2), 279-299.

Bayles D.O & Wilkinson B.J. (2000). Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol; 30, 23-27.

Bedolla Bernal S. (2004). Introducción a la Tecnología de los Alimentos. México, D.F. Ed. Limusa; 78.

Begot C, Lebert I, Lebert A. (1997). Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. Food Microbiol; 14, 403-412.

Bell C & Kyriakides A. (1998). *Listeria: A practical approach to the organism and its control in foods*. London: Blackie Academic & Professional. U.S.A.; (1), IX, 150 p.

Bengmark S. (2017). Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. Disponible en: <https://gut.bmj.com/>

Bergey D.H & Holt J.G. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edition, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland. U.S.A.; 787 p.

Bergholz P.W, Bakermans C, Tiedje J.M. (2009). *Psychrobacter arcticus* 273-4 uses resource efficiency and molecular motion adaptations for subzero temperature growth. J. Bacteriol; 191, 2340-2352.

Bergholz T.M, den Bakker H, Fortes E, Boor K, Wiedmann M. (2010). Salt stress phenotypes in *Listeria monocytogenes*. Vary by genetic lineage and temperature. *Foodborne Pathogens and Disease*; (7), 12, 1537-1549.

Bergholz T.M, Bowen B, Wiedmann M, Boor K.J. (2012). *Listeria monocytogenes* shows temperature-dependent and -independent responses to salt stress, including responses that induce cross-protection against other stresses. *Appl Environ Microbiol*; 78, (8), 2602-2612.

Bergholz T.M, Shah M.K, Burall L.S, Rakic Martinez M, Datta A.R (2018). Genomic and phenotypic diversity of *Listeria monocytogenes* clonal complexes associated with human listeriosis. *Appl Microbiol Biotechnol*; 102, 3475–3485.

Bertrand C, Ivanova I, Dalgalarrrondo M, Haertllé T. (2003). Evolution of β -lactoglobulin and α -lactoalbumin content during yogurt fermentation. *International Dairy Journal*; 13, 39-45.

Beshkova D & Frengova G. (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Eng Life Sci*; 12, 419-432.

Bille J, Catimel B, Bannerman E, Jacquet C, Yersin M.N, Caniaux I, Monget D, Rocourt J. (1992). API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. *Appl Environ Microbiol*; 58, 1857-1860.

Blajman J, Gaziano C, Zbrun M.V, Soto L, Astesana D, Berisvil A, Scharpen A.R, Signorini M, Frizzo L. (2015). *In vitro* and *in vivo* screening of native lactic acid bacteria toward their selection as a probiotic in broiler chickens. *Res Vet Sci*; 101, 50-56.

Blanco S, Delahaye P, Fragenas N. (2006). Evaluación física y nutricional de un yogurt con frutas tropicales bajo en calorías. *Revista Facultad de Agronomía* 32; 131-144.

Blanco Massani M, Epifane E, Vignolo G (2007). Purificación de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus curvatus* CRL705 para su uso en envases de productos cárnicos. Conference: 6° Jornadas de Desarrollo e Innovación Tecnológica 2007. INTI. Argentina.

Boerlin P & Piffaretti J.C. (1991). Typing of human, animal, food, and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*; 57, 1624-1629.

Bomba A, Nemcová R, Gancarcíková S, Herich R, Pisl J, Révajová V, Jonecová Z, Bugarský A, Levkut M, Kaštel' R, Baran M, Lazar G, Hluchy' M, Maršálková S, Pošivák, J. (2003). The influence of omega-3 polyunsaturated fatty acids on *Lactobacilli* adhesion to the intestinal mucosa and on immunity in gnotobiotic piglets. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*; 116, 312-316.

Brillet A, Pilet M.F, Prevost H, Leroi F. (2004). Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocina-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *J Appl Microbiol*; 97, 1029-1037.

Buchanan, R.L & Cygnarowicz M.L. (1990). A mathematical approach toward defining and calculating the duration of the lag phase. *Food Microbiol*; 7, 237-240.

Buchanan R.L, Gorris L.G, Hayman M.M, Jackson T.C, Whiting R.C. (2017). A Review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*; 75, 1-13.

Buchrieser C. (2007). Biodiversity of the species *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. *Microbes Infec*; 9: 1147-1155.

Bucio A, Harteminka R, Schrama J, Verreth J.M, Rombouts F. (2006). Presence of Lactobacilli in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with a recirculation system. *Food Microbiology*; 23, (5), 476-482. 396.

Bucur F.I, Grigore Gurgu L, Crauwels P, Riedel C.U, Nicolau A.I. (2018). Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments. *Front Microbiol*; 9, 2700.

Bueno D.J, López N, Rodriguez F.I, Procura F. (2016). Producción de pollos parrilleros en países sudamericanos y planes sanitarios nacionales para el control de *Salmonella* en dichos animales. *Rev Agron Noroeste Argent*; 36, (2), 11-37.

Bungenstock L, Abdulmawjood A, Reich F. (2020). Evaluation of antibacterial properties of lactic acid bacteria from traditionally and industrially produced fermented sausages from Germany. *Plos One*; 15, (3), e0230345.

Burgess C.M, Gianotti A, Gruzdev N, Holah J, Knøchel S, Lehner A. (2016). The response of foodborne pathogens to osmotic and desiccation stresses in the food chain. *Int J Food Microbiol*; 221, 37-53.

Busilacchi H, Qüesta T, Zuliani S. (2015). La chía como una nueva alternativa productiva para la región pampeana. *Agromensajes*; 41, 37-46.

Bustos A.Y, Gerez C.L, Mohtar L.G, Paz Zanini V.I, Nazareno M.A. (2017). Lactic acid fermentation improved textural behaviour, phenolic compounds and antioxidant activity of chia (*Salvia hispanica* L.) dough. *Faculty Food Technology Biotechnology. Food Technology and Biotechnology*; 55, (3), 381-389.

Callejo R, Prieto M, Martínez C, Aguerre L, Rocca F, Martínez G, Palmieri O. (2008). Estudio mediante PCR múltiple de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*; (40), 89-92.

Camargo A.C, Todorov S.D, Chihib N.E, Drider D, Nero L.A. (2018). Lactic Acid Bacteria (LAB) and their bacteriocins as alternative biotechnological tools to control *Listeria monocytogenes* biofilms in food processing facilities. *Mol Biotechnol*; 60, (9), 712-726.

Camejo A, Carvalho F, Reis O, Leitão E, Sousa S, Cabanes D. (2011). The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence*; 2, 379-394.

Capitani M.I. (2013). Caracterización y funcionalidad de subproductos de chía (*Salvia hispanica* L.) aplicación en tecnología de alimentos. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Cardillo A.L, Salerno C.M, Arenaz F, Rodríguez Ganduglia, H.R. (2009). Detección de *Listeria monocytogenes* en un frigorífico destinado a la faena de conejos en la zona de Bahía Blanca. III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Córdoba. Argentina.

Carlier V, Augustin J.C, Rozier J. (1996). Heat resistance of *Listeria monocytogenes* (phagovar 2389/2425/3274/2671/47/108/340): D- and z-values in ham. J Food Prot; 59, (6), 588-591.

Carrascal A.K, Correa C, Fonseca J. (2007). Detección de *Listeria monocytogenes* en expendios de pollo procesado en la zona suroccidental de Bogotá, D.C. Lab Actual; (23), 29-32.

Carrasco E, Pérez Rodríguez F, Valero A, García Gimeno R.M, Zurera G. (2007). Survey of temperature and consumption patterns of fresh-cut leafy green salads: risk factors for listeriosis. J Food Prot; 70, 2407-2412.

Castellano P, Belfiore C, Fadda S, Vignolo G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. Meat Science; 79, (3), 483-499.

Castro H, Jaakkonen A, Hakkinen M, Korkeala H, Lindström M. (2018). Occurrence, persistence, and contamination routes of *Listeria monocytogenes* genotypes on three finnish fairy cattle farms: a longitudinal study. *Appl Environ Microbiol*; 84, (4), e02000-17.

Cauwerts K, Pasmans F, Devriese L.A, Haesebrouck F, Decostere A. (2006). Cloacal *Lactobacillus* isolates from broilers often display resistance toward tetracycline antibiotics. *Microb Drug Resist*; 12, 284-288.

Centurion M.S & Takajara M.E (2004). Determinación de la incidencia de *Listeria monocytogenes* en pollos frescos y verduras obtenidos en mercados y centros de abastecimiento de Lima Metropolitana. Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico.

Disponible en: http://www.cybertesis.adu.pe/sisbib/2004/centurion_pm/pdf.

CEPA. (2019). Centro de Empresas Procesadoras Avícolas. Disponible en: <https://aviculturaargentina.com.ar/#>

Cervantes E. (2002). El pollo paso a paso su proceso industrial. 1° Edición. Ediciones Científicas Beta E.U. Barranquilla. Colombia; 17-73.

Cervantes E. (2005). Procesamiento de aves: cómo alcanzar el grado A. Itinerario del control de calidad. 1° Edición. Ediciones Científicas Beta E.U. Barranquilla. Colombia; 23-48.

Chasseignaux E, Toquin M.T, Ragimbeau C, Salvat G, Colin P, Ermel G. (2001). Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry- and pork-processing plants. *J Appl Microbiol*; (91), 888-899.

Chen H & Hoover D.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive reviews. Food Science and Food Safety*; 2, 82-100.

Chen J, Luo X, Jiang L, Jin P, Wei W, Liu D. (2009). Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. *Food Microbiol*; 26, 103-111.

Chila Covachina M. (2014). Efecto de hidroxitirosol de origen natural sobre el desempeño de las aves. Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires. 34 p.

Chukwu O.O.C, Olabode O.A, Chukwu I.D, Enweani I.B, Nimzing L. (2007). Effect of temperatura, pH and sodium chloride concentration variation on the survival of *Listeria monocytogenes* in cabbage and lettuce juice. *Nig J Biotech*; 18, 7-12.

Cintas L, Casaus M, Herranz C, Nes I, Hernández P. (2001). Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology*; 7, (4), 281-305.

Cisek A & Binek M. (2014). Chicken intestinal microbiota function with a special emphasis on the role of probiotic bacteria. *Polish Journal of Veterinary Sciences*; 17, (2), 385-394.

Clements L, Miller B, Streips U. (2001). Comparative growth analysis of de facultative anaerobes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* and *Escherichia coli*. Syst Appl Microbiol; 25, 284-286.

Cleveland J, Monteville T.J, Nes I.F, Chikindas M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Intenacional Journal of Food Microbiology; 71, (1), 1-20.

Cobb. (2013). Guía de manejo del pollo de engorde. Disponible en: www.cobb-vantress.com

Codex Alimentarius. (2007). Directrices sobre la aplicación de principios generales de higiene de los alimentos para el control de *Listeria monocytogenes* en los alimentos. CAC/GL 61. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a1552s/A1552S00.pdf>

Código Alimentario Argentino (CAA). (2018). Ley 18284. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp

Cole M.B, Jones M.V, Holyoak C. (1990). The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. J Appl Bacteriol; 69, 63-72.

Cortés A.C, Avila E.G, Casaubon T, Carrillo S. (2000). El efecto del *Bacillus toyoi* sobre el comportamiento productivo en pollos de engorde. Rev Veterinaria de México; 31, 4.

Cossart P, Pizarro Cerda J, Lecuit M. (2003). Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. Trends Cell Biol; 13, 23-31.

Cotter P.D, Hill C, Ross R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology; 3, (10), 777-788.

Cruz Pulido W.L, Rivera Sánchez G, Ávila Aguilar S, Cantú Ramírez R, Garza González E, Sierra Juárez G, Téllez Luis S, Bocanegra García V. (2012). *Listeria* sp. y *Listeria monocytogenes* en pollo congelado: detección por NOM-143-SSA1- 1995 y PCR de expendios comerciales de Matamoros y Reynosa, Tamaulipas, México. Ciencia UAT; 6, (3), 41-47.

Daeschel M. (1998). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservative. Food Technology; 43, 164-167.

Danzeisen J.L, Kim H.B, Isaacson R.E, Tu Z.J, Johnson T.J. (2011). Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. Plos One; 6, e27949.

De Ancos B, Muñoz M, Gómez R, Sánchez Moreno C, Cano P. (2006). Nuevos sistemas emergentes de higienización en el procesado mínimo de alimentos vegetales. I Simposio Ibero-Americano de Vegetales Frescos Cortados, San Pedro, SP Brasil.

Dec M, Urban Chmiel R, Stępień Pyśniak D, Wernicki A. (2017). Assessment of

antibiotic susceptibility in *Lactobacillus* isolates from chickens. Gut Pathogens; 9, 54.

de la Fuente Salcido N.M & Barboza Corona J.E. (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. Ciencias de la Salud. Universidad de Guanajuato. Acta Universitaria; 20, (1), 43-52.

Delves Broughton J. (2005). Nisin as a food preservative. Food Australia; 57, (12), 525-527.

de Man J.C, Rogosa M, Sharpe M.E. (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. J Appl Bact; 23, 130-135.

den Bakker H.C, Didelot X, Fortes E.D, Nightingale K.K, Wiedmann M. (2008). Lineage specific recombination rates and micro-evolution in *Listeria monocytogenes*. BMC Evol Biol; 8, 277.

Devlieghere F, Vermeiren L, Debevere J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. Review International Dairy Journal; 14, 273-285.

de Zwart F.J, Slow S, Payne R.J, Lever M, George P.M, Gerrard J.A, Chambers S.T (2003). Glycine betaine and glycine betaine analogues in common foods. Food Chem; 83 (2), 197-204.

Diaz Carrasco J.M, Casanova N.A, Fernández Miyakawa M.E. (2019). Microbiota, gut health and chicken productivity: What is the connection?. Microorganisms; 7, 374.

Díaz López E.A, Ángel Isaza J, Ángel D. (2017). Probióticos en la avicultura: Una revisión. Rev Med Vet; (35), 175-189.

Dirección de Ganadería Bovina, Porcina y Avícola. (2012). Información de la actividad avícola en Entre Ríos. En Ministerio de Producción de Entre Ríos. Disponible en: https://www.entrerios.gov.ar/minpro/userfiles/files/Avicultura_%202012.pdf

Di Rienzo J.A, Casanoves F, Balzarini M.G, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C.W. (2013). InfoStat versión. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>.

Di Schiavi M. A. (2015). Análisis comparativo entre ácido láctico y ácido cítrico en la desinfección de las carcasas de pollos en el sector de trozado, en una planta de faena. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA. Tandil. Argentina.

Domenech R. (2017). Seguimos con una faena récord de 2 millones de pollos por día. Producción Avícola en Argentina. Motivar. Disponible en: <https://www.motivar.com.ar/tag/informe-especial-produccion-avicola-en-argentina/>

Domenech R. (2018). Sector avícola argentino mejora su mercado interno y exportador 2018. Rev AviNews América Latina. Disponible en: <https://avicultura.info/sector-avicola-argentino-mejora-su-mercado-interno-y-exportador-2018/>

dos Santos A.J. (2007). Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos. Memoria presentada para

optar al Título de Doctor en Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria.

Doyle M.E, Mazzotta A, Wang T, Wiseman D, Scott V. (2001). Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. J Food Prot; 64, (3), 410-429.

Duboc P & Mollet B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. International Dairy Journal; 11, 759-768.

Duché O, Trémoulet F, Glaser P, Labadie J. (2002). Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol; 68, (4), 1491-1498.

Early R. (2000). Tecnología de los productos lácteos. Editorial Acribia Zaragoza, España; 36- 51.

EFSA. (2007). European Food Safety Authority. Introduction of a Qualified Presumption of Safety, QPS. Approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. EFSA J; 587, 1-16.

EFSA. (2018). European Food Safety Authority. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* serogroup IVb, multilocus sequence type 6, infections linked to frozen corn and possibly to other frozen vegetables – first update. Supporting Publications; 15, (7). Disponible en: <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-1448>

Ehrmann M.A, Kurzak P, Bauer J, Vogel R.F. (2002). Characterization of Lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. J Appl Microbiol; 92, 966-975.

Ekbal M, Ibrahim A, Elbarbary H.A. (2012). Effect of bacteriocin extracted from *Lactobacillus acidophilus* on the shelflife of pasteurized milk. *Journal of American Science*; 8, (2), 620-626.

Elika. (2013). Ficha Listeria. Disponible en:

http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/.../Copia%20de%204.Listeria.pdf

Endersen L, O'Mahony J, Hill C, Ross P, McAuliffe O, Coffey A. (2014). Phage therapy in the food industry. *Annu Rev Food Sci Technol*; 5, 327-349.

Errecalde J.O. (2004). Estudio: uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública. FAO. *Producción y Sanidad Animal*; 162, 61.

FAO. (2000). Consulta de Expertos FAO/OMS sobre la evaluación de riesgos asociados a los peligros microbiológicos en los alimentos. *Estudio FAO: Alimentación y Nutrición*; 71, 47.

FDA. Food and Drug Administration. (2017). Code of Federal Regulations (Annual edition). Title 21-Food and Drugs.

Disponible en: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/.../cfcfr/cfrsearch.cfm>

Feldman P. (2000). Guía de aplicación de buenas prácticas de manufactura; Faena y proceso de pollo parrilleros. *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos*; 11-42.

Disponible en:

http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_aves/produccion_avicola/30guia_pollos.pdf.

Fernández H.T, Morales M, Amela M.I, Salerno C, Rodríguez Gandulia H, Arenaz F, Zamponi A.M. (2015). Efecto de la adición de Probiótico (*Bacillus subtilis*) y Omega 3 (*Salvia hispanica* L.) sobre los parámetros sanguíneos en pollos parrilleros. Revista Agronómica del Noroeste Argentino; 34, (2), 113-116.

Figuera B.E, Cabello A.M, Villalobos L.B, del Valle Márquez Y, Vallenilla O.M. (2005). Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en atún ahumado empacado al vacío. Zootecnia Tropical; 23, (2), 171-181.

Figuerola López A.M, Chávez Almanza A.F, Cantú Soto E.U, López Cervantes J. (2019). Frecuencia e identificación de *Listeria monocytogenes* aislada de procesos de producción de carne de cerdo. Avances de Investigación en Inocuidad de Alimentos; 2, 1665-5745.

Floriano B, Ruiz Barba J.L, Jiménez Díaz R. (1998). Purification and genetic characterization of Enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. Appl Environ Microbiol; 64, 4883-4890.

Fontes A.L, Pimentel L, Rodríguez Alcalá L.M. (2018). Effect of PUFA substrates on fatty acid profile of *Bifidobacterium breve* Ncimb 702258 and CLA/CLNA Production in Commercial Semi-Skimmed Milk. Sci Rep; 8, 15591.

Franco C.M, Quinto E.J, Fente C, Rodriguez Otero J.L, Dominguez L, Cepeda A. (1995) Determination of the principal sources of *Listeria* spp. contamination in poultry meat and a poultry processing plant. J Food Prot; 12, 1320-1325.

Francois K, Valero A, Geeraerd A.H, Van Impe J.F, Debevere J, García Gimeno R.M, Zurera G, Devlieghere F. (2007). Effect of preincubation temperature and pH on the individual cell lag phase of *Listeria monocytogenes*, cultured at refrigeration temperatures. Food Microbiol; 24, (1), 32-43.

Freitag N.E, Port G.C, Miner M.D. (2009). *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. Nat Rev Microbiol; 7, (9). 623-628.

Fuller R. & Brooker B.E. (1974). Lactobacilli which attach to the crop epithelium of the fowl. Amer J Clin Nutr; 27,1305-1312.

Gálvez H, Abriouel H, López R, Ben Omar N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. International Journal of Food Microbiology; 120, 51-70.

García Y, Boucourt E, Albelo N, Odalys Núñez H, Dieppa O, Torres V, Noda A. (2008). Caracterización química y microbiológica de las excretas de pollos de ceba para su utilización en la obtención de probióticos. Revista Cubana de Ciencia Agrícola; 42, (3), 285-290.

García J.A, Micheloud J.F, Campero C.M, Morrell E.L, Odriozola E.R, Moreir A.R. Enteric listeriosis in grazing steers supplemented with spoiled silage. (2016). Journal of Veterinary Diagnostic Investigation; 28, (1), 65-69.

García Salcedo A.J, Torres Vargas O.L, Ariza Calderón H. (2018). Physical-chemical characterization of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*), amaranth (*Amaranthus caudatus L.*), and chia (*Salvia hispanica L.*) flours and seeds. *Acta Agronómica*; 67, (2), 215-222.

Gardan R, Cossart P, Labadie J. (2003). Identification of *Listeria monocytogenes* genes involved in salt and alkaline-pH tolerance. *Appl Environ Microbiol*; 69, 3137-3143.

Garriga M, Aymerich M.T, Costa S. (2002). Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiol*; 19, 509-518.

Garrity G.M (2005). The Proteobacteria, Part A introductory essays. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Edition, Vol. 2. Brenner D.J, Krieg N.R, Statley J (Eds), Springer-Verlag, New York, U.S.A.; 304 p.

Gautam N & Sharma N. (2009). Bacteriocin: safest approach to preserve food products. *Indian Journal Microbiology*; 49, (3), 204-211.

Gautam N & Sharma N. (2014). Quality attributes of a novel cereal based probiotic product prepared by using food grade lactic acid bacteria. *NISCAIR-CSIR*; 13, (3), 525-530.

Gedde M.M, Higgins D.E, Tilney L.G, Portnoy D.A. (2000). Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*; 68, 999-1003.

Geier M.S, Torok V.A, Allison G.E, Ophel Keller K, Gibson R.A, Munday C, Hughes R.J. (2009). Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid does not influence the intestinal microbial communities of broiler chickens. *Poultry Science*; 88, 2399-2405.

Gnanou Besse N, Dubois Brissonnet F, Lafarge V, Leclerc V. (2000). Effect of various environmental parameters on the recovery of sublethally salt-damaged and acid-damaged *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol*; 89, 944-950.

Goh S.G, Kuan C.H, Loo Y.Y, Chang W.S, Lye Y.L, Soopna P, Tang J.Y, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, Afsah Hejri L, Son R. (2012). *Listeria monocytogenes* in retailed raw chicken meat in Malaysia. *Poultry Science*; 91, (10), 2686-2690.

Gong J, Yu H, Liu T, Gill J.J, Chambers J.R, Wheatcroft R, Sabour P.M. (2008). Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler chickens. *J Appl Microbiol*; 104, (5), 1372-1382.

González G, Encinas J, Garcia Lopez M, Otero A. (2000). Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food Microbiology*; 17, 383-385.

Graham J, Lanser S, Bignardi G, Pedler S, Hollyoak V. (2002). Hospital acquired listeriosis. *J Hosp Infect*; 51, 136-139.

Graves L.M, Helsel L.O, Steigerwalt A.G, Morey R.E, Daneshvar M.I, Roof S.E. (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J Syst Evol Microbiol*; 60, 1280-1288.

Gravesen A, Ramnath M, Rechinger K.B, Andersen N, Jansch L, Hechard Y, Hastings J.W, Knöchel S. (2002). High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*; 148, 2361-2369.

Gray M, Zadoks R.N, Fortes E.D, Dogan B, Cai S, Chen Y, Scott V.N, Gombas P.E, Boor K.J. (2004). *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. *Appl Environ Microbiol*; 70, 5833-5841.

Greco M, Mazzette R, De Santis E, Corona A, Cosseddu A. (2005). Evolution and identification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of Sardinian sausages. *Meat Science*; 69, 733-739.

Grethel M, Pérez M, Bocourt R. (2008). Empleo de probióticos basado en *Bacillus* sp. y de sus endosporas en la producción avícola. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*; 42, (2), 117-122.

Guenther S, Huwyler D, Richard S, Loessner M.J. (2009). Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl Environ Microbiol*; 75 (1), 93-100.

Guillet C, Join Lambert O, Le Monnier A, Leclercq A, Mechai F, Mamzer Bruneel M. (2010). Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis*; 16, 136-138.

Gutiérrez L, Montoya O, Ruiz S. (2005) Evaluación del potencial bactericida de los extractos de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento *in vitro* de *E. coli*, *Salmonella*

sp. y *Listeria monocytogenes*. Revista CENIC Ciencias Biológicas; 36, 1-6.

Gutiérrez M.A (2018). Industria avícola argentina una historia de emprendimiento y trabajo. Rev AviNews América Latina. Disponible en: <https://avicultura.info/industria-avicola-argentina-una-historia-de-emprendimiento-y-trabajo/>

Gutiérrez M. A (2020). Producción de carne de ave continúa creciendo en Argentina en 2020. Rev AviNews América Latina. Disponible en: <https://avicultura.info/produccion-carne-ave-crece-argentina-2020/>

Haddadin M.S.Y. (2010). Effect of olive leaf extracts on the growth and metabolism of two probiotic bacteria of intestinal origin. Pak J Nutr; 9, 787-793.

Hartmann A, Wilke T, Erdmann R. (2011). Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. International Journal of Food Microbiology; 146, (2), 192-199.

Hassan M.R & Ryu K.S. (2012). Naturally derived probiotic supplementation effects on physiological properties and manure gas emission of broiler chickens. J Agric Life Sci; 46, 119-127.

Henderson C. (1973). The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. J Agric Sci; 81, 107.

Heredia Castro P, Hernández Mendoza A, González Córdova A.F, Vallejo Córdoba B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad

antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*; 42, (6), 340-346.

Hernández A, Robles V, Angulo J, De la Cruz O, García J. (2007). Preparation of a whey-based probiotic product with *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium bifidum*. *Food Technology and Biotechnology*; 45, 27-31.

Hidayat M.N, Malaka R, Agustina L, Pakiding W. (2018). Effect of *Lactobacillus* sp. probiotics on intestinal histology, *Escherichia coli* in excreta and broiler performance. *J Indonesian Trop Anim Agric*; 43, (4), 445-452.

Hingston P, Chen J, Dhillon B.K, Laing C, Bertelli C, Gannon V, Tasara T, Allen K, Brinkman F.S, Truelstrup Hansen L, Wang S. (2017b). Genotypes associated with *Listeria monocytogenes* isolates displaying impaired or enhanced tolerances to cold, salt, acid, or desiccation stress. *Front Microbiol*; 8, 369.

HPFB. Health Protection and Food Branch. (2011). Health Canada. Policy on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Bureau of Microbial Hazards, Food Directorate. FD-FSNP 0071.

Hu H, Moake M, Worobo R. (2006). Genetic characterization of antimicrobial peptides. In: Shetty K, Paliyath G, Pometto A, Levin R.E. (Eds). *Food Biotechnology*. 2nd Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida; 1349-1478.

Hutchison M.L, Walters L.D, Moore A, Crookes K.M, Avery S.M. (2004). Effect of length of time before incorporation on survival of pathogenic bacteria present in livestock wastes applied to agricultural soil. *Appl Environ Microbiol*; 70, 5111-5118.

Iacumin L, Manzano M, Comi G. (2016). Phage inactivation of *Listeria monocytogenes* on San Daniele dry-cured ham and elimination of biofilms from equipment and working environments. *Microorganisms*; 4, (1), 4.

Ibourahema C, Dauphin R, Jacqueline D, Thonart P. (2008). Characterization of lactic acid bacteria isolated from poultry farms in Senegal. *Afr J Biotechnol*; 7, 2006-2012.

ICMSF (1996). International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microorganisms in foods. Microbiological specifications for of food pathogens: Listeria monocytogenes*. Blackie Academic & Professional; (5), 141-182.

ICMSF. (1998). International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microorganisms in foods. Microbial Ecology of Food Commodities*. Blackie Academic & Professional; (6), 75.

Infoagro. (2019). Carne aviar: un alza del 13% en la producción en Buenos Aires. *Agronegocios Avicultura*. Disponible en: <https://infoagro.com.ar/carne-aviar-un-alza-del-13-en-la-produccion-en-buenos-aires/>

Isequilla H. (2018). Estudio microbiológico de *Listeria monocytogenes* en cámaras de maduración. Evaluación del protocolo de sanitización vigente. *Especialización en Seguridad Alimentaria*. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/76494/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Itoi S, Abe T, Washio S, Ikuno S, Kanomata Y, Sugita H. (2008). Isolation of halotolerant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from intestinal tract of coastal fish. *International Journal of Food Microbiology*; 121, (1), 116-121.

Izquierdo E, Marchioni E, Aoude Werner D, Hasselmann C, Ennahar S. (2009). Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*; 26, (1), 16-20.

Jacquet C, Gouin E, Jeannel D, Cossart P, Rocourt J. (2002). Expression of ActA, Ami, InlB, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Appl Environ Microbiol*; 68, 616-622.

Jae Suk C, Nam Hee P, Seon Yeong H, Jae Hak S, Inseok K, Kwang K, In, S. (2013). The antibacterial activity of various saturated and unsaturated fatty acids against several oral pathogens. *Journal of Environmental Biology*; 34, (4), 673-676.

James C, James S.J, Hannay N, Purnell G, Barbedo Pinto C, Yaman H. (2007). Decontamination of poultry carcasses using steam or hot water in combination with rapid cooling, chilling or freezing of carcass surfaces. *International Journal of Food Microbiology*; 114, 195-203.

Jantzen M.M, Navas J, de Paz M, Rodríguez B, da Silva W.P, Nuñez M, Martínez Suárez J.V. (2006). Evaluation of ALOA plating medium for its suitability to recover high pressure-injured *Listeria monocytogenes* from ground chicken meat. *Lett Appl Microbiol*; 43, 313-317.

Jeyasekaran G & Karunasagar I. (2000). Effect of sanitizers on *Listeria* biofilm on contact surfaces. *Asian Fisheries Science*; 13, 209-213.

Johnson E.M, Jung D.Y, Jin D.Y, Jayabalan D.R, Yang D.S.H, Suh, J.V. (2017). Bacteriocins as food preservatives: challenges and emerging horizons. *Crit Rev Food Sci Nutr*; 7, 1-25.

Jones R.J, Hussein H.M, Zagorec M, Brightwell G, Tagg J.R. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiology*; 25, (2), 228-234.

Kalchayanand N, Sikes A, Dunne C, Ray B. (1998). Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. *J Food Prot*; 61, (4), 425-431.

Kale S.B, Kurkure N.V, Doijad S.P, Poharkar K.V, Garg S, Rawool D.B, Barbuddhe S.B. (2017). Variations in stress tolerance abilities of diverse *Listeria monocytogenes* isolates. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*; 6, 2246-2258.

Kamat A.S & Nair M.P. (1995). Gamma irradiation as a means to eliminate *Listeria monocytogenes* from frozen chicken meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 69, (4), 415-422.

Kapetanakou A.E, Gkerekou M.A, Vitzilaiou E.S, Skandamis P.N. (2017). Assessing the capacity of growth, survival, and acid adaptive response of *Listeria monocytogenes*

during storage of various cheeses and subsequent simulated gastric digestion. *Int J Food Microbiol*; 246, 50-63.

Katharios Lanwermeijer S, Rakic Martinez M, Elhanafi D, Ratani S, Tiedje J.M, Kathariou S. (2012). Coselection of cadmium and benzalkonium chloride resistance in conjugative transfers from non-pathogenic *Listeria spp.* to other *Listeriae*. *Appl Environ Microbiol*; 78, (21), 7549-7556.

Katla T, Naterstad K, Vancanneyt M, Swings J, Axelsson L. (2003). Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to sakacin P, sakacin A, pediocin PA-1, and nisin. *Appl Environ Microbiol*; 69, (8), 4431-4437.

Karoley D, Barbuddhe N, Kurjure V, Gunjal P. (2005). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry meat in Vidharga a region of India. XVIIth European Symposium on the Quality of Poultry meat Doorwerth. The Netherlands.

Karaoğlu M, Aksu M.I, Esenbuga N, Kaya M, Macit M, Kurbanoglu E.B. (2005). Effect of dietary ram horn hydrolysate (RHH) on the pH and color characteristics of carcasses, breast fillets and drumsticks of broilers. *Int J Food Prop*; 8, 423-438.

Kathariou S. (2002). *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J Food Prot*; 65, 1811-1829.

Kemperman R, Kuipers A, Karsens H, Nauta A, Kuipers O, Kok J. (2003). Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl Environ Microbiol*; 69, 1589-1597.

Khan S.A, Liu L, Lai T, Zhang R, Wei Z, Xiao J, Deng Y, Zhang M. (2018). Phenolic profile, free amino acids composition and antioxidant potential of dried longan fermented by lactic acid bacteria. *Journal of Food Science and Technology*; 55, (12), 4782-4791.

Kishino S, Ogawa J, Omura Y, Matsumura K, Sakayu Shimizu S. (2002). Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. *JAOCS*; 79, (2), 159-163.

Kureljušić J, Rokvić N, Jezdimirović N, Kureljušić B, Pisinov B, Karabasil N. (2017). Isolation and detection of *Listeria monocytogenes* in poultry meat by standard culture methods and PCR. 59th International Meat Industry Conference MEATCON2017. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science; (85), 012069.

Kerr K.G, Birkenhead D, Seale K, Major J, Hawkey P.M. (1993). Prevalence of *Listeria* spp. on the hands of food workers. *J Food Prot*; 56, (6), 525-527.

Kiepek Pearson K & Karatan E. (2005). Biofilm development in bacteria. *Appl Environ Microbiol*; 57, 79-111.

Kremer P.H, Lees J.A, Koopmans M.M, Ferwerda B, Arends A.W, Feller M.M, Schipper K, Valls Seron M, van der Ende A, Brouwer M.C, van de Beek D, Bentley S.D. (2017). Benzalkonium tolerance genes and outcome in *Listeria monocytogenes* meningitis. *Clin Microbiol Infect*; 23, (4), 265.

Laurencio Silva M, Pérez Quintana M, Bocourt Salabarría R, Rondón A.J, Milián Florido G, Díaz Reyes A. (2008). La microbiota del tracto gastrointestinal de las aves y su

contribución al mantenimiento de la eubiosis de este ecosistema. CD de Monografías 2008. Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”. Cuba.

Law J.W, Mutalib N.A, Chan K, Lee L, Lee L. (2015). An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Front Microbiol*; 6, 1227.

Leclercq A, Clermont D, Bizet C, Grimont P.A, Le Fleche Mateos A, Roche S.M. (2010). *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*; 60, 2010-2014.

Lee N, Yun C, Kim S, Chang H, Kang C, Paik H. (2008). Screening of Lactobacilli derived from chicken feces and partial characterization of *Lactobacillus acidophilus* A12 as an animal probiotics. *J Microbiol Biotechnol*; 18, 338-342.

Lindgren S & Dobrogosz W. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*; 87, 149-164.

Liu S, Graham J.E, Bigelow L, Morse P.D, Wilkinson B.J. (2002). Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Appl Environ Microbiol*; 68, (4), 1697-1705.

Liu D, Lawrence M, Ainsworth A, Austin F. (2007). Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. *Int J Food Microbiol*; 118, 101-115.

Li K.Y & Torres J.A. (1993). Effects of temperature and solute on the minimum water activity for growth and temperature characteristic of selected mesophiles and

psychrotrophs. *Journal of Food Processing and Preservation*; 17, 305-318.

Londero A. (2012). Alimentos funcionales: obtención de un producto probiótico para aves a partir de suero de quesería fermentado con microorganismos de kéfir. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

López Acevedo E.A, Aguirre Guzmán G, Vázquez Saucedo M.L. (2013). Probióticos, una herramienta en la producción pecuaria y acuícola. *Scientia Agropecuaria*; 2, 129-137.

Lu J, Idris U, Harman B, Ofacre C, Murer J.Y, Lee M. (2003). Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broilers chicken. *Appl Environ Microbiol*; 69, (11), 6816-6824.

Lunden J, Autio T.R, Korkeala H.L. (2002). Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food processing plants associated with a dicing machine. *J Food Prot*; (65), 1129-1133.

Lunden J.M. (2004). Persistent *Listeria monocytogenes* contamination in food processing plants. Department of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland, 60 p.

Macedo M.G, Lacroix C, Gardner N.J, Champagne C.P. (2002). Efect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. *International Dairy Journal*; 12, 419-426.

Madigan M.T, Martinko J.M, Parker J. (1997). Brock Biology of Microorganisms. Ed. Prentice Hall International. U.S.A. Inc; 149-177.

Majidzadeh Heravi R, Kermanshahi H, Sankian M, Nassiri M.R, Heravi Moussavi A, Roozbeh Nasiraii L, Varasteh A.R. (2011). Screening of Lactobacilli bacteria isolated from gastrointestinal tract of broiler chickens for their use as probiotic. African Journal of Microbiology Research; 5, (14), 1858-1868.

Malekmohammadi S, Kodjovi K.K, Sherwood J, Bergholz T.M. (2017). Genetic and environmental factors influence *Listeria monocytogenes* nisin resistance. J Appl Microbiol; 123, (1), 262-270.

Marcinek K & Krejpcio Z. (2017). Chía seeds (*Salvia hispanica*): Health promoting properties and therapeutic applications- a Review. Rocz Panstw Zakl Hig; 68, (2), 123-129.

Marguet E, Vallejo M, Sierralta Chichisola V, Quispe J. (2011). Actividad antagonista de bacterias lácticas aisladas del medio marino contra cepas de *Listeria*. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana; 45, (2), 305-310.

Marzocca M, Marucci P, Sica M, Alvarez, E. (2004). Detección de *Listeria monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras de ambientes de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de Bahía Blanca, Argentina. Revista Argentina de Microbiología; 36, 179-181.

Martínez Galán P, Martín Gallardo E, Velamazán Martínez D. (2016). Listeriosis y gestación. Revisión de la evidencia científica actual. Revista Matronas; (2). 4.

McAuliffe O, Ross R.P, Hill C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. Microbiology Reviews; 25, 285-308.

McFarland J (1907). The Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. J Am Med Assoc; 14, 1176-1178.

McKay L & Baldwin K. (1990). Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews; 87, 3-14

McLauchlin J, Mitchell R, Smerdon W, Jewell K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: A review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. Int J Food Microbiol; 92, 15-33.

McLauchlin J, Aird H, Amar C, Barker C, Dallman T, Elviss N, Jorgensen F, Willis C. (2020). *Listeria monocytogenes* in cooked chicken: Detection of an outbreak in the UK (2016-2017) and analysis of *L. monocytogenes* from unrelated monitoring of foods (2013-2017). J Food Prot; 20-188.

McMeekin T.A, Olley J.N, Ross T, Ratkowsky D.A. (1993). Predictive Microbiology: Theory and Application. Research Studies Press, Taunton, UK; J. Wiley & Sons Inc., New York, U.S.A.; 130 p.

McMeekin T.A, Olley J, Ratkowsky D.A, Ross T, (2002). Predictive microbiology: Towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology*; 73, 395-407.

McMullen P.D & Freitag N.E. (2015). *Listeria monocytogenes*. Chapter 74. *Molecular Medical Microbiology*; 1345-1361.

MECON. (2016). Ministerio de Economía. Presidencia de la Nación. ISSN 2525-0221

Disponible en:

https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sspe_cadena_de_valor_aviar.pdf

Medina M, Gaya P, Núñez M. (1992). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas. *Revista Española de Lechería*; 34, 28-32.

Medina Saavedra T, Arroyo Figueroa G, Herrera Méndez C. (2017). *Bacillus subtilis* como probiótico en avicultura: Aspectos relevantes en investigaciones recientes. *AbanicoVet*; 7, (3), 14-20.

Michanie S. (2004). *Listeria monocytogenes*. La bacteria emergente de los 80. *Ganados & Carnes*. Año 4, N° 18: 34-37. Disponible en: <http://www.bpmyhaccp.com.ar>

Milián G, Rondón A.J, Pérez M, Bocourt R, Rodríguez Z, Ranilla M.J, Rodríguez M, Carro M.D. (2013). Evaluación de biopreparados de *Bacillus subtilis* como promotores del crecimiento en pollos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*; 47, (1), 61-66.

Millán G, Pérez M, Puentes Y, Bocourt R. (2007). Empleo de probióticos a base de *Bacillus* spp. y sus endosporas en la producción avícola. Revista Cubana de Ciencia Agrícola; 42, (2), 117- 122.

Ministerio de Agroindustria. (2016). Boletín Avícola N° 77. Presidencia de la Nación. Disponible en:

https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/aves/informes/boletines/_archivos//000000_Datos%20Hist%C3%B3ricos/000077_Nro77%20Julio%202016.pdf

Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas. (2016). Presidencia de la Nación. Informes de Cadena de Valor. Cárnica - Aviar. Año 1, N° 5. ISSN 2525-0221.

Mital B & Satyendra K. (1995). Anticarcinogenic, hipocolesterolemia and antagonistic activities of *Lactobacillus acidophilus*. Critical Reviews in Microbiology; 21, (3), 175-214.

Mokoena M. P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against Uropathogens: A mini-review. Molecules (Basel, Switzerland); 22, (8), 1255.

Molero G, Tarradas C, Ramírez I., Gallardo F, Montiel M. (2010). Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* durante el proceso de beneficio de pollos en plantas beneficiadoras en el estado Zulia, Venezuela. Ciencia; 18, (2), 108-114.

Mondragón Preciado G, Escalante Minakata P, Osuna Castro J.A, Ibarra Junquera V,

Morlett Chávez J.A, Aguilar González C.N, Rodríguez Herrera R. (2013). Bacteriocinas: Características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*; 21, (59), 64-70.

Monroy D.M.C, Castro B.T, Fernández P.F.J, Mayorga R.L. (2009). Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Contactos*; 73, 63-72.

Moreno B. (2006). *Higiene e Inspección de Carnes*. 2^{da} Edición. Díaz de Santos, España; (1), 646.

Moreno Córdova Y.L & Mercado Martínez P. (2014). Sensibilidad bacteriana de cultivos de *Listeria* de lugares de expendio de pescado de mercados de la ciudad de Trujillo, Perú. *REBIOLEST*; 2, (1), e25.

Mortarjemi Y. (2002). Chronic sequele of foodborne infections. In: Blackburn C, McClure P (Eds). *Foodborne pathogens, hazards, risk analysis and control*. Editorial Woodhead Publishing Limited, UK; 506 p.

Mosso A.L, Jimenez M.E, Vignolo G, LeBlanc J.G, Samman N.C. (2018). Increasing the folate content of tuber based foods using potentially probiotic lactic acid bacteria. *Food Res Int*; (109), 168-174.

Mountney, E. J & O' Malley J. (1965). Acids as poultry meat preservatives. *Poultry Science*; (44), 582-586.

Mountney G.J & Parkhurst C.R. (2001). *Tecnología de productos avícolas*. Ciencia y Tecnología de Los Alimentos Series. Acribia, España; 464 p. ISBN: 84-200-0945-8.

Mountzouris K.C, Tsirtsikos P, Kalamara E, Nitsch S, Schatzmayr G, Fegeros K. (2007). Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. *Poultry Science*; 86, 309.

Mountzouris K.C, Tsirtsikos P, Palamidi I, Arvaniti A, Mohnl M, Schatzmayr G, Fegeros K. (2010). Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. *Poultry Science*; 89, 58-67.

Moura G.F, Tomborelli P.M, Carvalho R.C, Sigarini C.O, Carvalho F.T, Vieira B.S, Figueiredo E.E. (2019). *Listeria monocytogenes* and other species as persistent contaminants in the processing of chicken meat. *J Appl Poult Res*; (28), 470-478.

Mudronová D, Karaffová V, Košcová J, Bartkovský M, Marcincáková D, Popelka P, Klemková T, Certík M, Macanga J, Marcincák S. (2018). Effect of fungal gamma-linolenic acid and beta-carotene containing prefermented feed on immunity and gut of broiler chicken. *Poultry Science*; 97, (12), 4211-4218.

Muhterem Uyar M, Ciolacu L, Wagner K.H, Wagner M, Schmitz Esser S, Stessl B. (2018). New aspects on *Listeria monocytogenes* ST5-ECVI predominance in a heavily contaminated cheese processing environment. *Frontiers in Microbiology*; (9), 64.

Muñoz A.I, Vargas M, Otero L, Díaz G, Guzmán V. (2011). Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y

delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, D.C, 2002-2008. *Biomédica*; (31), 428-439.

Murano E.A, Murano P.S, Brennan R.E, Shenoy K, Moreira R.G. (1999). Application of high hydrostatic pressure to eliminate *Listeria monocytogenes* from fresh pork sausage. *J Food Prot*; 62, (5), 480-483.

Murray E.G.D, Webb R.A, Swann M.B.R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology*; 29, (4), 407-439.

Mutus R, Kocabagli N, Alp M, Acar N, Eren M, Gezen S.S. (2006). The effect of dietary probiotic supplementation on tibial bone characteristics and strength in broilers. *Poultry Science*; 85, 1621-1625.

Naghmouchi K, Drider D, Kheadr E, Lacroix C, Prévost H, Fliss I. (2005). Multiple characterizations of *Listeria monocytogenes* sensitive and insensitive variants to divergicin M35, a new pediocin-like bacteriocin. *J Appl Microbiol*; 100, (1), 29-39.

Nahuelquín Y. (2008). Aplicación de una combinación de bacteriocinas bioencapsuladas, como higienizante de superficies de acero inoxidable. Tesis Lic. Ing. en Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias; 59.

Naidu A.S, Unal R, Tulpinski J. (2006). Bacteriocins: Antimicrobial activity and applications. In: Shetty K, Paliyath G, Pometto A, Levin R.E (Eds). *Food Biotechnology*. 2nd Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A.; 1391-1437.

Naik M.M, Bhangui P, Bhat C. (2017). The first report on *Listeria monocytogenes* producing siderophores and responds positively to N-acyl homoserine lactone (AHL) molecules by enhanced biofilm formation. Arch Microbiol; 199, 1409- 1415.

Navas J, Ortiz S, Martinez Suarez J.V. (2005). Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* in chicken meat enrichments by PCR and reverse-transcription PCR without DNA/RNA isolation. J Food Prot; 68, 407-410.

Navas Fernández J, Monks Jantzen M, Martínez Suárez J.V. (2006). Supervivencia de *Listeria monocytogenes* en el procesado de alimentos: Mecanismos moleculares de la respuesta al estrés. Alimentaria; 371, 60-67.

Nazef L, Belguesmia Y, Tani A, Prévost H, Drider D. (2008). Identification of lactic acid bacteria from poultry feces: Evidence on anti-Campylobacter and anti-Listeria activities. Poultry Science; 87, (2), 329-334.

Nemcova R, Borovska D, Koscova J, Gancarcikova S, Mudronova D, Buleca V, Pistl J. (2012). The effect of supplementation of flax-seed oil on interaction of *Lactobacillus plantarum* – Biocenol™ LP96 and *Escherichia coli* O8:K88ab:H9 in the gut of germ-free piglets. Res Vet Sci; 93, 39-41.

Nierop W, Duse A, Marais E, Aithma N, Thothobolo N, Kassel M, Stewart R, Potgieter A, Fernandes B, Galpin J, Bloomfield S. (2005). Contamination of chicken carcasses in Gauteng, South Africa, by *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter*. Int J Food Microbiol; (99), 1-6.

Nightingale K.K, Lyles K, Ayodele M, Jalan P, Nielsen R, Wiedmann M. (2006). Novel method to identify source-associated phylogenetic clustering shows that *Listeria monocytogenes* includes niche-adapted clonal groups with distinct ecological preferences. J Clin Microbiol; 44, 3742-3751.

O'Bryan C.A, Crandall P.G, Ricke S.C, Ndahetuye J.B (2015a). Lactic Acid Bacteria (LAB) as antimicrobials in food products: Types and mechanisms of action. In: Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality. Woodhead. Oxford, RU; 117-136.

O'Driscoll B, Gahan C.G, Hill C. (1996). Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. Appl Environ Microbiol; 62, (5), 1693-1698.

Ogawa J, Matsumura K, Kishino S, Omura Y, Shimizu S. (2001). Conjugated linoleic acid accumulation via 10-Hydroxy-12-octadecaenoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus*. Appl Environ Microbiol; 67, 1246-1252.

O'Keeffe T & Hill C. (2000). Potential in food preservation. In: Bacteriocins. Ed: Robinson. Encyclopedia of Food Microbiology. Editorial Academic Press. Londres. Gran Bretaña; 183-191.

Olbrich dos Santos K.M, da Silva Oliveira J, Silva Vieira A.D, Ferreira da Silva L.M, Gombossy de Melo Franco B.D, Dimitrov Todorov S. (2011). Screening for anti-*Listeria* bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from goat milk in Ceará, Brazil.

EMBRAPA. Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. Brazil.

Olier M, Pierre F, Lemaitre J, Divies C, Rousset A, Guzzo J. (2002). Assessment of the pathogenic potential of two *Listeria monocytogenes* human faecal carriage isolates. *Microbiology*; 148, 1855-1862.

OMS. (2018). Organización Mundial de la Salud. Listeriosis. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>

OMS. (2020). Organización Mundial de la Salud. Inocuidad de los alimentos. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>

Ordóñez Pereda J.A, Juárez Iglesias M, Zurera Cosano G, Otero Carballeira A. (2004). Aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos. Opinión del Comité Científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Presidencia de la AESA, en relación con la aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos. Núm. Referencia: AESA-2003-004.

Orsi R.H, Bakker H, Wiedmann M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol*; 301, 79-96.

Osaili T.M, Alaboudi A.R, Nesiari E.A. (2011). Prevalence of *Listeria* spp. and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from raw chicken and ready-to-eat chicken products in Jordan. *Food Control*; (22), 586-590.

O'Sullivan L, Ross R, Hill C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*; 84, 593-604.

Ouwehand A.C. (1998). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen S, Von Wright A (Eds). *Lactic Acid Bacteria*. 2nd Edition. Microbiology and Functional Aspects, U.S.A.; 139-160.

Ovissipour M, Shihoodi S.G, Rasco B, Tang J. (2018). Electrolyzed water and mild-thermal processing of atlantic salmon (*Salmo salar*): Reduction of *Listeria monocytogenes* and changes in protein structure. *International Journal of Food Microbiology*; 276, 10–19.

Owens B, Tucker L, Collins M.A, McCracken K.J. (2008). Effects of different feed additives alone or in combination on broiler performance, gut micro flora and ileal histology. *British Poultry Science*; 49, (2), 202-212.

Paço R, Leme I, Bottino J, Piantino A. (2003). Identification of *Lactobacillus* spp. from broiler litter in Brazil. *Braz J Microbiol*; 34, 236-237.

Palacios M. (2009). Uso de anticoccidiales y promotores de crecimiento en el desarrollo de la salud intestinal del broiler.

Disponible en: <http://www.ameveaecuador.org/datos/USO%20DE%20Anticoccidiales%20Y%20Promotores%20de%20Crecimiento%20En%20El.pdf>.

Pan Y, Breidt F, Kathariou S. (2006). Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Appl Environ Microbiol*; 72, (12), 7711-7717.

Parra R. (2010). Bacterias Ácido Lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*; 8, (1), 93-105.

Park S.H & Kang D.H. (2018). Effect of temperature on chlorine dioxide inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on spinach, tomatoes, stainless steel, and glass surfaces. *International Journal of Food Microbiology*; 275, 39-45.

Pascual Anderson M.R & Calderón y Pascual V. (2000). *Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. 2^{da} Edición. Ed. Díaz de Santos, Madrid, España; 441 p.

Peinado J, Echávarri A, Suárez Pereira E, Ortiz Mellet C, García Fernández J.M, Rubio L.A. (2013a). Effects of inulin and di-d-fructose dianhydride-enriched caramels on intestinal microbiota composition and performance of broiler chickens. *Animal*; 7, 1779-1788.

Peinado J. (2015). Efectos de nuevos aditivos alimentarios sobre la composición de la microbiota digestiva en pollos broiler. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España. ISBN: 978-84-9125-488-1.

Peiretti P.G & Gai F. (2009). Fatty acid and nutritive quality of chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds and plant during growth. *Animal Feed Science and Technology*; 148, 267-227.

Pelliser M, Mendez S, Shutherland A. (2001). Detection of *Listeria* species in refrigerated chickens carcasses using cleadview and modified conventional culture method. *Braz J Microbiol*; (32), 113-116.

Pennone V, Lehardy A, Coffey A, Mcauliffe O, Jordan K. (2018). Diversity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from *Agaricus bisporus* mushroom production. *J Appl Microbiol*; 125, (2), 586-595.

Pelisser M.R, Mendes S.D, Sutherland A.D, Batista C.R. (2001). Detection of *Listeria* species in refrigerated chicken carcasses using ClearviewTM and a modified conventional culture method. *Braz J Microbiol*; 32, 113-116.

Pérez Castellanos M.S. (2004). Alertas alimentarias en salud pública. *Gac Sanit*; 18, 234-238.

Pérez Rubiano C, Mercado Reyes M, Carrascal Camacho A.K. (2008). Incidencia de *Listeria* spp. en carcasas de pollo congelado en un supermercado del nororiente de Bogotá. *Nova-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*; 6, (10), 101-236.

Piard J & Desmazeaud M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*; 71, 525-541.

Piard J & Desmazeaud M. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Bacteriocins and other antibacterial substances. Lait; 72, 113-142.

Pin C, García de Fernando G.D, Ordóñez J.A, Baranyi J. (2001). Applying a generalized z -value concept to quantify and compare the effect of environmental factors on the growth of *Listeria monocytogenes*. Food Microbiol; 18, 539-545.

Pinto A.L, Fernandes M, Pinto C, Albano H, Castilho F, Teixeira P, Gibbs P.A. (2009). Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: Potential antimicrobials to control non-fermented seafood. International Journal of Food Microbiology; 129, (1), 50-58.

Pirie J.H.H. (1927). A new disease of veld rodents: Tiger River disease. Pub S African Inst Med Res; (3), 163-186.

Pitt W, Harden T, Hull, R. (1999). Antibacterial activity of raw milk against *Listeria monocytogenes*. The Australian J Dairy Technol; (54), 90-93.

Poimenidou S.V, Chatzithoma D.N, Nychas G.J, Skandamis P.N. (2016). Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat, salinity and low pH, after habituation on cherry tomatoes and lettuce leaves. Plos One; 11, (10), e0165746.

Portal Portuario (2020). Argentina: Exportaciones de carnes crecen 17 % en primer cuatrimestre. Disponible en: <https://portalportuario.cl/argentina-exportaciones-de-carnes-crecen-17-en-primer-cuatrimetre/>

Pote D.H, Way T.R, Kleinman P.J, Moore P.A, Meisinger J.J, Sistani K.R, Saporito L.S, Allen A.L, Feyereisen G.W. (2011). Subsurface application of poultry litter in pasture and no-till soils. *Journal of Environmental Quality*; 40, 402-411.

Pourakbari M, Seidavi A, Asadpour L, Martínez A. (2016). Probiotic level effects on growth performance, carcass traits, blood parameters, cecal microbiota, and immune response of broilers. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*; 88, (2), 1011-1021.

Pradhan A.K, Li M, Li Y, Kelso L.C, Costello T.A, Johnson M.G. (2012). A modified Weibull model for growth and survival of *Listeria innocua* and *Salmonella Typhimurium* in chicken breasts during refrigerated and frozen storage. *Poultry Science*; 91, (6), 1482-1488.

Prieto M. (2008). Aislamiento, identificación y caracterización de *Listeria monocytogenes*. Manual de Procedimientos. Servicio Bacteriología Especial. Departamento de Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”. Buenos Aires. Argentina.

Qiao M.D.L, Fletcher D.L, Northcutt J.K, Smith D.P. (2002). The relationship between raw broiler breast meat color and composition. *Poultry Science*; (81), 422-427.

Radtke A.L, Anderson K.L, Davis M.J, DiMagno M.J, Swanson J.A, O’Riordan M.X. (2011). *Listeria monocytogenes* exploits cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) to escape the phagosome. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*; 108, (4), 1633-1638.

Raimann E, Schmid B, Stephan R, Tasara T. (2009). The alternative sigma factor (σ^L) of *L. monocytogenes* promotes growth under diverse environmental stresses. *Foodborne Pathog Dis*; 6, 583-591.

Ramírez López C & Vélez Ruiz J.F. (2016). Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra. *Inf tecnol (online)*; 27, (6), 115-128.

Ramírez Mérida L.G, Morón de Salim A, Alfieri Graterol A.Y, Gamboa O. (2009). Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de tomates (*Lycopersicon esculentum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) frescos en tres supermercados de Valencia. Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*; 59, 3.

Ramseyer F & Terr E. (2019). Con fuerte aumento de la demanda China, la carne aviar marca records de producción y comercio global. Bolsa de Comercio de Rosario. Informativo semanal. Año XXXVII. N° Edición 1929. Disponible en: <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/noticias-informativo-semanal/con-fuerte>

Reglamento Bromatológico Nacional. (2005). Decreto N° 315/994. Disposiciones generales para carne de aves. Capítulo 13. Sección 6. (13.6.7). Argentina.

Requena T & Peláez C. (1995). Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*; 35, (1), 19-44.

Ribeiro V.B & Destro M.T. (2014). *Listeria monocytogenes* serotype 1/2b and 4b isolates from human clinical cases and foods show differences in tolerance to refrigeration and salt stress. *J Food Prot*; 77, (9), 1519-1526.

Ribeiro V.B, Mujahid S, Orsi R.H, Bergholz T.M, Wiedmann M, Boor K.J, Destro M.T (2014). Contributions of sigma (B) and PrfA to *Listeria monocytogenes* salt stress under food relevant conditions. *Int J Food Microbiol*; 177, 98-108.

Ricaurte Galindo S.L. (2005). Bioseguridad en granjas avícolas. *REDVET*; 6, (2), 1695-7504.

Riedo F.X, Pinner R.W, Tosca M.D, Cartter M.L, Graves L.M, Broome C.V. (1994). A point-source food-borne listeriosis outbreak: Documented incubation period and possible mild illness. *J Infect Dis*; 170, 693-696.

Riley M.A & Wertz J.E. (2002a). Bacteriocin diversity: Ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*; 84, 357-364.

Ripjens N, Jannes G, Lieve M. (1997). Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready- to- eat chicken and turkey products determined by polymerase chain reaction and line probe assay hibridization. *J Food Prot*; (50), 548-559.

Rivera C & Vanegas M. (2007). Inhibición de *Listeria monocytogenes* con bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*; 12, (12), 1-5.

Roberts D. (1990). Sources of infection: food. *Lancet*; 336, 859- 861.

Roche S, Gracieux P, Molihanic E, Albert I, Virlogeux I, Témoin S. (2005). Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*; 71, 6039-6048.

Rocourt J & Cossart P. (1997). *Listeria monocytogenes*. In: Doyle M.P, Beuchat L.R, Montville T.J (Eds). *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*. ASM Press Washington, DC, U.S.A.; 337-352.

Rodríguez M. (2002). *Manual Técnico de Derivados Lácteos*. Bogotá. Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Colombia; 3, 39-43.

Rodríguez Auad J.P. Panorama de la infección por *Listeria monocytogenes*. *Revista Chilena de Infectología*; (35), 6.

Rodríguez Membibre M.L. (1994). *Bacterias productoras de ácido láctico: Efectos sobre el crecimiento y la flora intestinal de pollos, gazapos y lechones*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Departamento de Producción animal. España.

Rogers L. (1928). The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Bacteriology*; 16, 321-325.

Rojas C & Vargas P. (2008). Bacteriocinas: Sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. *Tecnología en Marcha*; 21, (2), 9-16.

Rondón A.J, Samaniego L.M, Bocourt R, Rodríguez S, Milián G, Ranilla M. J, Laurencio M, Pérez M. (2008). Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* spp. procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *Rev Somenta (México)*; 6, (1), 56-63.

Rossi L, Paiva A, Tornese M, Chianelli S, Troncoso A. (2008). Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. *Revista Chilena de Infectología*; 25, (5), 328-335.

Rothrock M.J, Davis M.L, Locatelli A, Bodie A, McIntosh T.G, Donaldson J.R, Ricke S.C. (2017). *Listeria* occurrence in poultry flocks: Detection and potential implication. *Front Vet Sci*; (4), 125.

Ryser E & Marth E. (1999). *Listeria*, listeriosis and food safety. 2^{da} Edición. Marcel Dekker (Ed), New York, U.S.A.; 738 p.

Ryser E.T, Donnelly C.W, Salfinger Y, Tortorello M.L. (2015). *Listeria*. In: Speck M.L. (Ed). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, Washington, DC, U.S.A.; 425-438.

SAGPyA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. (2011).

Producción Avícola Argentina. Disponible en:

https://www.miargentina.net/webpage.php?id_webpage=495

Salihu M.D, Junaidu A.U, Manga S.B, Gulumbe M.L, Magaji A.A., Ahmed A. (2008). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in smoked fish in Sokoto, Nigeria. African Journal of Biotechnology; 7, 3082-3084.

Sanaa M, Coroller L, Cerf O. (2004). Risk assessment of listeriosis linked to the consumption of two soft cheeses made from raw milk: Camembert of Normandy and Brie of Meaux. Risk Anal; 24, (2), 389-399.

Sánchez Hernández. (2016). *Listeria monocytogenes*: un reto para la seguridad alimentaria. FarmaJournal; 1, (2), 157-161. Disponible en:
<http://www.academiadefarmaciacastillayleon.es/resumenes/resumen-FJavier-Sanchez-06052015.pdf>.

Sauders B.D & Wiedmann M. (2007). Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. In: Ryser E. T, Marth E.H (Eds). *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. 3rd Edition. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A.; 21-53.

Savadogo A, Cheik Ouattara A, Bassole H, Traore S. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria. African Journal of Biotechnology; 5, 678-683.

Scalise J (2014). Caracterización y diagnóstico de la cadena de valor de la chía en la Argentina. Unidad para el Cambio Rural (UCAR). Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación Argentina. Buenos Aires. Informe. Disponible en:
<https://pdfslide.net/documents/caracterizacion-y-diagnostico-de-la-cadena-de-valor-de-la-chia-en-argentina.html>

Scatassa M.L, Gaglio R, Cardamone C, Macaluso G, Arcuri L, Todaro M, Mancuso I. (2017). Anti-Listeria activity of lactic acid bacteria in two traditional sicilian cheeses. Italian Journal of Food Safety; 6, (1), 6191.

Schmid B, Klumpp J, Raimann E, Loessner M.J, Stephan R, Tasara T. (2009). Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions. Appl Environ Microbiol; 75, (6), 1621-1627.

Schmidt U & Kaya M. (1990). Behaviour of *L. monocytogenes* in vacuum-packed sliced frankfurter-type sausage. Fleischwirtsch; 70, 1294-1295.

Schöbitz R, Marín M, Horzella M, Carrasco E. (2001). Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y quesos frescos artesanales. AGRO SUR; 29, (2), 114-119.

Schöbitz R, Ciampi L, Nahuelquin Y. (2009). *Listeria monocytogenes*. Un peligro latente para la industria alimentaria. AGRO SUR; 37, (1), 1-8.

Seidavi A & Simões J. (2015). Evaluation of dietary fish oil plus green tea supplementation on the gizzard, ileum and cecum microflora in broiler chickens. Arch Zootec; 64, (248), 397-402.

Sen S, Ingale S, Kim Y, Kim J, Kim K, Lohakare J, Kim E, Kim H, Ryu M, Kwon I, Chae B. (2012). Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient and retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. Res Vet Sci; 93, 264-268.

SENASA. (2003). Servicio Nacional de la Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Reglamento (Decreto 4238/68). Capítulo III y IV. Disponible en: <http://www.senasa.gob.ar/tags/decreto-423868>

Sewell D, Allen S, Phillips C.A. (2015). Oxygen limitation induces acid tolerance and impacts simulated gastro-intestinal transit in *Listeria monocytogenes* J0161. Gut Pathog; 7, 11.

Sheu C & Freese E. (1972). Effects of fatty acids on growth and envelope proteins of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol; 111, (2), 516-524.

Shim Y.H, Shinde P.L, Choi J.Y, Kim J.S, Seo D.K, Pak J.I, Chae B.J, Kwon I.K. (2010). Evaluation of multi-microbial probiotics produced by submerged liquid and solid substrate fermentation methods in broilers. Asian-Australasian Journal of Animal Science; 23, 521-529.

Shiva C & Jara L.M. (2013). Identificación y caracterización molecular de cepas nativas de *Lactobacillus* aisladas de material de cama de pollos de engorde. Rev Inv Vet Perú; 24, (3), 307-315.

Siamansouri M, Mozaffari S, Alikhani F. (2013). Bacteriocins and lactic acid bacteria. J Biol Today's World; 2, 227-234.

Signorini M, Brusa V, Campos C.A, Cuesta A, Leotta G, Epszteyn S, Michanie S, Prieto M, Renaud V, Schembri G, Vanzini M. (2017). Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en chacinados embutidos secos y salazones crudas. Red de Seguridad

Alimentaria. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Informe final 2017.

Sleator R.D, Francis G.A, O'Beirne D, Gahan C.G, Hill C. (2003). Betaine and carnitine uptake systems in *Listeria monocytogenes* affect growth and survival in foods and during infection. *J Appl Microbiol*; 95, 839-846.

Složilová I., Purkrťová S., Kosová M., Mihulová M., Šviráková E., Demnerová K. (2014). Antilisterial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* strains originating from different sources. *Czech J Food Sci*; 32, 145-151.

Smulders, F.J.M & Woolthuis C.H.J. (1985). Immediate and delayed microbiological effects of lactic acid decontamination of calf carcasses-influence on conventionally boned versus hot-boned and vacuum-packaged cuts. *J Food Prot*; 48, 838-847.

Snart J, Bibiloni R, Grayson T. (2006). Supplementation of the diet with high-viscosity beta-glucan results in enrichment for Lactobacilli in the rat cecum. *Appl Environ Microbiol*; 72, 1925-1931.

Steele M & Odemeru J. (2004). Irrigation water as a source of food-borne pathogens on fruits and vegetables. *J Food Prot*; 67, 2839-2849.

Stern N.J, Svetoch E.A, Eruslanov B.V, Pereygin V.V, Mitsevich E.V, Mitsevich I.P, Pokhilenko V.D, Levchuk V.P, Svetoch O. E, Seal B.S. (2006). Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrobial Agents and*

Chemotherapy; 50, (9), 3111-3116.

Stones M. (2009). Green microbiocide said to clean up infections. Foodnavigator.com. Disponible en: <https://www.foodnavigator.com/Article/2009/04/17/Green-microbiocide-said-to-clean-up-infections>

Suazo V. (2002). Caracterización del antagonismo de una bacteriocina de *Carnobacterium piscicola* frente a cepas de *Listeria monocytogenes*. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias; 87 p.

Suri S, Passi J. S, Goyat J. (2016). Chía seed. (*Salvia hispanica* L.). A new age functional food. International Journal of Advanced Technology in Engineering and Science; 4, (3), 286-289.

Swaminathan B, Cabanes D, Zhang W, Cossart, P. (2007). Foodborne viral pathogens. *Listeria monocytogenes*. In: Doyle M.P, Beuchat L.R (Eds). Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers. 3rd Edition. ASM Press, Washington DC, U.S.A.; 457-491.

Taga M.S, Miller E.E, Pratt D.E (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. J Am Oil Chem Soc; 61, (5), 928-931.

Témoin S, Roche M, Grépinet O, Fardini Y, Velge P. (2008). Multiple point mutations in virulence genes explain the low virulence of *Listeria monocytogenes* field strains. Microbiology; 154, 939-948.

Teo A.Y & Tan H.M. (2007). Evaluation of the performance and intestinal gut microflora of broilers fed on corn-soy diets supplemented with *Bacillus subtilis* PB6 (CloSTAT). J Appl Poult Res; 16, 296-303.

Terpou A, Papadaki A, Lappa I.K, Kachrimanidou V, Bosnea L.A, Kopsahelis N. (2019). Probiotics in food systems: Significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. Nutrients; 11, (7), 1591.

Thayer D.W, Boyd G, Kim A, Fox J.B, Farrell H.M. (1998). Fate of gamma-irradiated *Listeria monocytogenes* during refrigerated storage on raw or cooked turkey breast meat. J Food Prot; 61 (8), 979-987.

Theivendran S, Hettiarachchy N.S, Johnson M.G. (2006). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin combined with grape seed extract or green tea extract in soy protein film coated turkey frankfurters. Journal of Food Science; 71, (2), 39-44.

Thimothe J, Nightingale K.K, Gall K, Scott V.N, Wiedmann M. (2004). Tracking of *Listeria monocytogenes* in smoked fish processing plants. J Food Prot; 67, (2), 328-341.

Timilsena Y.P, Adhikari R, Kasapis S, Adhikari B. (2016). Molecular and functional characteristics of purified gum from Australian chia seeds. Carbohydr Polym; 136, 128-136.

Thomas L.V & Wimpenny J.W. (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, (6), 2006-2012.

Tholozan J.L, Ritz M, Jugiau F, Federighi M, Tissier J.P. (2000). Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. J Appl Microbiol; 88, (2), 202-212.

Tinney K.S, Miller M.F, Ramsey C.B, Thompson L.D, Carr M.A. (1997). Reduction of microorganisms on beef surfaces with electricity and acetic acid. J Food Prot; (60), 625-628.

Todd E.C.D & Notermans S. (2011). Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. Food Control; 22, (9), 1484-1490.

Tomé E, Todorov S.D, Gibbs P.A, Teixeira P.C. (2009). Partial characterization of nine bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from cold-smoked salmon with activity against *Listeria monocytogenes*. Food Biotechnology; 23, (1), 50-73.

Torres K, Sierra S, Poutou R, Carrascal A, Mercado M. (2005). Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. Journal MVZ-Córdoba; 10, (1), 511-543.

Torres M.J, Petroselli G, Daz M.E, Erra Balsells R, Audisio M.C. (2015). *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* CBMDC3f with antimicrobial activity against Gram-positive foodborne pathogenic bacteria: UV-MALDI-TOF MS analysis of its bioactive compounds. Springer; World Journal of Microbiology; 31, (6), 929-940.

Tzounis X, Vulevic J, Kuhnle G.G, George T, Leonczak J, Gibson G.R, Kwik Uribe C, Spencer J.P. (2008). Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora.

Br J Nutr; 99, (4), 782-792.

Trepat Quílez M. (2002). Incidencia y comportamiento de *Salmonella* y *Listeria* en pechugas de pavo curadas. Tesis doctoral. Bellaterra: Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. España. ISBN 846881010X.

Urbano Cáceres E, Aguilera Becerra A, Jaimes Bernal C. (2017). Determinación del perfil de susceptibilidad a antibióticos de *Listeria* spp. aisladas de leche cruda de vaca en Tunja. Revista Investigación en Salud, Universidad de Boyacá; 4, (1), 38-52.

USDA/FSIS. (2019). United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service. Office of Public Health and Science. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, ready-to-eat Siluriformes (fish) and egg products and environmental samples. Disponible en: <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlg-8.pdf?MOD=AJPERES>

Valderrama W.B, Dudley E.G, Doores S, Cutter C.N. (2016). Commercially available rapid methods for detection of selected food-borne pathogens. Crit Rev Food Sci Nutr; 56, (9), 1519-1531.

Valero A, Carrasco E, Perez Rodriguez F, Garcia Gimeno R.M., Zurera G. (2007). Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* in pasteurized white asparagus. J Food Prot; 70, 753-757.

Van Netten P, Mossel D.A.A, Huis In't Vels J. (1995). Lactic acid decontamination of fresh pork carcasses: A pilot plant study. *Int J Food Microbiol*; 25, 1-9.

Vasconcelos Fernandes R.T, Varela de Arruda A.M, de Oliveira Costa M.K, de Oliveira Lima P, Gomes dos Santos L.O, da Silva Melo A, Moreira Marinho J.B. (2016). Physicochemical and microbiological parameters of frozen and chilled chicken meat. *R Bras Zootec*; 45, (7), 417-421.

Vásquez S, Suárez H, Zapata S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*; 36, (1), 64-71.

Vázquez Boland J.A, Gamallo J.A, Ripio M.T, Domínguez Bernal G, Lara M, Vega Y, Mainar R.C, Suárez M. (1996). Listeriosis animal: Aspectos epidemiológicos y diagnósticos, implicaciones en salud pública y situación en España. *Med Vet*; 13, 333-344.

Vázquez Boland J.A, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez Bernal G, Goebel W, González Zorn B, Wehland J, Kreft J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiological Reviews*; 4, 584-640.

Vega J & Mercado P. (2013). Sensibilidad antibacteriana de cultivos de *Listeria* spp. aislados de lugares de expendio de pollo y quesos en mercados de la ciudad de Trujillo. Perú. *REBIOLEST*; (2), 1.

Velge P & Roche S. (2010). Variability of *Listeria monocytogenes* virulence: A result of the evolutionary between saprophytism and virulence?. *Future Microbiol*; (5), 1799-1821.

Vera A, González G, Domínguez M, Bello H. (2013). Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. *Revista Chilena de Infectología*; 30, (4), 407-416.

Viera Osorio E.F. (2015). Evaluación de diferentes niveles de promotor de crecimiento orgánico comercial, en la alimentación de pollos broilers. Trabajo de Titulación previo a la obtención del Título de Ingeniero Zootecnista. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador.

Vignolo G, Palacios J, Farías M.E, Sesma F, Schillinger U, Holzapfel W, Oliver G. (2000). Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Current Microbiology*; 41, 410-416.

Vijayakumar P.P & Muriana P.M. (2017). Inhibition of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats using bacteriocin mixtures based on mode of action. *Foods*; 6, (3), 22.

Villalobos L & Martínez R. (2006). Susceptibilidad antimicrobiana de *Listeria* spp. aisladas de alimentos durante el periodo 2003-2004. Cumaná, Venezuela. *Rev Soc Venez Microbiol*; 26, 31-34.

Vivant A.L, Garmyn D, Piveteau P. (2013). *Listeria monocytogenes*, a down-to-earth pathogen. *Front Cell Infect Microbiol*; (3), 87.

Walker S.J, Archer P, Banks J.G. (2008). Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. J Appl Microbiol; 68, (2), 157-162.

Ward T.J. Gorski L. Borucki M.K. Mandrell R.E. Hutchins J. Pupedis K. (2004) Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the prfA virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*. J Bacteriol; 186, 4994-5002.

Ward T.J, Ducey T.F, Usgaard T, Dunn K.A, Bielawski J.P. (2008). Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. Appl Environ Microbiol; 74, 7629-7642.

Watts D.B, Way T.R, Torbert H.A. (2011). Subsurface application of poultry litter and its influence on nutrient losses in runoff water from permanent pastures. Journal of Environmental Quality; 40, 421-430.

Whiting R.C & Bagi L.K. (2002). Modelling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology; 73, 291-295.

Yaakoubi K, Benkerroum N, Wiorowski F, Sanson F, Haydersah J, Chevallier I. (2009). Development of a multiwell antagonistic activity assay for the detection of bacteriocin production by lactic acid bacteria. J Rapid Methods Autom Microbiol; 17, 32-45.

Zeinali T, Jamshidi A, Bassami M, Rad M. (2017). Isolation and identification of *Listeria* spp. in chicken carcasses marketed in northeast of Iran. International Food Research Journal; 24, (2), 881-887.

Zhang Z, Cho J.H, Kim I.H. (2013). Effects of *Bacillus subtilis* UBT-MO2 on growth performance, relative immune organ weight, gas concentration in excreta, and intestinal microbial shedding in broiler chickens. *Livestock Sci*; 155, 343-347.

Zhu K, Ding X, Julotok M, Wilkinson B.J. (2005). Exogenous isoleucine and fatty acid shortening ensure the high content of anteiso-C15:0 fatty acid required for low-temperature growth of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*; 71, (12), 8002-8007.

Zhu C.S, Gao Y.R, Xu G.D. (2014). Screening of lactic acid bacteria for production of anti-*Listeria* bacteriocin. *Modern Food Science and Technology*; 30, (5), 87-91.

Zouhir A, Hammami R, Fliss I, Hamida J.B. (2010). A new structure-based classification of Gram-positive bacteriocins. *Protein Journal*; 29, (6), 432-439.

Zulkifli I, Rahayu H.S, Alimon A.R, Vidyadaran M.K, Babjee S.A. (2009). Gut microflora and intestinal morphology of commercial broiler chickens and red jungle fowl fed diets containing palm kernel meal. *Archiv fur Geflugelkunde*; 73, 49-55.

Zwietering M.H, de Wit J.C, Cuppers H.G, van 't Riet K. (1994). Modeling of bacterial growth with shifts in temperature. *Appl Environ Microbiol*; 60, 204-213.



Anexo

1. MEDIOS DE CULTIVOS Y REACTIVOS EMPLEADOS

1.1 Caldo de pre-enriquecimiento UVM I (gramos por litro)

5 g de proteosa peptona

5 g de triptona

5 g de extracto de carne

5 g de extracto de levadura

20 g de NaCl

1,35 g de KH_2HPO_4

12 g de Na_2HPO_4

1 g de esculina_

Suplementos

0,02 g de ácido nalidíxico

0,012 g de acriflavina

pH Final: $7,2 \pm 0.2$

1.2 Caldo FRASER (gramos por litro)

5 g de proteosa peptona

5 g de triptona

5 g de extracto de carne

5 g de extracto de levadura

20 g de NaCl

12 g de Na_2HPO_4

1,35 g KH_2PO_4

1 g de esculina

3 g de LiCl

pH 7.2 ± 0.2

Suplementos

0,5 g de citrato férrico de amonio

0,02 g de ácido nalidíxico

0,025 g de acriflavina

1.3 Agar OXFORD (gramos por litro)

39 g de agar base de sangre Columbia

1 g de esculina

0,5 g de citrato férrico de amonio

15 g de LiCl

Suplementos

0,4 g de cicloheximida

0,02 g de sulfato de colistina

0,005 g de acriflavina

0,002 g de cefotetan

0,01 g de fosfomicina

pH 7.0 ± 0.2

1.4 Medio Base de Caldo Rojo Fenol (gramos por litro)

10 g de peptona de caseína

1 g de extracto de carne

5 g de NaCl

0,018 g de rojo fenol

pH: 7,4

Azúcares o polialcoholes empleados (1% p/v): D-xilosa, manitol, L-ramnosa,
D-glucosa

1.5 Medio de Cultivo de Clark & Lubs (Caldo RM/VP) (gramos por litro)

7 g de polipeptona

5 g de glucosa

5 g de K₂HPO₄

pH 6,9

1.6 Agar Almidón (gramos por litro)

5 g de pluripeptona

3 g de extracto de carne

8 g de NaCl

10 g de almidón

15 g de agar

pH 7,3 ± 0,2

1.7 Solución de Lugol (gramos por litro)

50 g de iodo metaloide

100 g de ioduro de potasio

1.8 Medio SIM (gramos por litro)

20 g de tripteína

6,1 g peptona

0,2 g de sulfato de hierro y amonio

0,2 g de tiosulfato de sodio

2 g de agar

pH $7,3 \pm 0,2$

1.9 Reactivo de Kovac

50 g de 4-dimetilaminobenzaldehído

750 mL 1-butanol

250 mL de ácido hidroclicóricu al 37 % v/v

1.10 Caldo Nitratado (gramos por litro)

5 g de peptona

3 g de extracto de carne

1 g de KNO_3

pH $7,3 \pm 0,2$

1.11 Medio de Christensen con urea (gramos por litro)

1 g de peptona

5 g de NaCl

1 g de KH_2HPO_4

1 g de glucosa

0,012 g de rojo fenol

20 g de agar

200 g de urea

pH $6,8 \pm 0,2$

1.12 Agar Sangre de Carnero (gramos por litro)

375 g de infusión de músculo de corazón

10 g de peptona

5 g de NaCl

15 g de agar

Sangre ovina al 50-100 g

pH $7,3 \pm 0,2$

1.13 Agar Triptona Soja (gramos por litro)

17 g de tripteína

3 g de peptona de soja

5 g de NaCl

2,5 g de K_2HPO_4

2,5 g de glucosa

6 g de extracto de levadura

15 g de agar

pH $7,3 \pm 0,2$

1.14 Caldo Triptona Soja (gramos por litro)

17 g de tripteína

3 g de peptona de soja

5 g de NaCl

2,5 g de K_2HPO_4

2,5 g de glucosa

6 g de extracto de levadura

pH $7,3 \pm 0,2$

1.15 Buffer Fosfato Salino (gramos por litro)

8,06 g de NaCl

0,22 g de KCl

1,15 g de Na_2HPO_4

0,20 g de KH_2HPO_4

pH $7,4 \pm 0,1$

1.16 Caldo Man. Rogosa & Sharp (MRS) (gramos por litro)

10 g de proteosa peptona

10 g de extracto de carne

5 g de extracto de levadura

20 g de glucosa

1 mL de sorbitán monoleato

2 g de K_2HPO_4

5 g de acetato de sodio

2 g de citrato de amonio

0,2 g de sulfato de magnesio

0,05 g de sulfato de manganeso

pH $6.5 \pm 0,2$

1.17 Agar MRS (gramos por litro)

10 g de proteosa peptona

10 g de extracto de carne

5 g de extracto de levadura
20 g de glucosa
1 mL de sorbitán monoleato
2 g de K_2HPO_4
5 g de acetato de sodio
2 g de citrato de amonio
0,2 g de sulfato de magnesio
0,05 g de sulfato de manganeso
15 g de agar
pH $6.5 \pm 0,2$

1.18 Agar Mueller Hinton (gramos por litro)

300 g de infusión de carne
17,5 g de peptona ácida de caseína
1,5 g de almidón
15 g de agar
pH $7,3 \pm 0,1$

IDENTIFICACIÓN DE *LISTERIA* SPP.

Cepa N°	Fermentación de carbohidratos					RM	VP	Urea	Nitratos	Almidón	Indol/SH ₂	Hemólisis	CAMP
	Esculina	D-Xi	D-Ma	L-Ram	D-Gl								
1	+	N	N	P	P	+	+	N	N	N	N	β	P
2	+	N	N	P	P	+	+	N	N	N	N	β	P
3	+	N	N	P	P	+	+	N	N	N	N	β	P
4	+	N	N	P	P	+	+	N	N	N	N	β	P
5	+	N	N	P	P	+	+	N	N	N	N	β	P
6	+	N	N	P	P	+	+	N	N	N	N	β	P
7	+	N	N	P	P	+	+	N	N	N	N	β	P
8	+	N	N	P	P	+	+	N	N	N	N	β	P
9	+	N	N	P	P	+	+	N	N	N	N	β	P
10	+	N	N	P	P	+	+	N	N	N	N	β	P
11	+	N	N	P	P	+	+	N	N	N	N	β	P
12	+	N	N	P	P	+	+	N	N	N	N	β	P
13	+	N	N	P	P	+	+	N	N	N	N	β	P

14	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
15	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
16	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
17	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
18	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
19	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
20	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
21	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
22	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
23	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
24	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
25	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
26	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N

27	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
28	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
29	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
30	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
31	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
32	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
33	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
34	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
35	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
36	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
37	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
38	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
39	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
40	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
41	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
42	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
43	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
44	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
45	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
46	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
47	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
48	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
49	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
50	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
51	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
52	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
53	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
54	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
55	+	N	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N

56	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
57	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
58	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
59	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
60	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
61	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
62	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
63	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
64	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
65	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
66	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
67	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
68	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
69	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
70	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
71	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
72	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
73	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
74	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
75	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
76	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
77	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
78	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
79	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
80	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
81	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
82	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P
83	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β-fuerte	P

84	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
85	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
86	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
87	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
88	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
89	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
90	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
91	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
92	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
93	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
94	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
95	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
96	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
97	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
98	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
99	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
100	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
101	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
102	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
103	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
104	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
105	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
106	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
107	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P
108	+	P	N	N	P	+	+	N	N	N	N	β	P

109	+	P	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
110	+	P	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
111	+	P	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
112	+	P	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
113	+	P	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
114	+	P	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
115	+	P	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
116	+	P	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
117	+	P	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
118	+	P	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
119	+	P	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
120	+	P	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
121	+	P	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
122	+	P	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
123	+	P	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
124	+	P	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
125	+	P	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
126	+	P	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
127	+	P	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N
128	+	P	N	V	P	+	+	N	N	N	N	γ	N

129	+	N	P	N	P	+	+	N	N	P	N	γ	N
130	+	N	P	N	P	+	+	N	N	P	N	γ	N
131	+	N	P	N	P	+	+	N	N	P	N	γ	N
132	+	N	P	N	P	+	+	N	N	P	N	γ	N
133	+	N	P	N	P	+	+	N	N	P	N	γ	N
134	+	N	P	N	P	+	+	N	N	P	N	γ	N
135	+	N	P	N	P	+	+	N	N	P	N	γ	N
136	+	N	P	N	P	+	+	N	N	P	N	γ	N
137	+	N	P	N	P	+	+	N	N	P	N	γ	N
138	+	N	P	N	P	+	+	N	N	P	N	γ	N
139	+	N	P	N	P	+	+	N	N	P	N	γ	N
140	+	N	P	N	P	+	+	N	N	P	N	γ	N
141	+	N	P	N	P	+	+	N	N	P	N	γ	N
142	+	N	P	N	P	+	+	N	N	P	N	γ	N
143	+	N	P	N	P	+	+	N	N	P	N	γ	N
144	+	N	P	N	P	+	+	N	N	P	N	γ	N
145	+	N	P	N	P	+	+	N	N	P	N	γ	N

146	+	N	P	V	P	+	+	N	P	P	N	γ	N
147	+	N	P	V	P	+	+	N	P	P	N	γ	N
148	+	N	P	V	P	+	+	N	P	P	N	γ	N
149	+	N	P	V	P	+	+	N	P	P	N	γ	N
150	+	N	P	V	P	+	+	N	P	P	N	γ	N
151	+	N	P	V	P	+	+	N	P	P	N	γ	N
152	+	N	P	V	P	+	+	N	P	P	N	γ	N
153	+	N	P	V	P	+	+	N	P	P	N	γ	N
154	+	N	P	V	P	+	+	N	P	P	N	γ	N
155	+	N	P	V	P	+	+	N	P	P	N	γ	N
156	+	N	P	V	P	+	+	N	P	P	N	γ	N
157	+	N	P	V	P	+	+	N	P	P	N	γ	N
158	+	N	P	V	P	+	+	N	P	P	N	γ	N
160	+	N	P	V	P	+	+	N	P	P	N	γ	N
161	+	N	P	V	P	+	+	N	P	P	N	γ	N
162	+	N	P	V	P	+	+	N	P	P	N	γ	N
163	+	N	P	V	P	+	+	N	P	P	N	γ	N
164	+	N	P	V	P	+	+	N	P	P	N	γ	N
165	+	N	P	V	P	+	+	N	P	P	N	γ	N
166	+	N	P	V	P	+	+	N	P	P	N	γ	N

Referencias: Amarillo: *L. monocytogenes*; Verde: *L. innocua*; Naranja: *L. ivanovii*; Celeste: *L. seeligeri*; Azul: *L. welshimeri*; Gris: *L. grayi*; Rosa: *L. murrayi*. RM (+) y VP (+): Rojo de metilo y Voges Proskauer positivos. Positivo (P); Negativo (N); Variable (V); No hemolítico (γ); Hemolítico (β).

**2. RECUENTO DE LAS CEPAS DE *L. MONOCYTOGENES* EN MEDIO CTS
SUPLEMENTADO CON NaCl AL 1,5 y 3 % P/V**

Cepa	Concentración de NaCl	Log UFC/ml
B7	1,5 %	13
B7	1,5 %	10
B7	1,5 %	11
B7	3 %	7
B7	3 %	7
B7	3 %	8
C5	1,5 %	8
C5	1,5 %	9
C5	1,5 %	9
C5	3 %	7
C5	3 %	6
C5	3 %	6
G1	1,5 %	8
G1	1,5 %	9
G1	1,5 %	9
G1	3 %	9
G1	3 %	9
G1	3 %	10
GG5	1,5 %	7
GG5	1,5 %	7

GG5	1,5 %	8
GG5	3 %	6
GG5	3 %	6
GG5	3 %	5
G7	1,5 %	13
G7	1,5 %	11
G7	1,5 %	12
G7	3 %	12
G7	3 %	11
G7	3 %	12
HH5	1,5 %	13
HH5	1,5 %	14
HH5	1,5 %	12
HH5	3 %	12
HH5	3 %	12
HH5	3 %	11
L5	1,5 %	8
L5	1,5 %	9
L5	1,5 %	9
L5	3 %	8
L5	3 %	7
L5	3 %	8
N7	1,5 %	9
N7	1,5 %	9

N7	1,5 %	8
N7	3 %	7
N7	3 %	7
N7	3 %	6
R7	1,5 %	7
R7	1,5 %	9
R7	1,5 %	7
R7	3 %	8
R7	3 %	7
R7	3 %	8
U1	1,5 %	9
U1	1,5 %	8
U1	1,5 %	8
U1	3 %	7
U1	3 %	8
U1	3 %	9
V7	1,5 %	6
V7	1,5 %	7
V7	1,5 %	7
V7	3 %	7
V7	3 %	6
V7	3 %	6
W1	1,5 %	8
W1	1,5 %	9

W1	1,5 %	9
W1	3 %	7
W1	3 %	6
W1	3 %	5
Z1	1,5 %	10
Z1	1,5 %	10
Z1	1,5 %	8
Z1	3 %	9
Z1	3 %	10
Z1	3 %	11

3. Escala McFarland *Standard*

Nº	BaCl₂ 0,048M ml	H₂SO₄ 0,36M ml	Vf ml	Nº Células
0,5	0,05	9,95	10	1,5 · 10 ⁸
1	0,1	9,9	10	3 · 10 ⁸
2	0,2	9,8	10	6 · 10 ⁸
3	0,3	9,7	10	9 · 10 ⁸
4	0,4	9,6	10	12 · 10 ⁸
5	0,5	9,5	10	15 · 10 ⁸
6	0,6	9,4	10	18 · 10 ⁸
7	0,7	9,3	10	21 · 10 ⁸
8	0,8	9,2	10	24 · 10 ⁸
9	0,9	9,1	10	27 · 10 ⁸
10	1	9	10	30 · 10 ⁸

4. Ensayo de antagonismo

4.1 SLC de las BAL provenientes de la condición control

SLC 4C

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,14	5	0,03	5,42	0,0078
Listeria	0,14	5	0,03	5,42	0,0078
Error	0,06	12	0,01		
Total	0,21	17			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,12944
Error: 0,0053 gl: 12

Listeria	Medias	n	E.E.	
L5	1,23	3	0,04	A
U1	1,34	3	0,04	A B
V7	1,38	3	0,04	B C
R7	1,45	3	0,04	B C
HH5	1,47	3	0,04	B C
Z1	1,48	3	0,04	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

SLC 16C

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5,63	8	0,70	117,50	<0,0001
Listeria	5,63	8	0,70	117,50	<0,0001
Error	0,11	18	0,01		
Total	5,73	26			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,13271
Error: 0,0060 gl: 18

Listeria	Medias	n	E.E.	
B7	1,16	3	0,04	A
G1	1,36	3	0,04	B
W1	1,40	3	0,04	B
L5	1,41	3	0,04	B
U1	1,60	3	0,04	C
V7	1,62	3	0,04	C
Z1	2,21	3	0,04	D
HH5	2,35	3	0,04	E
R7	2,47	3	0,04	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

SLC 20C

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,47	6	0,08	12,57	0,0001
Listeria	0,47	6	0,08	12,57	0,0001
Error	0,09	14	0,01		
Total	0,56	20			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,13831
 Error: 0,0062 gl: 14
 Listeria Medias n E.E.

	Medias	n	E.E.		
W1	1,33	3	0,05	A	
V7	1,46	3	0,05	A	B
U1	1,51	3	0,05		B C
L5	1,53	3	0,05		B C
C5	1,62	3	0,05		C D
Z1	1,72	3	0,05		D E
G1	1,81	3	0,05		E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

4.2 SLC obtenidos de las BAL provenientes del tratamiento W3

SLC 01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,44	5	0,29	50,54	<0,0001
Listeria	1,44	5	0,29	50,54	<0,0001
Error	0,07	12	0,01		
Total	1,51	17			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,13425
 Error: 0,0057 gl: 12
 Listeria Medias n E.E.

	Medias	n	E.E.		
L5	1,27	3	0,04	A	
G1	1,33	3	0,04	A	
Z1	1,54	3	0,04		B
V7	1,75	3	0,04		C
U1	1,76	3	0,04		C
W1	2,10	3	0,04		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

SLC O2

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,40	3	0,47	48,88	<0,0001
Listeria	1,40	3	0,47	48,88	<0,0001
Error	0,08	8	0,01		
Total	1,47	11			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,18384

Error: 0,0095 gl: 8

Listeria Medias n E.E.

W1	U1	G1	L5
1,62	1,85	2,13	2,53
3	3	3	3
0,06	0,06	0,06	0,06
A	B	C	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

SLC O4

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,32	8	0,29	8,86	0,0001
Listeria	2,32	8	0,29	8,86	0,0001
Error	0,59	18	0,03		
Total	2,91	26			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,31025

Error: 0,0327 gl: 18

Listeria Medias n E.E.

N7	W1	G1	GG5	G7	U1	V7	Z1	L5
1,42	1,43	1,49	1,68	1,73	1,81	1,87	2,13	2,32
3	3	3	3	3	3	3	3	3
0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
A	A	A	A B	A B	B	B C	C D	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

SLC 05

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,70	8	0,09	3,54	0,0123
Listeria	0,70	8	0,09	3,54	0,0123
Error	0,45	18	0,02		
Total	1,15	26			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,27046

Error: 0,0249 gl: 18

Listeria Medias n E.E.

	Medias	n	E.E.	
GG5	1,53	3	0,09	A
V7	1,65	3	0,09	A B
N7	1,67	3	0,09	A B
G1	1,69	3	0,09	A B
U1	1,73	3	0,09	A B
W1	1,77	3	0,09	A B
G7	1,83	3	0,09	B
Z1	1,91	3	0,09	B C
L5	2,12	3	0,09	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

SLC 06

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,65	9	0,18	37,47	<0,0001
Listeria	1,65	9	0,18	37,47	<0,0001
Error	0,10	20	4,9E-03		
Total	1,74	29			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,11902

Error: 0,0049 gl: 20

Listeria Medias n E.E.

	Medias	n	E.E.	
HH5	1,37	3	0,04	A
W1	1,44	3	0,04	A B
N7	1,49	3	0,04	B
U1	1,64	3	0,04	C
Z1	1,65	3	0,04	C
G1	1,66	3	0,04	C D
GG5	1,78	3	0,04	D E
V7	1,84	3	0,04	E F
G7	1,94	3	0,04	F
L5	2,18	3	0,04	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

SLC 08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,17	3	0,39	149,34	<0,0001
Listeria	1,17	3	0,39	149,34	<0,0001
Error	0,02	8	2,6E-03		
Total	1,19	11			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,09616

Error: 0,0026 gl: 8

Listeria	Medias	n	E.E.	
W1	1,43	3	0,03	A
G1	1,67	3	0,03	B
U1	1,77	3	0,03	B
L5	2,28	3	0,03	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

SLC 09

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,06	4	0,51	69,95	<0,0001
Listeria	2,06	4	0,51	69,95	<0,0001
Error	0,07	10	0,01		
Total	2,13	14			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,15593

Error: 0,0073 gl: 10

Listeria	Medias	n	E.E.	
W1	1,13	3	0,05	A
Z1	1,33	3	0,05	B
L5	1,41	3	0,05	B
G1	1,71	3	0,05	C
U1	2,20	3	0,05	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

SLC 010

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Halo de inhibición	18	0,87	0,81	10,40

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,99	5	0,40	15,89	0,0001
Listeria	1,99	5	0,40	15,89	0,0001
Error	0,30	12	0,03		
Total	2,29	17			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,28172

Error: 0,0251 gl: 12

Listeria Medias n E.E.

Z1	1,23	3	0,09	A
V7	1,33	3	0,09	A
L5	1,37	3	0,09	A B
W1	1,38	3	0,09	A B
G1	1,62	3	0,09	B
U1	2,22	3	0,09	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

SLC 011

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,23	7	0,18	10,54	0,0001
Listeria	1,23	7	0,18	10,54	0,0001
Error	0,27	16	0,02		
Total	1,49	23			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,22321

Error: 0,0166 gl: 16

Listeria Medias n E.E.

N7	1,22	3	0,07	A
V7	1,25	3	0,07	A B
L5	1,27	3	0,07	A B
U1	1,47	3	0,07	B C
Z1	1,52	3	0,07	C D
W1	1,74	3	0,07	D E
G1	1,76	3	0,07	E
C5	1,80	3	0,07	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

4.3 SLC obtenidos de las BAL provenientes del tratamiento P

SLC Pro01

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Halo de inhibición	6	0,93	0,92	3,33	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,11	1	0,11	56,93	0,0017
Listeria	0,11	1	0,11	56,93	0,0017
Error	0,01	4	2,0E-03		
Total	0,12	5			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,10180
Error: 0,0020 gl: 4

Listeria	Medias	n	E.E.	
GG5	1,21	3	0,03	A
G1	1,49	3	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

SLC Pro02

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Halo de inhibición	6	0,78	0,73	5,37	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,07	1	0,07	14,28	0,0195
Listeria	0,07	1	0,07	14,28	0,0195
Error	0,02	4	4,6E-03		
Total	0,08	5			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,15431
Error: 0,0046 gl: 4

Listeria	Medias	n	E.E.	
L5	1,16	3	0,04	A
W1	1,37	3	0,04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

4.4 SLC obtenidos de las BAL provenientes del tratamiento W3 + P

SLC OP9

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,25	7	0,04	1,10	0,4091
Listeria	0,25	7	0,04	1,10	0,4091
Error	0,51	16	0,03		
Total	0,76	23			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,30945
 Error: 0,0320 gl: 16

Listeria	Medias	n	E.E.	
V7	1,43	3	0,10	A
Z1	1,46	3	0,10	A
N7	1,48	3	0,10	A B
U1	1,56	3	0,10	A B
W1	1,57	3	0,10	A B
L5	1,60	3	0,10	A B
GG5	1,62	3	0,10	A B
G7	1,77	3	0,10	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

SLC OP4

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Halo de inhibición	9	0,94	0,92	4,19	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,33	2	0,17	49,14	0,0002
Listeria	0,33	2	0,17	49,14	0,0002
Error	0,02	6	3,4E-03		
Total	0,35	8			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,11631
 Error: 0,0034 gl: 6

Listeria	Medias	n	E.E.	
B7	1,21	3	0,03	A
W1	1,30	3	0,03	A
G1	1,66	3	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

SLC OP5

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,94	7	0,13	25,66	<0,0001
Listeria	0,94	7	0,13	25,66	<0,0001
Error	0,08	16	0,01		
Total	1,03	23			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,12542

Error: 0,0053 gl: 16

Listeria Medias n E.E.

L5	1,17	3	0,04	A
V7	1,22	3	0,04	A
N7	1,27	3	0,04	A
U1	1,41	3	0,04	B
W1	1,44	3	0,04	B
Z1	1,46	3	0,04	B
C5	1,66	3	0,04	C
G1	1,78	3	0,04	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)