

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGONISTA DE
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS COMO ESTRATEGIA
DE BIOCONSERVACIÓN EN CARNE DE POLLO**

Ing. Josefina María DEL RIO

Directora de Tesis: Dra. María Florencia ZACARÍAS

Co-Directora de Tesis: Mg. María Sara SALSI

INSTITUTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

- 2025 -

Los resultados de esta Tesis fueron publicados parcialmente en los siguientes trabajos científicos:

“Estudio de las propiedades superficiales de bacterias ácido lácticas y utilización para biocontrol de serotipos de *Salmonella* aislados de pollo”. Del Rio J., Salsi M.S., Zacarías M.F. IX Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Argentina, Octubre 2024.

“Bacterias ácido lácticas aisladas de fuentes vegetales: caracterización funcional para su aplicación en biocontrol de alimentos *plant based*. Salsi, M.S., Del Río, J., Zacarías, M.F. IX Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Argentina, Octubre 2024.

“Bacterias ácido lácticas aisladas de fuentes vegetales: caracterización tecnológica para su aplicación en alimentos *plant based*”. Salsi, M.S., Del Río, J., Puntillo, M., Fenoglio, C., Vinderola, G., Zacarías, M.F. IX Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Argentina, Octubre 2024.

A mis hijas

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a quienes formaron parte de este equipo de trabajo, mi directora María Florencia Zacarías y mi codirectora María Sara Salsi por su sabiduría, sus consejos e incentivo constante y por el acompañamiento atento en cada momento del desarrollo de esta Tesis.

A Verónica Lancelle por su valiosa colaboración y su buena predisposición en todo momento.

A mis compañeros de las áreas Conservación de Alimentos y Cereales y Oleaginosos del Instituto de Tecnología de alimentos por prestarme desinteresadamente su espacio y equipos.

A Melisa Puntillo por su valioso aporte.

A Andrea Piagentini por sus consejos.

A Carlos Di Gregorio y Adriana Magni de la oficina de posgrado por la paciencia y el asesoramiento recibido todos estos años.

A la Universidad pública por brindar educación gratuita y de calidad, en especial a la Universidad Nacional de Entre Ríos y a la Universidad Nacional del Litoral.

A mis padres que han sido la base de mi formación y un ejemplo en todo sentido.

A mis hermanas por estar siempre presentes.

A Dios por protegerme y darme fuerzas para superar obstáculos a lo largo de toda mi vida.

A mis hijas, Abril y Denise, que me motivan día a día a ser mejor persona y han sido mis mejores maestras.

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Carne de pollo	5
1.1.1. Industria avícola nacional.....	5
1.1.2. Producción avícola nacional.....	6
1.1.3. Consumo interno	7
1.1.4. Valor nutricional	8
1.1.5. Peligros microbiológicos asociados a su consumo	9
1.2. <i>Salmonella</i> spp.....	12
1.2.1. Generalidades	12
1.2.2. Clasificación.....	13
1.2.3. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)	14
1.2.4. Mecanismos de patogenicidad en pollos	14
1.3. Biopelículas	16
1.3.1. Generalidades	16
1.3.2. Propiedades superficiales: hidrofobicidad y autoagregación	17
1.3.3. Formación de biopelícula	18
1.3.4. Biopelícula de <i>Salmonella</i> spp.	21
1.4. Bioconservación.....	22
1.4.1. Generalidades	22

1.4.2. Definición.....	23
1.4.3. Bacterias ácido lácticas	24
1.4.4. Bioconservación en productos cárnicos	26
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivo General.....	27
2.2. Objetivos Específicos	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1. Cepas: conservación y medios de cultivo	28
3.2. Pruebas de antagonismo bacteriano	29
3.2.1. Ensayo de la doble capa de agar.....	29
3.2.2. Ensayo de difusión en agar con sobrenadantes libres de células (SLC)	30
3.2.3. Análisis estadístico.....	32
3.3. Estudio de las propiedades superficiales de BAL y bacterias indicadoras	32
3.3.1. Ensayo de autoagregación.....	32
3.3.2 Ensayo de hidrofobicidad.....	33
3.3.3 Análisis estadístico.....	34
3.4. Determinación de la capacidad de las BAL y de bacterias indicadoras de formar biopelícula.....	34
3.4.1. Formación de biopelícula en placa de poliestireno	35
3.4.2. Cuantificación por tinción con cristal violeta	35
3.5. Determinación de la capacidad de las BAL de reducir biopelículas de bacterias indicadoras	37

3.5.1. Competencia.....	37
3.5.2. Desplazamiento	39
3.5.3. Análisis estadístico.....	40
3.6. Ensayo de antagonismo en medio líquido mediante cultivos mixtos	40
3.6.1. Diseño experimental.....	40
3.6.2. Preparación de cocultivos y cultivos controles	42
3.6.3. Análisis microbiológico	42
3.6.4. Modelado y obtención de los parámetros cinéticos	42
3.6.5. Análisis estadístico.....	44
3.7. Evaluación <i>in situ</i> de la actividad antagonista de <i>L. plantarum</i> F1B frente a aislamientos autóctonos de <i>Salmonella</i> spp. en carne de pollo previamente descontaminada.....	44
3.7.1. Muestras de pollo	45
3.7.2. Ensayo preliminar para seleccionar condiciones de descontaminación de pollo.....	45
3.7.3. Preparación de las suspensiones de inoculación	46
3.7.4. Diseño experimental.....	47
3.7.5. Análisis microbiológico	48
3.7.6. Análisis estadístico.....	48
3.8. Evaluación <i>in situ</i> de la actividad antagonista de <i>L. plantarum</i> F1B sobre la microbiota nativa del pollo y frente a <i>Salmonella</i> Montevideo ITA S5	49

3.8.1. Determinación de las variables operativas para la aspersión de la suspensión de <i>L. plantarum</i> F1B en alitas de pollo	49
3.8.1.1. Ejecución del diseño experimental.....	51
3.8.2. Preparación de la suspensión de aspersión de <i>L. plantarum</i> F1B en sus formatos cultivo fresco (F1B CF) y cultivo liofilizado (F1B CL)	52
3.8.3. Ensayo de antagonismo de <i>L. plantarum</i> F1B como cultivo fresco o liofilizado sobre la microbiota nativa de carne de pollo fresca.....	54
3.8.3.1. Diseño experimental.....	54
3.8.3.2. Análisis microbiológico	55
3.8.4. Ensayo de antagonismo de <i>L. plantarum</i> F1B como cultivo fresco o liofilizado frente a <i>S. Montevideo</i> ITA S5 en carne de pollo fresca	56
3.8.4.1. Preparación de la suspensión de inoculación de <i>S. Montevideo</i> ITA S5 ...	56
3.8.4.2. Diseño experimental.....	56
3.8.4.3. Análisis microbiológico	57
3.8.5. Análisis estadístico	58
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
4.1. Pruebas de antagonismo bacteriano	59
4.1.1. Ensayo de la doble capa de agar.....	59
4.1.2. Ensayo de difusión en agar con sobrenadantes libres de células	61
4.2. Estudio de las propiedades superficiales de BAL y bacterias indicadoras	66
4.2.1. Ensayo de autoagregación.....	66
4.2.2. Ensayo de hidrofobicidad.....	71

4.2.3. Relación entre la autoagregación y la hidrofobicidad	74
4.3. Determinación de la capacidad de las BAL y de bacterias indicadoras de formar biopelícula.....	75
4.3.1. Formación de biopelícula en placa de poliestireno. Cuantificación por tinción con cristal violeta	75
4.4. Determinación de la capacidad de las BAL de reducir biopelículas de bacterias indicadoras	80
4.4.1. Competencia.....	80
4.4.2. Desplazamiento	86
4.5. Ensayo de antagonismo en medio líquido mediante cultivos mixtos	88
4.5.1. Modelado y obtención de los parámetros cinéticos	89
4.5.1.1. Interacciones durante el almacenamiento a 37 °C	89
4.5.1.2. Interacciones durante el almacenamiento a 10 °C	94
4.6. Evaluación <i>in situ</i> de la actividad antagonista de <i>L. plantarum</i> F1B frente a aislamientos autóctonos de <i>Salmonella</i> spp. en carne de pollo previamente descontaminada.....	99
4.6.1. Ensayo preliminar para seleccionar condiciones de descontaminación de pollo.....	100
4.6.2. Interacción entre <i>L. plantarum</i> F1B y aislamientos autóctonos de salmonela en carne de pollo previamente descontaminada.....	101
4.6.3. Comparación del comportamiento de <i>L. plantarum</i> F1B y <i>S. Montevideo</i> ITA S5 en cocultivos líquidos y en pollo descontaminado a 10 ° C	106

4.7. Evaluación <i>in situ</i> de la actividad antagonista de <i>L. plantarum</i> F1B sobre la microbiota nativa del pollo y frente a <i>Salmonella</i> Montevideo ITA S5	108
4.7.1. Determinación de las variables operativas para la aspersión de la suspensión de <i>L. plantarum</i> F1B en alitas de pollo	108
4.7.2. Ensayo de antagonismo de <i>L. plantarum</i> F1B como cultivo fresco (F1B CF) o liofilizado (F1B CL) sobre la microbiota nativa de carne de pollo fresca	111
4.7.3. Ensayo de antagonismo de <i>L. plantarum</i> F1B como cultivo fresco o liofilizado frente a <i>S.</i> Montevideo ITA S5 en carne de pollo fresca	122
5. CONCLUSIONES	133
6. BIBLIOGRAFÍA	136

RESUMEN

El interés por alternativas naturales para la conservación de alimentos ha potenciado el estudio de bacterias ácido lácticas (BAL) como cultivos protectores, dentro de un enfoque tecnológico de barreras para contribuir a la inocuidad alimentaria. Esta Tesis evaluó la actividad antagonista de *Lactiplantibacillus plantarum* F1B-GW (LP F1B, cepa nativa aislada de frutillas) y de *L. plantarum* 299v (LP 299v, probiótico comercial), frente a siete cepas nativas de salmonela (indicadoras), aisladas del ambiente avícola local y sobre la microbiota nativa de carne de pollo. La actividad antagonista *in vitro* de las BAL se evaluó mediante el método de la doble capa y del ensayo de difusión en agar con sobrenadantes libres de células (SLC). Ambas BAL inhibieron el desarrollo de todas las cepas indicadoras en el primer ensayo, mientras que sólo sus SLC ácidos mostraron actividad antagonista para el segundo. Se determinaron las propiedades de autoagregación e hidrofobicidad y la capacidad de formar biopelícula de todas las cepas, en distintos medios de cultivo y a dos temperaturas (4 °C y 37 °C). Las BAL mostraron valores de autoagregación similares y crecientes en el tiempo, superando los porcentajes de las cepas indicadoras. Además, se clasificaron como moderadamente hidrofóbicas mientras que la mayoría de las bacterias indicadoras resultaron altamente hidrofóbicas. La mayoría de las cepas formaron biopelícula en caldo TS a 37 °C pero a 4 °C ninguna, excepto LP 299v. *S. Glostrup* ITA S2 (SG S2, fuerte formadora de biopelícula) y *S. Montevideo* ITA S5 (SM S5, débil formadora de biopelícula) fueron seleccionadas para determinar la capacidad de las BAL para reducir o inhibir la formación de biopelícula de salmonela mediante ensayos de competencia y desplazamiento. En competencia, LP 299v redujo la biopelícula de SG S2 en 0,5 log UFC/ml mientras que en desplazamiento, ambas BAL removieron totalmente las biopelículas de ambas indicadoras. El comportamiento de las cepas en cultivos

planctónicos se evaluó mediante un ensayo de antagonismo en medio líquido (caldos TS y MRS), donde cocultivos (BAL + salmonela) y sus controles se almacenaron a 37 °C por 48 h y a 10 °C durante 10 d. Los recuentos periódicos de cada bacteria en su cultivo control y en cocultivo se modelaron para obtener y comparar sus parámetros cinéticos. Ambas BAL inhibieron el crecimiento de las bacterias indicadoras hasta niveles no detectables tras 18 h de incubación en caldo MRS a 37 °C. No se observaron cinéticas de inhibición de las bacterias indicadoras en los cocultivos a 10 °C en caldo TS, pero en caldo MRS dejaron de detectarse a los 9 d de incubación. Finalmente, se evaluó la capacidad antagonista de LP F1B frente a SM S5 y sobre la microbiota nativa de carne de pollo, en alitas almacenadas a 10 °C durante 4 d. SM S5 fue seleccionada en un ensayo previo en carne de pollo descontaminada, donde su población se redujo significativamente frente a LP F1B en el día 1 de almacenamiento en las condiciones antes mencionadas. LP F1B se aplicó en las muestras por aspersión y en formato de cultivo fresco y liofilizado. A los días 1 y 2 de almacenamiento a 10°C los niveles de SM S5 disminuyeron significativamente respecto al día 0, tanto para el cultivo fresco como liofilizado. Con respecto a la microbiota nativa del pollo, LP F1B (formato fresco) indujo reducción en los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales en el día 1, respecto a la carga inicial. Los recuentos de Enterobacterias, *Pseudomonas* spp, y microorganismos aerobios psicrótrofos totales no presentaron reducciones por la presencia de LP F1B. La cepa nativa LP F1B exhibió características prometedoras como cultivo protector especialmente contra salmonela. Su actividad antagonista se mantuvo aún en formato liofilizado. Los resultados de esta tesis permitieron avanzar en el conocimiento del uso de cultivos de BAL protectores frente a aislamientos nativos de *Salmonella* spp.

SUMMARY

The interest in natural alternatives for food preservation has promoted the study of lactic acid bacteria (LAB) as protective cultures, within an approach of protective technological barriers to contribute to food safety. This Thesis evaluated the antagonist activity of *Lactiplantibacillus plantarum* F1B-GW (LP F1B, native strain isolated from strawberries) and *L. plantarum* 299v (LP 299v, commercial probiotic strain), against seven *Salmonella* strains (indicators), isolated from the local poultry environment, and against the native microbiota of chicken meat. The *in vitro* antagonistic activity of LAB was evaluated by the double layer method and the agar well diffusion assay using cell-free supernatants (CFS). Both LAB inhibited the growth of all indicator strains in the first assay while only the acidic CFS showed antagonistic activity in the second one. The autoaggregation and hydrophobicity properties and the capacity to form biofilm was determined, testing different culture media at two temperatures (4 °C and 37 °C). LAB showed similar and increasing autoaggregation values over time, exceeding the percentages showed by the indicator strains. Furthermore, LAB were classified as moderately hydrophobic while most of the indicator bacteria were found to be highly hydrophobic. Most strains formed biofilm in TS broth at 37 °C but none at 4 °C, except LP 299v. *S. Glostrup* ITA S2 (SG S2, strong biofilm producer) and *S. Montevideo* ITA S5 (SM S5, weak biofilm producer) were selected to determine the ability of LAB to reduce or inhibit *Salmonella* biofilm through competition or displacement mechanisms. In the competition assay, LP 299v reduced the biofilm of SG S2 by 0.5 log CFU/ml while in the displacement assay, both LAB completely removed the biofilms of both indicator strains. The behavior of the strains in planktonic cultures was evaluated by means of an antagonism test in culture medium (TS and MRS broths), where cocultures (LAB + indicator) and their respective controls were stored at 37 °C for 48 hours and at

10 °C for 10 days. Periodic counts of each bacteria in its control culture and in coculture were modeled to obtain and compare their kinetic parameters. Both LAB inhibited the growth of indicator bacteria to non-detectable levels after 18 h of incubation in MRS broth at 37 °C. At 10 °C, no inhibition kinetics of indicator bacteria were observed in cocultures in TS broth. However, they were no longer detected in MRS broth after 9 days of storage at this temperature. Finally, the *in situ* antagonistic capacity of LP F1B was evaluated against SM S5 and against the native microbiota of chicken meat, in chicken wings stored at 10 °C for 4 days. SM S5 was selected based on the results of a previous trial using decontaminated chicken meat, where SM S5 population was significantly reduced by LP F1B on day 1 of storage under the aforementioned conditions. In a second *in situ* assay, SM S5-contaminated fresh chicken wings were treated with LP F1B applied to the samples by spraying. LP F1B was used both as fresh and freeze-dried culture. On days 1 and 2 of storage at 10°C, SM S5 levels decreased significantly compared to day 0, both for the fresh and freeze-dried cultures. Regarding the native microbiota of the chicken, LP F1B (fresh culture format) only induced a reduction in the counts of total mesophilic aerobic microorganisms on day 1, with no effect on the counts of Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp. and total aerobic psychrotrophic microorganisms. LP F1B exhibited promising characteristics as a protective culture, especially against *Salmonella* spp. Its antagonist activity was maintained even as a freeze-dried culture. Although preliminar, the results of this Thesis contributes to the knowledge on the use and benefits of protective LAB cultures against *Salmonella* spp. isolates from poultry environment.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Carne de pollo

1.1.1. Industria avícola nacional

Según el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de Argentina (SENASA), en la última década, la carne de pollo es el producto que presentó el mayor aumento en la demanda del mercado mundial de carnes y representa el 45 % de toda la carne comercializada mundialmente. Según datos del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés), nuestro país se ubicó en el 8° puesto de exportadores de carne aviar durante el año pasado, por detrás de Brasil, Estados Unidos, la Unión Europea, Tailandia, China, Turquía y Rusia, en orden decreciente de importancia. Los datos del Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC) muestran que, durante los últimos cinco años, los principales destinos de las ventas al exterior de carne aviar argentina fueron China (40 %), Sudáfrica (17 %) y Chile (10 %). No obstante, en 2023, según el Centro de Empresas Procesadoras Avícolas (CEPA), nuestro país destinó la producción de carne de pollo a 68 países, destacándose la comercialización hacia países africanos, que posibilitaron canalizar la producción argentina debido a la agilidad en la adecuación de certificados (Fig. 1.1).

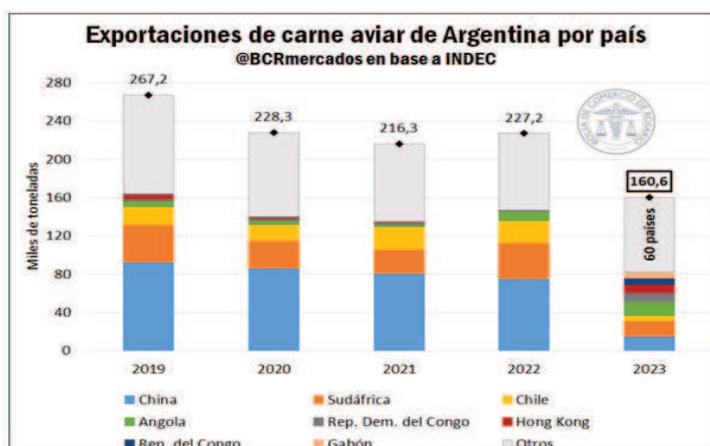


Figura 1.1. Exportaciones de carne aviar de Argentina por país. Informe Bolsa de Comercio de Rosario (julio 2024).

La Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca del Ministerio de Economía de la Nación informa que las exportaciones del sector avícola, entre enero y octubre del año 2024, aumentaron un 20 % en toneladas, respecto al mismo período de 2023. De los datos de la Dirección de Porcinos, Aves y Animales de Granja, se desprende que las exportaciones totales pasaron de 129 mil toneladas a 154 mil toneladas entre enero y octubre de 2024, en donde el 63 % de este volumen corresponde a pollo trozado, 35 % a pollo entero y 2 % a pollo procesado.

1.1.2. Producción avícola nacional

La República Argentina mantiene un espacio en el mercado internacional ocupando el 8° lugar como productor. Según la Bolsa de Comercio de Rosario (BCR), la industria avícola productora de carne emerge como una importante cadena productiva en Argentina, convirtiendo en alto valor agregado materias primas como la soja y el maíz (BCR, 2024). Según datos del CEPA, la producción avícola genera en nuestro país más de 68.000 empleos directos, 9.000 empleos por servicios y, aproximadamente, 8.500 empleos indirectos. A su vez, esta industria se caracteriza por una alta integración vertical, donde la mayoría de las empresas que la componen son productoras de los pollos que procesan. En 2023, de acuerdo con datos de SENASA, la cantidad de aves enviadas a faena en Argentina totalizó 740,5 millones, mientras que, los datos aportados por CEPA indican que la producción de carne aviar en nuestro país aumentó un 2,3 % interanual, alcanzando un récord de 2,5 millones de toneladas (Mt). Esto representa, a su vez, un crecimiento del 7,6 % en relación con el promedio de los últimos cinco años e indica una mejora de la eficiencia en la producción, es decir, un aumento en el kg promedio de las aves enviadas a faena (Fig. 1.2).

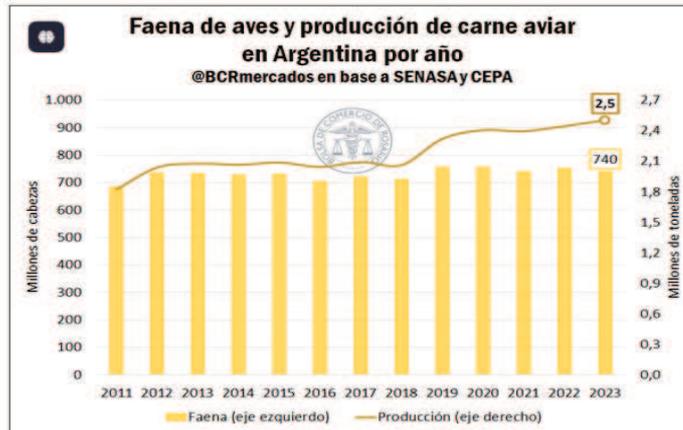


Figura 1.2. Faena de aves y producción de carne aviar en Argentina. Informe Bolsa de Comercio de Rosario (julio 2024).

1.1.3. Consumo interno

El precio de venta de la carne de pollo es significativamente menor comparado con la carne vacuna. En diciembre de 2024, según los datos aportados por la FAO, los precios de la carne de pollo registraron un ligero descenso debido a la abundante oferta de exportación de Brasil. Por el contrario, se observó un aumento de los precios de la carne bovina, como resultado de la fuerte demanda mundial junto con las limitaciones de la producción debido a las paradas rutinarias de mantenimiento de fin de año en las plantas de procesamiento de los principales países exportadores. Todos estos factores hacen a la carne de pollo muy atractiva para los consumidores. Respecto a la demanda interna, los datos de la Secretaría de Bioeconomía (perteneciente al Ministerio de Economía) indican que el consumo ha experimentado un crecimiento sostenido durante los últimos años. En 2003 el consumo anual por persona fue de 20 kg mientras que en 2021 llegó a los 48 kg. Durante 2023 el consumo interno alcanzó un récord de 2,1 Mt, marcando un crecimiento interanual del 1,4 %, y ubicándose 3,6 % por encima del promedio del último quinquenio. El consumo per cápita se ubicó en 49,3 kg, por encima del mayor volumen alcanzado en 2021 (Fig. 1.3).

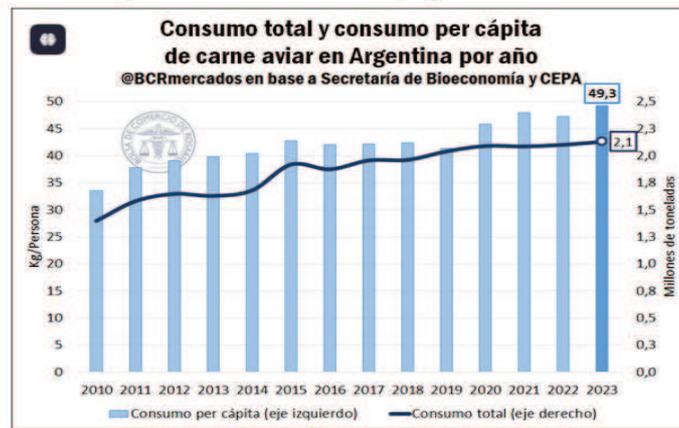


Figura 1.3. Consumo total y per cápita de carne aviar en Argentina por año. Informe Bolsa de Comercio de Rosario (julio 2024).

1.1.4. Valor nutricional

La carne de pollo es reconocida como un alimento nutricionalmente superior, con menor contenido de grasa y mayor contenido de ácidos grasos insaturados que la carne de otras especies (Kumar y col., 2015). Contiene, además, proteínas y aminoácidos de alto valor biológico, vitaminas y otros nutrientes esenciales. La presencia de una mayor cantidad de proteína y una menor cantidad de grasa comparada con la carne vacuna le otorga la capacidad de producir mayor sensación de saciedad en el consumidor (Sharma y col., 2022). Su menor contenido de ácidos grasos saturados resulta en un menor valor calórico, por lo que es adecuada para personas con enfermedades cardiovasculares. Según varios trabajos científicos, el riesgo de tales enfermedades podría reducirse en aproximadamente un 20 % al reemplazar la carne vacuna por carne de pollo en las dietas. Además, existe una relación directa entre el contenido de ácidos grasos saturados en la dieta y la resistencia a la insulina, lo que conllevaría a la aparición de diabetes (Sharma y col., 2022). Esto hace que, la carne de pollo, sea una fuente de proteína muy valorada por las personas que padecen estas enfermedades. Por otra parte, el nivel más bajo de colágeno contribuye a que la carne de pollo sea más fácil de digerir comparado con la carne vacuna. En cuanto a las vitaminas

y minerales, la carne de pollo contiene mayores cantidades de calcio, sodio, fósforo y vitaminas A, B3 (niacina) y B6 que otras carnes (Talukder y col., 2013). Estos nutrientes juegan un papel vital en varias actividades fisiológicas como la síntesis de proteínas, el mantenimiento de los lípidos en niveles bajos, el metabolismo energético, los niveles de colesterol y las funciones intestinales normales.

1.1.5. Peligros microbiológicos asociados a su consumo

La gran disponibilidad de nutrientes y su alto contenido de humedad hacen a la carne de pollo un sustrato óptimo para el crecimiento microbiano. Durante la producción de alimentos frescos de origen animal, el riesgo asociado a la presencia de microorganismos patógenos aumenta considerablemente desde la producción primaria hasta el consumo, ya sea por contaminación cruzada o por las operaciones inherentes al proceso de faena, que consiste básicamente, en transformar aves sacrificadas en canales listas para el consumo humano. En la Figura 1.4 se presenta un esquema simplificado del proceso de faena de pollos. Durante la crianza en granjas y durante el transporte, las aves pueden contaminarse tanto externa (plumas, patas) como internamente (intestino) con microorganismos patógenos. Una vez que estas aves llegan al frigorífico, la contaminación de la planta de faena es inevitable. Esta contaminación, que incluye microorganismos de deterioro y patógenos como *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y estafilococos, puede propagarse entre las aves, a los equipos de la planta y al medio ambiente. En la línea de faena de aves, existen etapas como el escaldado, desplumado, eviscerado, lavado interior-exterior y enfriamiento, en las que podría producirse una contaminación microbiológica importante si no se realiza un adecuado control en cada una de dichas etapas.



Fig. 1.4. Diagrama de flujo simplificado del proceso de faena de pollos.

Particularmente en la evisceración, cuando las vísceras se extraen mecánicamente, los intestinos suelen resultar dañados por la maquinaria, por lo que los canales se contaminan visiblemente con materia fecal. Esta carga microbiana podría ser eliminada durante el lavado exterior o propagarse a otros canales adyacentes (Jiménez y col., 2005). Es por esto que se debe enfatizar y considerar debidamente todos los factores, para garantizar un alimento inocuo y de óptima calidad sensorial y nutricional. Los sistemas de gestión de la inocuidad, desde las Buenas Prácticas (pecuarias y de manufactura), los Procedimientos Operativos Estandarizados de Sanitización (POES) hasta el Análisis de Peligros y Control de Puntos Críticos (HACCP en inglés) se centran en disminuir el riesgo asociado a la presencia de microorganismos patógenos, reduciéndolo a niveles de inocuidad, además de extender la vida útil y mantener un producto nutricional y sensorialmente aceptable por los consumidores. Aun así, la carne de pollo es un alimento frecuentemente asociado a brotes de Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA). Los alimentos de origen animal, en particular los productos avícolas contaminados (huevos y carne), son considerados los principales vehículos de infección por *Salmonella* spp. De los 841 brotes notificados al Sistema de Vigilancia de Brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos de Estados Unidos en el año 2017 (CDC, 2019), las aves de corral se asociaron con 195 (23,11 %), representando el mayor número de brotes, enfermedades y hospitalizaciones, y el segundo mayor número de muertes. De los 149 brotes asociados con aves de corral y causados por un patógeno confirmado, *Salmonella enterica* (43 %) y *Clostridium perfringens* (26 %) fueron los patógenos más comunes (Chai y col. 2017). En 2019, la zoonosis más notificada en la Unión Europea después de la campilobacteriosis (220.682 casos confirmados) fue la salmonelosis con 87.923 casos confirmados (EFSA, 2021). Recientemente, en octubre de 2023, la carne de pollo se ha identificado como la fuente

de un brote multinacional. De dicho brote, se han notificado 335 casos de *Salmonella* Enteritidis ST11 confirmados en laboratorio, en 14 países de la Unión Europea, el Reino Unido y los Estados Unidos, que afectaron a todos los grupos etarios. La mayoría de los casos entrevistados declararon haber consumido carne de pollo, incluidos kebabs. Nueve casos de tres países fueron hospitalizados y un caso de Austria falleció, lo que pone de relieve el potencial desarrollo de infecciones graves y mortales de los brotes. Estos datos permiten visualizar el impacto que *Salmonella* spp. tiene sobre la Salud Pública y dan una idea también de las grandes pérdidas económicas que representan las enfermedades causadas por estas bacterias. Así, proponer mejoras en la producción de alimentos desde el punto de vista de la inocuidad resulta indispensable y debería ser la estrategia para disminuir o evitar estas situaciones.

1.2. *Salmonella* spp.

1.2.1. Generalidades

El género *Salmonella* spp. fue descrito por primera vez por Theobald Smith en 1882 como la aparente causa del "cólera porcino". Smith se equivocó, ya que el "cólera porcino" era en realidad la peste porcina clásica, una infección viral. Pero lo que Smith había encontrado en el bacilo Gram negativo asociado con la enfermedad grave en los cerdos era lo que ahora conocemos como *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. Smith nombró a este nuevo género bacteriano *Salmonella* en honor a Daniel Salmon, otro microbiólogo veterinario pionero y su superior en el USDA. El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados y la mayoría no fermenta lactosa. Son bacterias quimioorganotróficas, capaces de metabolizar la glucosa con producción de ácido o ácido y gas mediante procesos de oxidación y fermentación, son catalasa positivos y

oxidasa negativos, reducen el nitrato a nitrito y tienen un contenido de guanina más citocina (G+C) del 50-53 % (Popoff y Le Minor, 2005). La mayoría de los miembros de este género son móviles debido a flagelos peritricos y sólo unos pocos son inmóviles.

1.2.2. Clasificación

La clasificación actual de *Salmonella* se basa en el esquema de Kaufman-White de serotipificación por el antígeno somático 'O' del lipopolisacárido y el antígeno proteico flagelar 'H'. El género está constituido por tres especies, *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori* y *Salmonella subterranea*, esta última consta de una única cepa ambiental poco usual (Shelobolina y col., 2005). La especie *Salmonella enterica* está subdividida a su vez en 6 subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Sin embargo, el potencial patogénico de esta bacteria está representado por *S. enterica* y sus más de 2.600 serotipos descritos hasta la fecha (Fig. 1.5).

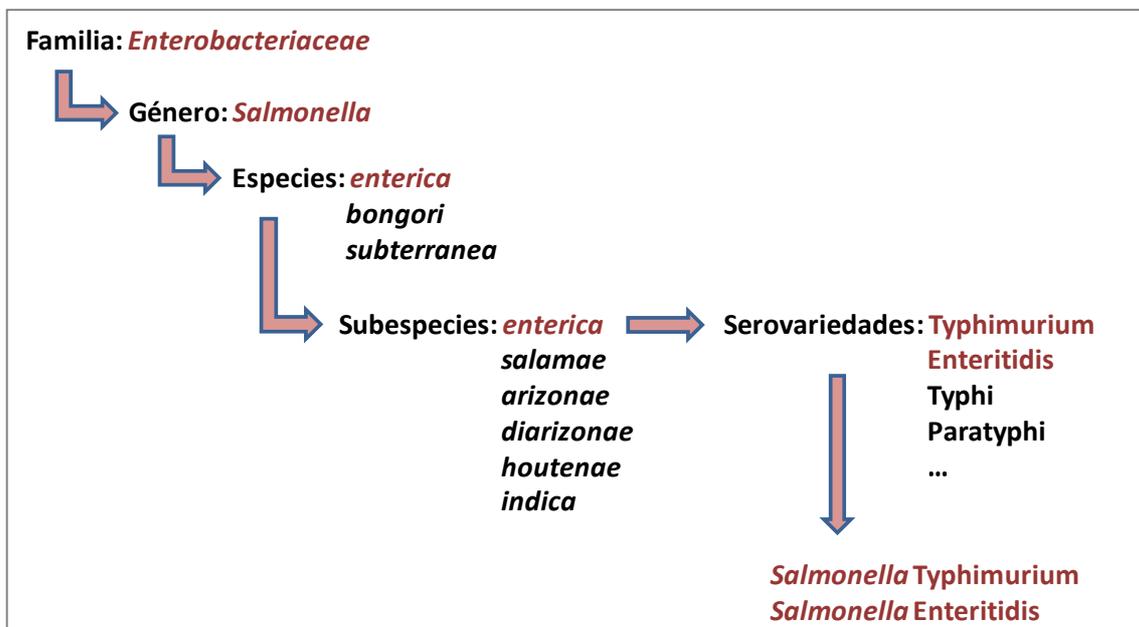


Figura 1.5. Taxonomía del género *Salmonella*.

1.2.3. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)

Salmonella spp. produce dos tipos de enfermedades, salmonelosis y fiebres entéricas. Estas últimas son producidas por los serotipos Typhi y Paratyphi y se relacionan principalmente con agua contaminada. La salmonelosis es una enfermedad zoonótica infecciosa, transmitida a través de una gran variedad de alimentos, muy asociada a carnes y subproductos de aves de corral. Los agentes etiológicos más frecuentes en la salmonelosis son *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis. Usualmente generan una enfermedad gastrointestinal en el ser humano que puede llegar a ser muy grave en niños, ancianos y personas inmunodeprimidas (Barreto y col., 2016). Se presenta como enterocolitis aguda, con aparición repentina de cefalea, dolor abdominal, diarrea acuosa, náuseas y, a veces, vómitos. La deshidratación puede ser grave, frecuentemente hay fiebre, y la diarrea persiste durante varios días. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la dosis infectiva mínima o cantidad necesaria para causar una respuesta clínica de la enfermedad en seres humanos adultos es de 10^5 a 10^8 UFC/g, pero se ha encontrado en algunos casos que de 1 a 10 UFC/g pueden constituir una dosis infecciosa humana dependiendo de la edad, la salud del huésped y las características de la cepa (D'Aoust y col., 1991, Kapperud y col., 1990).

1.2.4. Mecanismos de patogenicidad en pollos

Las aves de corral están frecuentemente contaminadas con este patógeno y llegan a la planta procesadora con una elevada carga bacteriana, tanto externamente como en su tracto digestivo. Tras la infección en pollos, *Salmonella* spp. es capaz de sobrevivir en ambientes poco propicios para su desarrollo como el intestino o el tracto reproductor (Fig. 1.6). Puede atravesar el pH del estómago y, a través de adhesinas como las fimbrias (factores de virulencia), es capaz de adherirse a la pared intestinal.

Dentro del intestino, diversas vías metabólicas le permiten utilizar los nutrientes y provocar inflamación lo que facilita su proceso de colonización en competencia con los anaerobios estrictos del intestino. Algunos serotipos de *Salmonella spp.* también son capaces de colonizar el tracto reproductor y pasar a los huevos en desarrollo en el ovario o en el oviducto antes de la formación de la cáscara (Wigley, 2024).

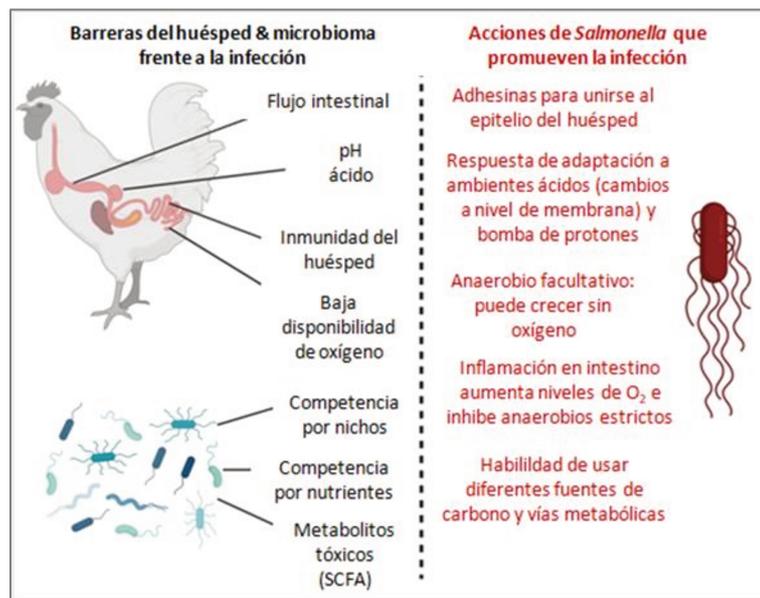


Figura 1.6. Colonización de *Salmonella* en el intestino de las aves (Wigley, 2024).

Salmonella spp. tiene una alta capacidad de adherencia a la fascia muscular, tejido conjuntivo ubicado debajo de la piel del pollo. Esta capacidad se debe principalmente al uso de fimbrias o pili. Esto contribuye a que durante el sacrificio y la posterior elaboración de derivados, las canales frecuentemente queden contaminadas.

1.3. Biopelículas

1.3.1. Generalidades

Las biopelículas (BP) o biofilms son sistemas complejos, formados por una comunidad microbiana sésil, compuesta por microorganismos de una misma o diferentes especies, los cuales se adhieren irreversiblemente a un sustrato o interfase. Están embebidos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, según su sigla en inglés) compuesta principalmente por agua (más del 97 %) y, embebidos en ella, se hallan los componentes estructurales y funcionales solubles como polisacáridos, proteínas y ADN extracelular, e insolubles como flagelos, pili, amiloides, fimbrias y celulosa de polisacáridos. Los microorganismos que forman parte de estas estructuras, expresan un fenotipo propio, diferente a sus contrapartes planctónicas (Fleming y col., 2016). En las BP se pueden diferenciar tres componentes principales:

1. Una masa de células microbianas que constituye la parte sólida de la BP;
2. Espacios intercelulares o canales, los cuales permiten que las BP presenten estructuras tridimensionales y transporten diferentes sustancias en el interior;
3. La matriz de EPS, que constituye el 80 al 90 % de las BP y forma el esqueleto para la generación de la estructura tridimensional y juega un papel fundamental en la adhesión a las superficies y la cohesión (Flemming y Wingender, 2010).

La formación de BP es una estrategia que desarrollan los microorganismos para resistir a condiciones desfavorables, como la presencia de antibióticos y agentes desinfectantes, cambios de pH o temperatura, el sistema inmune del huésped o la baja disponibilidad de nutrientes. Los microorganismos presentes en una BP son mucho más resistentes a los desinfectantes convencionales que en su forma libre o planctónica (Merino y col., 2017). Las BP son consideradas uno de los modos de vida más exitosos y distribuidos en la tierra ya que en la naturaleza y en las industrias el 99 % de los

microorganismos se encuentran formando BP y el 1 % vive en estado individual o planctónico (Kragh y col., 2016).

1.3.2. Propiedades superficiales: hidrofobicidad y autoagregación

Se define a la adhesión como la unión entre una bacteria y un sustrato, cuya interacción puede ser eliminada únicamente entregando cierta cantidad de energía. Las bacterias se adhieren a sustratos mediante interacciones iónicas, a través de puentes de hidrógeno, por interacciones hidrofóbicas o por complejos de coordinación que involucren iones metálicos multivalentes. La hidrofobicidad superficial bacteriana tiene una relación directa con la adhesión bacteriana. Cuando las bacterias tienen propiedades hidrofóbicas tienden a adherirse más fácilmente a superficies hidrofóbicas, lo que facilita la formación de BP. Además, puede afectar la estabilidad y resistencia de la BP ya que las bacterias hidrofóbicas forman una barrera más efectiva contra los agentes desinfectantes y el sistema inmunológico (Colonnella, 2020).

Otra propiedad superficial relacionada con la adhesión a superficies es la autoagregación, que se define como la capacidad que presenta una célula bacteriana de interaccionar con otras bacterias de la misma población formando grumos visibles macroscópicamente que sedimentan clarificando el medio. La capacidad de autoagregación está directamente asociada a la adhesión inicial de las bacterias a las superficies bióticas y abióticas, necesaria para la formación de BP. En este sentido, la determinación de la capacidad de autoagregación, así como la hidrofobicidad superficial, pueden ser utilizadas como un criterio preliminar en la búsqueda de bacterias capaces de adherirse a superficies (Li y col., 2015).

1.3.3. Formación de biopelícula

En la etapa inicial del desarrollo de las BP se han descrito dos mecanismos, los cuales pueden darse simultáneamente, mediante los cuales las células bacterianas toman contacto con la superficie. En uno de ellos, las células planctónicas individuales se adhieren al sustrato mediante la expresión de adhesinas superficiales y posiblemente están involucrados también, factores de motilidad (O'Toole y Kolter, 1998). Las bacterias así adheridas reclutan otras de la suspensión a través de autoaglutininas formando microcolonias (Beloin y col., 2008). Además, las células individuales pueden migrar a lo largo de la superficie, por ejemplo, utilizando pili tipo IV, y luego agregar junto a otras células bacterianas (Fig. 1.7).

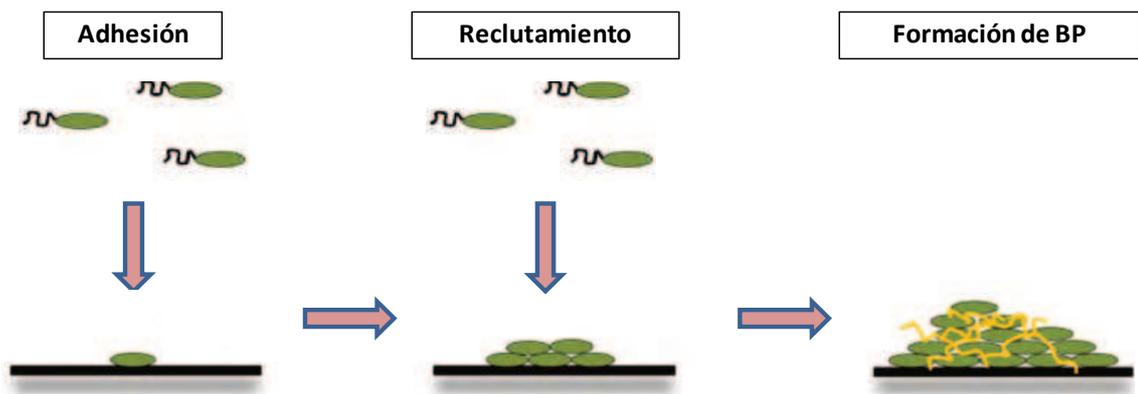


Figura 1.7. Primer mecanismo de adhesión inicial en la formación de BP.

El segundo mecanismo ocurre a partir de células que se agregan en suspensión y luego se asientan en el sustrato para iniciar la formación de BP (Fig. 1.8).

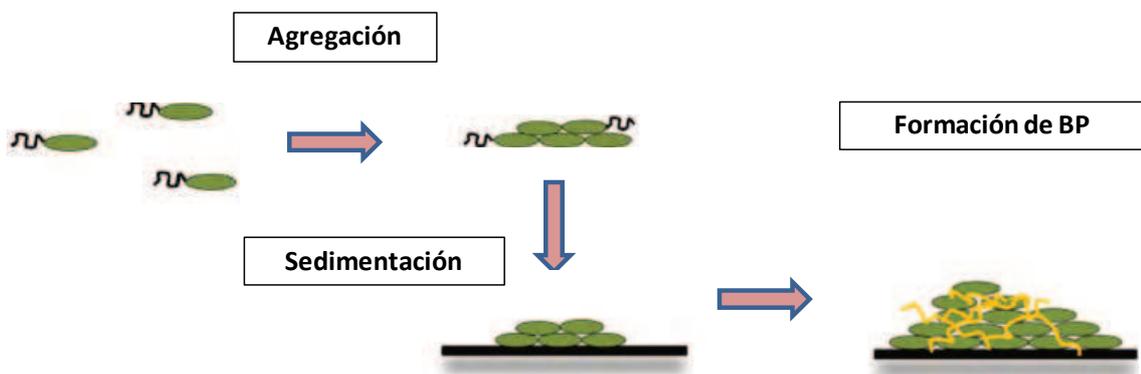


Figura 1.8. Segundo mecanismo de adhesión inicial en la formación de BP.

El proceso de formación de las BP consta de 5 etapas (Fig. 1.9):

- 1) Adhesión reversible de las células en la superficie;
- 2) Adhesión irreversible a la superficie;
- 3) Agregación célula-célula, producción de EPS y *quorum sensing* (QS);
- 4) Expansión y maduración de la BP;
- 5) Desprendimiento de las células, mediante el cual parte de los microorganismos regresan al estado planctónico.

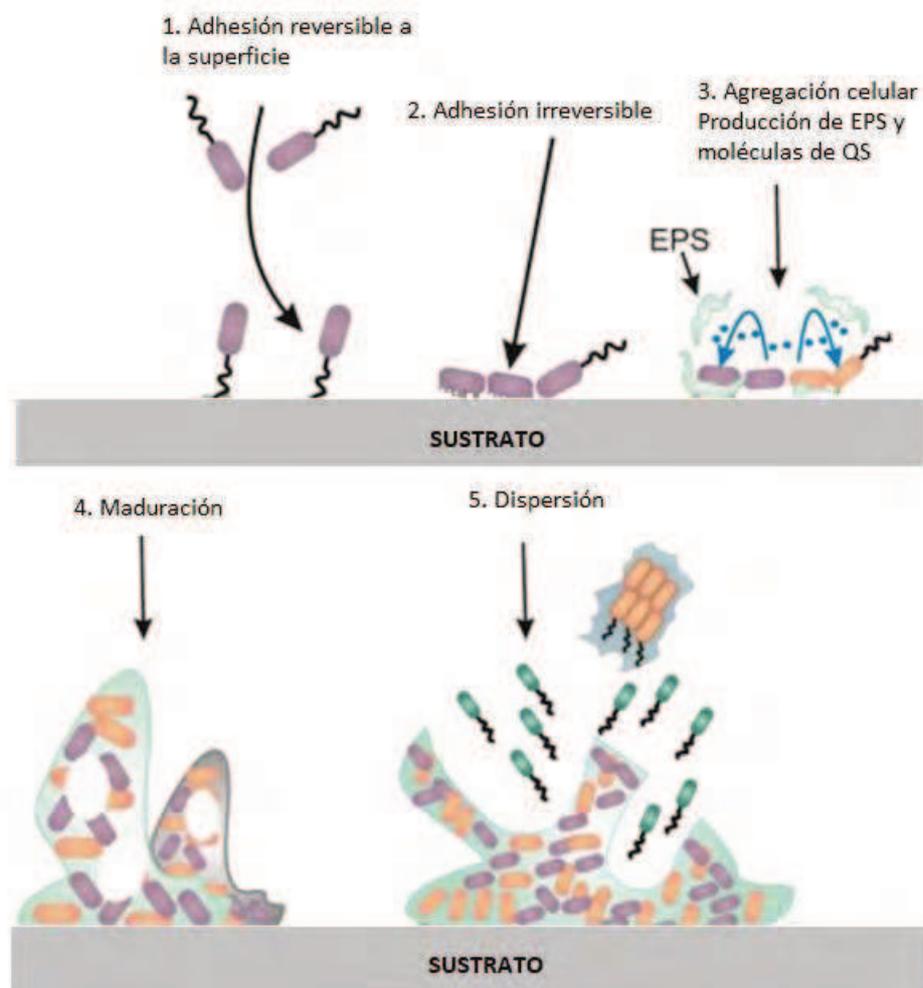


Figura 1.9. Etapas del proceso de formación de BP (Merino, 2019).

Brevemente, en primer lugar, algunas células pasan del estado planctónico a adherirse débilmente a la superficie, utilizando diversas estructuras como flagelos, pili, fimbrias, proteínas de la membrana externa y extracelulares y lipopolisacáridos (LPS). Esta primera etapa se ve afectada por factores ambientales como la disponibilidad nutricional, temperatura, pH, fuerzas hidrodinámicas y propiedades del sustrato (Bazaka y col., 2012). Para que pueda iniciarse el proceso, se ponen en juego fuerzas electrostáticas o Van der Waals. En esta primera etapa, las células aún son capaces de abandonar la superficie y volver a su forma planctónica. En la segunda etapa, si se supera la fuerza de repulsión existente entre el sustrato y las células, comienza el estadio irreversible, en el cual las interacciones son de corto alcance y refuerzan su adhesión en el sustrato (interacciones dipolo-dipolo, uniones hidrógeno, covalentes y no covalentes e interacciones hidrofóbicas). Las interacciones débiles pasan de ser reversibles a irreversibles con la presencia de EPS o ligandos específicos como pili o fimbrias formando un complejo con la superficie. La tercera etapa se caracteriza por la agregación de células en microcolonias y se da la mayor producción de EPS que une con mayor fuerza las células y el sustrato, estabilizando la colonia frente a las condiciones ambientales adversas (Donlan, 2002). La acumulación de bacterias y el reclutamiento de éstas desde el medio puede deberse al mecanismo de comunicación entre células conocido como *quorum sensing*, donde la respuesta se debe a la diferente concentración de moléculas señal. A medida que la población bacteriana aumenta, también lo hace la concentración de señales y una vez alcanzada la concentración umbral, se dice que la población ha llegado al quorum. Esto desencadena la expresión de genes específicos relacionados con el control de procesos celulares tales como la producción de EPS, la de factores de virulencia, y la resistencia a antibióticos (Merino, 2019). Ya en la cuarta etapa la BP madura y se desarrolla dentro de una estructura

organizada que puede tener una forma achatada o tipo hongo, dependiendo de la fuente nutricional. La morfología resultante de la BP madura puede ser suave y plana, rugosa, esponjosa o filamentosa, y también varía en su grado de porosidad. Constituye un ambiente heterogéneo, incluso en BP monoespecie, y el comportamiento de la población varía pronunciadamente en el tiempo y en el espacio. En su interior se observan poros y canales por los cuales se mueven los fluidos cargados de nutrientes, y la actividad fisiológica heterogénea de las BP produce gradientes nutricionales, de aceptores y donantes de electrones y de pH (Chang y col., 2015). En la última y quinta etapa, algunas células de la BP se liberan y vuelven al estado planctónico. De esta forma pueden colonizar otros nichos o superficies (Merino, 2019). Factores externos, tales como fuerzas de cizalla y agotamiento de nutrientes y procesos internos dentro de la BP tales como la degradación enzimática, liberación de EPS o proteínas de unión a superficie, provocan el desprendimiento de las células (McDougald y col., 2012). Es importante señalar que una vez que los microorganismos se adhieren a la superficie y comienza a desarrollarse la BP, cuanto más tiempo transcurre, esta se vuelve más difícil de eliminar (Limoli y col., 2015).

1.3.4. Biopelícula de *Salmonella* spp.

La adhesión de *Salmonella* spp. a las superficies de los alimentos fue el primer fenómeno reportado y publicado sobre BP bacteriana en alimentos (Duguid y col., 1966). Un factor de virulencia importante lo constituye su capacidad de adherirse (principalmente a través de fimbrias curli) y formar BP en la mayoría de los materiales utilizados y en casi todas las condiciones ambientales encontradas en plantas de producción de alimentos, creando así, una fuente permanente de contaminación. Esto les confiere una mayor resistencia a diferentes tipos de estrés ambiental respecto de su

contraparte planctónica y, como muestra ser el modo predominante de vida en el crecimiento bacteriano *in situ*, existe un vínculo directo entre la contaminación en ambientes de procesamiento de alimentos y la contaminación del producto final alimenticio (Rasschaert y col., 2007). Por lo tanto, la persistencia de esta bacteria en BP es una fuente de contaminación permanente y puede significar un importante riesgo para la salud.

1.4. Bioconservación

1.4.1. Generalidades

La industria alimentaria aborda en cierta medida el problema que significa la formación de BP, mediante el uso de distintos compuestos químicos como antibióticos y agentes de desinfección (Saltmarsh e Insall, 2013). En las últimas décadas se han utilizado los conservantes químicos a gran escala en las industrias alimentarias. Sin embargo, varios estudios han demostrado que estos conservantes químicos de alimentos están asociados con problemas y enfermedades toxicológicas (reacciones alérgicas, enfermedades cardíacas, problemas neurológicos y cáncer). Los países desarrollados, especialmente los de la Unión Europea, a través del Reglamento CE N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea, están reduciendo y/o penalizando la aplicación de numerosos agentes químicos y promoviendo el uso de estrategias que respeten tanto la salud de los consumidores y operarios como al medio ambiente. En contraposición, a nivel local, las acciones tendientes a promover y optimizar la producción animal siguen estando basadas casi únicamente en el uso de compuestos químicos. No obstante, es cada vez más frecuente encontrar rechazo entre los consumidores a estos compuestos usados en la industria. La creciente información disponible en la actualidad, impacta notablemente en los hábitos alimentarios del

consumidor y esto genera la demanda de alimentos más naturales, inocuos, con mayor potencial saludable y a la vez elaborados y conservados de forma sostenible. Debido a esto hay un interés creciente por encontrar alternativas naturales y desarrollar nuevos métodos de conservación de alimentos, con el objetivo de eliminar o reducir el uso de conservantes químicos en los alimentos (Kim y col., 2013; Pisoschi y col., 2018).

1.4.2. Definición

El concepto de "bioconservación" refiere al uso de microorganismos y/o sus metabolitos (ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas) para prolongar la vida útil y contribuir a la inocuidad microbiológica, especialmente en productos frescos, mediante el control del deterioro de origen microbiano y la inactivación de microorganismos patógenos (Gálvez y col., 2012; Singh, 2018). Las principales técnicas de bioconservación de alimentos, incluyen la aplicación de bacteriocinas, bacteriófagos, y de cultivos protectores que se componen principalmente de BAL (Noha y col., 2021).

-Las *bacteriocinas* son péptidos antimicrobianos producidos por algunas especies de bacterias Gram-positivas, incluidas las BAL. Actúan sobre la membrana citoplasmática, inhibiendo la síntesis de la pared celular, disminuyendo la actividad de la RNasa y la DNasa, y alterando la permeabilidad de la membrana de la célula objetivo. Su actividad se limita normalmente a las bacterias Gram-positivas y tienen una eficacia limitada contra las bacterias Gram-negativas (Martin – Visscher y col., 2011).

-Los *bacteriófagos* son virus que invaden células bacterianas específicas, alteran su metabolismo y las lisan sin comprometer la viabilidad de la microbiota presente. Están presentes en grandes cantidades en agua, alimentos y tracto digestivo humano y

animal. Se utilizan sólo los que tengan ciclos líticos ya que eliminan rápidamente a su hospedador y aumentan su progenie rápidamente.

- Los *cultivos protectores* son los agentes principales de la bioconservación y consisten en preparaciones de microorganismos vivos que se agregan a los alimentos. Ejercen su actividad antimicrobiana principalmente a través de 3 mecanismos diferentes (Dokka y col., 2018; Ben Said y col., 2019):

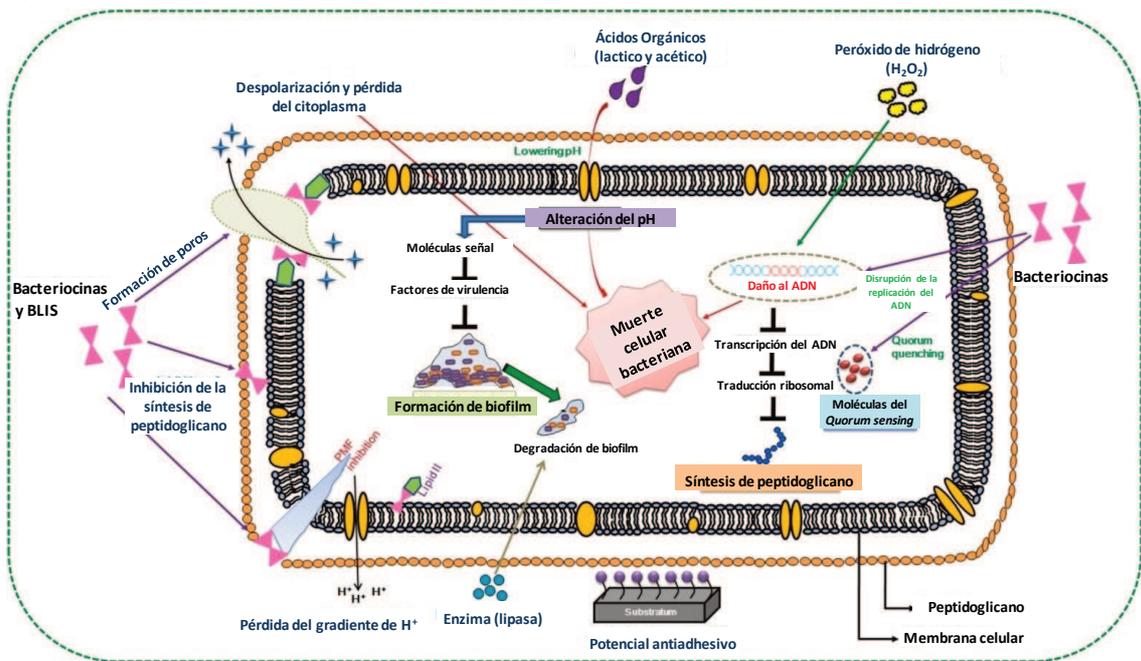
- La producción *in situ* de moléculas inhibidoras, fundamentalmente ácido láctico;
- La competencia con patógenos y microorganismos de alteración por los nutrientes; y
- La exclusión o desplazamiento.

1.4.3. Bacterias ácido lácticas

Las BAL son los microorganismos más ampliamente utilizados como cultivos protectores. El antiguo género *Lactobacillus*, hoy reclasificado en 25 géneros distintos, constituye el grupo microbiano de BAL más comúnmente usado tanto como probiótico como cultivo protector. Están presentes en los alimentos fermentados y tienen una larga historia de uso seguro. En su mayoría, estas bacterias han sido categorizadas según la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, según su sigla en inglés) como GRAS (según su sigla en inglés, Generally Regarded As Safe) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, según su sigla en inglés) las ha incluido en la lista de QPS (Qualified Presumption of Safety, según su sigla en inglés) (Ben Said y col., 2019). Existen varios mecanismos que pueden explicar la actividad antimicrobiana de las BAL y de los lactobacilos en particular, como ser la producción de bacteriocinas y sustancias inhibidoras similares a las bacteriocinas (BLIS), ácidos orgánicos (ácido láctico y otros ácidos de cadena corta) y otras sustancias como peróxido de hidrógeno, etanol y dióxido de carbono, los cuales pueden impedir el

crecimiento de patógenos transmitidos por los alimentos (Ibrahim y col., 2021; Wang y col., 2021). La Figura 1.10 ilustra algunos de los mecanismos hipotéticos de acción antagonista de las BAL contra patógenos transmitidos por los alimentos (incluso cuando forman BP). Las bacteriocinas y BLIS pueden dirigirse a las células microbianas patógenas y crear poros en la pared celular, comprometiendo así la integridad de la célula al perjudicar la fuerza protomotriz del sistema bacteriano (Toushik y col., 2020). Además, la secreción de ácidos orgánicos por parte de las BAL provoca cambios en el pH del entorno, lo que también puede inhibir el crecimiento de patógenos transmitidos por los alimentos sin afectar a la supervivencia de las de las BAL debido a su tolerancia a entornos muy ácidos (Hossain y col., 2020). Por su parte, la acción del peróxido de hidrógeno podría ser el resultado de la oxidación de los grupos sulfhidrilos que provoca la desnaturalización de una serie de enzimas, y de la peroxidación de los lípidos de membrana lo que provoca un aumento de su permeabilidad.

Figura 1.10. Mecanismos hipotéticos de la acción antimicrobiana de las BAL (Toushik y col., 2021).



1.4.4. Bioconservación en productos cárnicos

La mayoría de las investigaciones realizadas hasta la fecha sobre la bioconservación de productos cárnicos mediante la adición de cultivos protectores de BAL se centran principalmente en el diseño de estrategias para eliminar *L. monocytogenes*. Este patógeno es una gran preocupación para los productores de carne debido a su naturaleza ubicua y su capacidad de supervivencia en condiciones adversas (Buchanan y col., 2017). Sin embargo, *Salmonella enterica* es uno de los agentes de ETA más relevantes debido a su impacto en la salud pública y la sanidad animal, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Las BAL pueden ser buenas candidatas para evitar el crecimiento y la formación de BP de *Salmonella* spp. El obstáculo más importante a sortear por los cultivos protectores que se pretendan incluir en los productos cárnicos son las bajas temperaturas empleadas durante todo el procesamiento y conservación. Las BAL utilizadas como cultivos protectores para la bioconservación de alimentos frescos deberían mantenerse viables y mostrar un crecimiento nulo o solo moderado a bajas temperaturas, sin afectar las propiedades sensoriales del alimento. Al aumentar la temperatura, deberían comenzar a crecer rápidamente, acidificar el producto y en consecuencia inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y controlar la microbiota alterante (Dokka y col., 2018).

En general, los agentes bioconservadores no constituyen *per se* una garantía de inocuidad del alimento, pero pueden utilizarse como parte de un enfoque tecnológico de barreras, en el que se combinarían estratégicamente con otras para combatir el deterioro de los alimentos frescos y contribuir a su inocuidad alimentaria.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad de dos cepas de BAL, una nativa y otra comercial, para ser aplicadas como cultivos protectores y de esta manera prolongar la vida útil y contribuir a la inocuidad microbiológica de carne de pollo fresca.

2.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la capacidad antagonista *in vitro* de *Lactiplantibacillus plantarum* F1B-GW, cepa nativa aislada de frutillas de la zona y la cepa comercial *Lactiplantibacillus plantarum* 299v contra cepas nativas de salmonela aisladas del ambiente avícola de la zona (bacterias indicadoras).
- Estudiar las propiedades superficiales de BAL y bacterias indicadoras.
- Determinar la capacidad de las BAL y de las bacterias indicadoras de formar BP a la temperatura óptima de crecimiento de las bacterias en estudio (37 °C) y a temperatura de refrigeración (4 °C).
- Determinar la capacidad de las BAL de reducir BP de las bacterias indicadoras a través de test *in vitro* de competencia y desplazamiento.
- Seleccionar un par BAL/bacteria indicadora de acuerdo a los resultados de las etapas *in vitro* y evaluar *in situ* en pollo la actividad antagonista de la BAL contra la cepa de salmonela seleccionada y la microbiota nativa del producto.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas: conservación y medios de cultivo

Se utilizaron dos cepas de BAL pertenecientes a la especie *Lactiplantibacillus plantarum* (*L. plantarum*). La cepa F1B-GW (LP F1B) fue aislada de frutillas de la zona productora de la provincia de Santa Fe, ubicada sobre el río Coronda, y pertenece a la colección de cultivos del Área de Microbiología de Alimentos del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA - FIQ - UNL). La cepa 299v (LP 299v) es una cepa probiótica comercial, con efectos benéficos a la salud comprobados y más de 60 estudios clínicos (Nordström y col., 2021).

Las cepas indicadoras, pertenecientes a distintos serotipos de *Salmonella enterica*, fueron aisladas de un frigorífico de la ciudad de Santa Fe y caracterizadas por la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Carlos Malbrán” (ANLIS). Pertenecen a la colección de cultivos del Área de Microbiología de Alimentos del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA - FIQ - UNL) y se encuentran detalladas junto a su origen en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Nomenclatura y origen específico de las cepas de salmonela aisladas del ambiente aviar.

Cepa indicadora	Código	Origen
<i>Salmonella</i> Glostrup ITA S2	SG S2	Piel de cuello de pollo
<i>Salmonella</i> Montevideo ITA S5	SM S5	Carne separada mecánicamente
<i>Salmonella</i> Agona ITA S6	SAG S6	Alimento balanceado reproductoras
<i>Salmonella</i> Anatum ITA S10	SA S10	Piel de cuello de pollo
<i>Salmonella</i> Tiphymurium S11B	ST S11B	No especificado
<i>Salmonella</i> Newport ITA S12	SN S12	Piel de cuello de pollo
<i>Salmonella</i> Bredeney ITA S13	SB S13	Piel de cuello de pollo

Todas las cepas se mantuvieron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en los medios de cultivo utilizados para su crecimiento, adicionados con glicerol al 15 % v/v: las BAL se conservaron en caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS, Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) y las cepas indicadoras en caldo Tripteína Soya (TS, Laboratorios Britania S.A., CABA, Argentina). Previo a su utilización, las cepas indicadoras se reactivaron (1 % v/v) en caldo TS ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 16 h) y se repicaron una vez (1 % v/v) en las mismas condiciones. En el caso de las BAL, se reactivaron (1 % v/v) en caldo MRS ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 18 h) y se repicaron dos veces (1 % v/v) del mismo modo en caldo MRS previo a su uso. La determinación de las concentraciones de las BAL y de las bacterias indicadoras se llevó a cabo mediante recuentos en placa utilizándose los medios de cultivo específicos para cada bacteria: agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD, Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) para todas las cepas de salmonela con incubación de 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y agar MRS para las BAL con incubación de 48 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2. Pruebas de antagonismo bacteriano

Se analizó la acción antibacteriana de *L. plantarum* F1B y *L. plantarum* 299v frente a siete cepas indicadoras de salmonela (Tabla 3.1). En primera instancia, la acción antagonista sobre las bacterias indicadoras se estudió mediante el método de la doble capa de agar. Posteriormente se obtuvieron los sobrenadantes libres de células (SLC) de los lactobacilos, los cuales fueron enfrentados con cada una de las bacterias indicadoras que resultaron susceptibles en el ensayo anterior.

3.2.1. Ensayo de la doble capa de agar

Para determinar la acción inhibitoria de ambas cepas de BAL frente a todas las cepas indicadoras se empleó el método de la doble capa de agar (Zacarías y col., 2017)

con ligeras modificaciones. Brevemente, se inoculó una primera capa de agar MRS en el centro de su superficie con una muestra de 5 µl de un cultivo *overnight* (18 h, 37°C) de BAL (ca. 9 log UFC/ml) y se incubó durante 24 h (37 °C, aerobiosis). Luego cada placa se cubrió con una segunda capa de 3,5 ml de agar blando (0,75 % p/v) - TS inoculado con cada una las cepas indicadoras (ca. final 5 log UFC/ml) y se incubó nuevamente (24 h, 37 °C). La actividad antagonista se evidenció por la presencia de una zona de inhibición de crecimiento de la cepa indicadora alrededor de la colonia del lactobacilo (Fig. 3.1). Se midieron y registraron los diámetros de inhibición que fueron expresados en mm. El ensayo se realizó por triplicado.

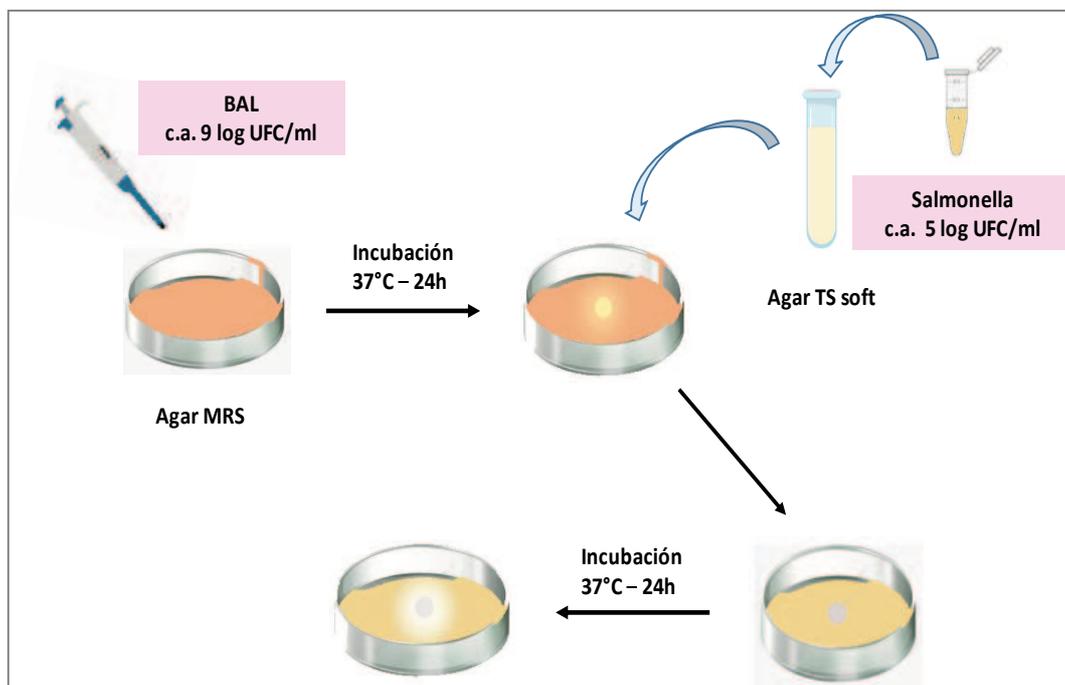


Figura 3.1. Esquema del ensayo de la doble capa de agar.

3.2.2. Ensayo de difusión en agar con sobrenadantes libres de células (SLC)

Se utilizó la metodología descrita por Vinderola y col. (2008). Se obtuvieron SLC por centrifugación de cultivos *overnight* de las BAL (5000 rpm, 10 min) y se filtraron utilizando membranas de Polietersulfona (PES) de 25 mm de diámetro y tamaño de poro de 0,22 µm (GVS, EE. UU.). Los SLC obtenidos se dividieron en dos

alícuotas, una cuyo pH fue neutralizado con NaOH 1 N (SLC - N) mientras que la otra no recibió tratamiento, manteniendo su pH ácido (SLC - A). Los SLC se alícuotaron y mantuvieron a -20 °C hasta el momento de su utilización. Agar TS fundido y atemperado a 45 °C se inoculó con un cultivo *overnight* de la cepa indicadora (ca. final 6 log UFC/ml) y se vertió en placas de Petri. Una vez solidificado el agar, se realizaron pocillos de 6,5 mm de diámetro en donde se colocaron los SLC (SLC-N y SLC-A, 50 µl) de las BAL y caldo MRS (control negativo, 50 µl). Este procedimiento se llevó a cabo al menos por triplicado para cada una de las cepas indicadoras (Fig. 3.2). Las placas se incubaron (37 °C, 24 h) y se registraron los diámetros (mm) de los halos de inhibición del crecimiento en torno a los pocillos.

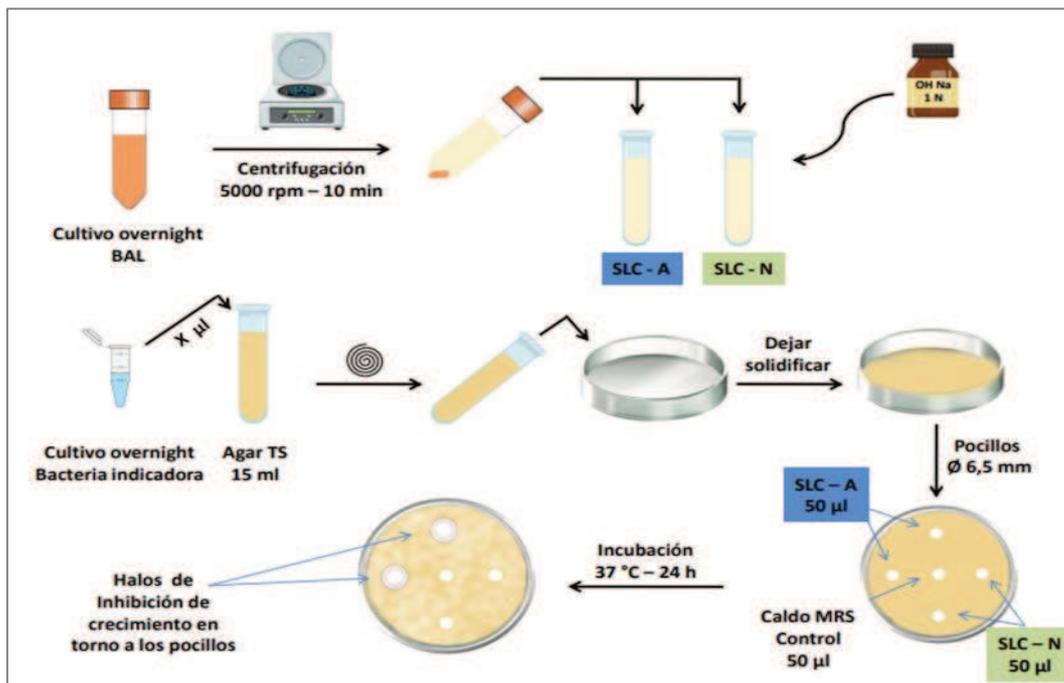


Figura 3.2. Esquema del ensayo de difusión en agar con sobrenadantes libres de células (SLC).

3.2.3. Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos). Para detectar diferencias en la inhibición cada BAL frente a las distintas cepas indicadora se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey s. Para detectar diferencias entre las dos BAL se utilizó el test t. El nivel de significancia estadística se estableció en $p < 0,05$.

3.3. Estudio de las propiedades superficiales de BAL y bacterias indicadoras

3.3.1. Ensayo de autoagregación

Para determinar la capacidad de autoagregación de todas las cepas estudiadas, se siguió la metodología descrita por Collado y col. (2008) con algunas modificaciones. Los cultivos se reactivaron como se indica en el punto 3.1, se centrifugaron (5000 rpm, 10 min) y se lavaron una vez con buffer fosfato salino (PBS, pH 7,2) para eliminar restos del medio de cultivo. Luego, las células de cada pellet se resuspendieron en PBS hasta una $DO_{600} = 0,50 \pm 0,05 (A_0)$ para estandarizar el número de bacterias en $10^7 - 10^8$ UFC/ml. Las suspensiones se repartieron en tubos de hemólisis y se mantuvieron en forma estática en estufa de cultivo a 37 °C durante 2, 4 y 24 h. Finalizada la incubación se extrajo 1 ml de la capa superior y se midió densidad óptica a 600 nm (A) en espectrofotómetro UV/VIS Lambda 20 (Perkin Elmer, USA). Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado para cada una de las cepas estudiadas. La autoagregación (%) se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ Autoagregación} = [(A_0 - A) / A_0] \cdot 100$$

donde A0 y A son las densidades ópticas antes y después de la incubación a 37°C, respectivamente.

3.3.2 Ensayo de hidrofobicidad

Se siguió la metodología de Di Bonaventura y col. (2008) con ligeras modificaciones. Se obtuvieron cultivos lavados y resuspendidos en PBS siguiendo la misma metodología detallada para el ensayo de autoagregación. Las suspensiones celulares se ajustaron a una $DO_{600} = 0,50 \pm 0,05$ (H_0) con PBS, para estandarizar el número de bacterias en $10^7 - 10^8$ UFC/ml. De cada suspensión se trasvasaron 3 ml a frascos de vidrio de 10 mm de diámetro y se agregó 1 ml de xileno (Cicarelli, San Lorenzo, Argentina) (Fig. 3.3). Se mezclaron las fases con vórtex suave durante 2 min a temperatura ambiente y luego los frascos se mantuvieron en forma estática a 37 °C durante 30 min para permitir la separación de fases. En este paso las células se reparten entre ambas fases en función de su hidrofobicidad superficial. Pasado ese tiempo se extrajo la fase acuosa (inferior) y se midió la densidad óptica a 600 nm (H). Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado para cada una de las cepas estudiadas. La hidrofobicidad celular (%) se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hidrofobicidad} = [(H_0 - H) / H_0] \cdot 100$$

donde H_0 y H son las densidades ópticas antes y después de la incubación a 37°C, respectivamente.

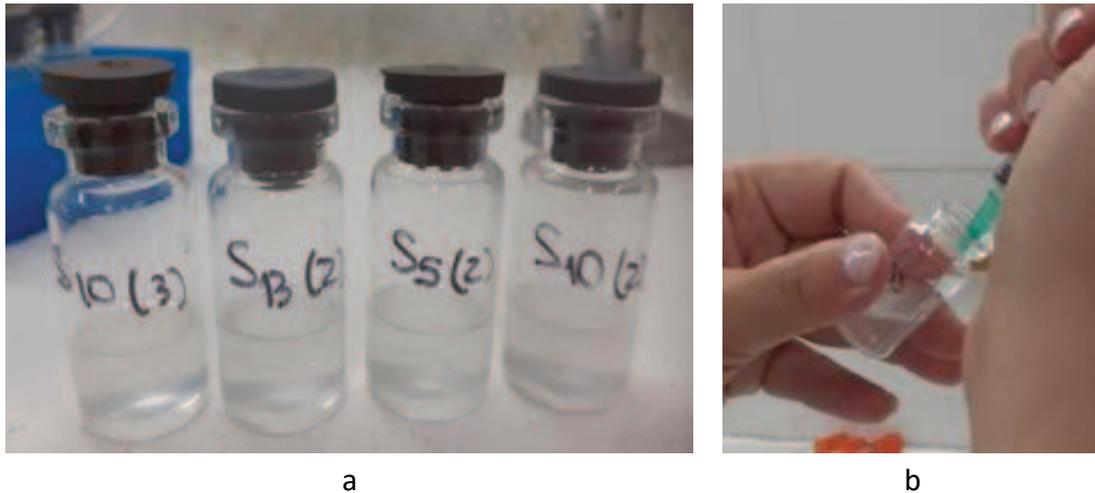


Figura 3.3. Ensayo de hidrofobicidad. (a) Mezcla suspensión salmonela / xileno y (b) extracción fase acuosa.

3.3.3 Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism versión 5.00 para Windows. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de rangos múltiples de Tukey y el test t, para distinguir diferencias entre cepas indicadoras o BAL, respectivamente. La asociación entre la hidrofobicidad y autoagregación se analizó mediante la correlación de Pearson. En todos los casos el nivel de significancia estadística se estableció en $p < 0,05$.

3.4. Determinación de la capacidad de las BAL y de bacterias indicadoras de formar biopelícula

Este método es ampliamente utilizado para cuantificar rápidamente la capacidad de un microorganismo de formar BP. Fue descrito por primera vez en 1985 para estudiar la adherencia de estafilococos coagulasa-negativos a superficies de plástico y

luego fue modificado para mejorar la exactitud en el estudio de la formación de BP (Stepanovic y col., 2004). Se utilizó esta técnica con algunas modificaciones.

3.4.1. Formación de BP en placa de poliestireno

La formación de BP se determinó por el método de tinción con cristal violeta según la metodología descrita por Stepanovic y col. (2004), con algunas modificaciones. Cultivos *overnight* de cada cepa indicadora (16 h) y de cada BAL (18 h) se inocularon al 1 % (v/v) en buffer PBS y caldo MRS y TS. Se distribuyeron 250 µl (por triplicado) de cada una de estas suspensiones (c.a. 7 log UFC/ml) en microplacas de 96 pocillos de poliestireno estéril (fondo plano, Paralwall, China) tal como se muestra en la Figura 3.4 (a). Como control negativo se utilizaron los diferentes medios sin inocular. Se seleccionaron dos temperaturas de incubación, con una ligera diferencia de tiempo de incubación según el tipo de microorganismo. Las microplacas inoculadas con suspensiones de las cepas indicadoras se incubaron a 4 °C durante 7 d y a 37 °C durante 24 h, mientras que aquellas sembradas con las suspensiones de BAL se incubaron a las mismas temperaturas, pero con un día extra a 37°C para permitir el crecimiento bacteriano y la formación de BP. Luego de la incubación, se descartó el medio de cultivo de cada pocillo y se lavó dos veces con PBS para eliminar las bacterias no adheridas.

3.4.2. Cuantificación por tinción con cristal violeta

La BP formada en los pocillos de las microplacas de poliestireno se cuantificó mediante tinción con cristal violeta, un colorante básico que se une a moléculas negativamente cargadas, tiñendo tanto a las bacterias adheridas a la placa como a la matriz extracelular. Una vez lavadas y escurridas las placas, en todos los pocillos se colocaron 250 µl de metanol 99 % (Cicarelli) durante 15 min para permitir la fijación de

la BP. Transcurrido este tiempo, se extrajo el alcohol y la placa se dejó secar al aire a temperatura ambiente durante aproximadamente 25 min. Posteriormente los pocillos se llenaron con solución de cristal violeta al 0,2 % (p/v) (Laboratorios Britania) durante 5 min. A continuación, se descartó el colorante y se realizaron 3 lavados sucesivos con PBS para eliminar el colorante adherido a la placa y no a la BP. Por último, el colorante se extrajo con 250 µl de ácido acético glacial (Cicarelli) por pocillo durante 30 min [Fig. 3.4 (b) y (c)]. Para estimar la capacidad de formación de BP, se midió la densidad óptica (DO) a 570 nm en lector de microplacas espectrofotométrico Asys UVM340 (Biochrom, Cambridge, Reino Unido).

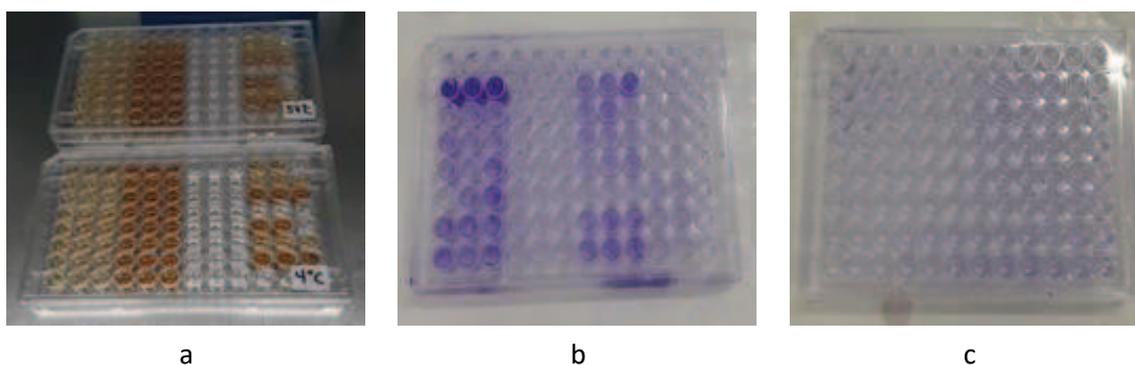


Figura 3.4. Formación de BP en placa de poliestireno. (a) Crecimiento bacteriano y formación de BP en distintos medios (PBS, TS y MRS), a 4°C y 37°C; (b) Extracción de cristal violeta con ácido acético glacial (placa 37 °C) y (c) Extracción de cristal violeta con ácido acético glacial (placa 4 °C).

Para clasificar las cepas estudiadas según su capacidad de formar BP se utilizó el criterio descrito por Stepanovic y col. (2004). Brevemente, se definió un valor de DO de corte (DOc) como 3 desviaciones estándar por encima de la DO promedio del control negativo, el cual fue luego comparado frente a los valores de DO promedio observados para las BAL y cepas indicadoras (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Criterio de clasificación de bacterias según su capacidad de formar BP, de acuerdo al valor de DO (Stepanovic y col., 2004).

Clasificación	Criterio
No forma BP	$DO \leq DO_c$
Débil formadora de BP	$DO_c < DO \leq 2*DO_c$
Moderada formadora de BP	$2*DO_c < DO \leq 4*DO_c$
Fuerte formadora de BP	$4*DO_c < DO$

3.5. Determinación de la capacidad de las BAL de reducir biopelículas de bacterias indicadoras

Para evaluar la capacidad de las BAL de inhibir o reducir la formación de BP de salmonela se realizaron ensayos de competencia y desplazamiento *in vitro*, según la metodología descrita por Woo y Ahn (2013) con ligeras modificaciones. Para estos ensayos se seleccionó, en base a los resultados obtenidos en los ensayos de la sección 3.4, a las cepas indicadoras **S. Glostrup ITA S2** (fuerte formadora de BP) y **S. Montevideo ITA S5** (débil formadora de BP).

3.5.1. Competencia

Para evaluar la capacidad de las BAL de inhibir la formación de BP de *Salmonella* spp. por competencia, se utilizaron placas estériles de poliestireno de 6 pocillos (fondo plano, Henzo Medical, China), con un cubreobjeto de vidrio cuadrado de 20 mm de lado y 0,13 mm de espesor (Glass Klass, China) colocado en el interior de cada pocillo. Se inocularon tubos de caldo TS con cultivos *overnight* de las BAL y las cepas indicadoras seleccionadas (SG S2 y SM S5), de modo de obtener cultivos mixtos de cada par BAL-cepa indicadora en concentraciones iniciales aproximadas de 7 log

UFC/ml y 5 log UFC/ml, respectivamente. Los cocultivos se inocularon (por triplicado) en los pocillos sobre los cubreobjetos, y se incubaron a 37 °C durante 48 h. Como controles positivos se utilizó caldo TS inoculado individualmente con cada cepa bacteriana (en las mismas concentraciones halladas en los cocultivos) y como control negativo se utilizó el medio de cultivo sin inocular. La BP formada se cuantificó mediante la técnica de recuento en placa, luego de extraer los microorganismos adheridos a los cubreobjetos. Para garantizar la recuperación máxima de las células cultivables (y minimizar así la variabilidad en los ensayos) se aplicó la técnica de sonicación de las muestras (Tang y col., 2009) seguida de la agitación con vórtex (Lindsay y von Holy, 1997). Brevemente, luego de la incubación, cada cubreobjeto se retiró de la placa por sus bordes con una pinza estéril, se lavó dos veces con una piseta con agua destilada estéril (agitando suavemente con el fin de eliminar las células no adheridas) y se colocó en un tubo Falcon con 10 ml de PBS. Seguidamente, las muestras se sonicaron 2 min a 20 °C (Digital Ultrasonic Cleaner TB04, TESLAB, Bs. As., Argentina), seguido de 1 min de agitación a máxima velocidad con vórtex. De cada tubo se tomó una alícuota, se realizaron las diluciones decimales con agua de peptona estéril y se sembraron en los medios selectivos y diferenciales correspondientes para cada microorganismo (XLD para *Salmonella* spp. y MRS para las BAL). Todos los resultados se expresaron como UFC/cm². Un esquema simplificado de la metodología se muestra en la Figura 3.5.

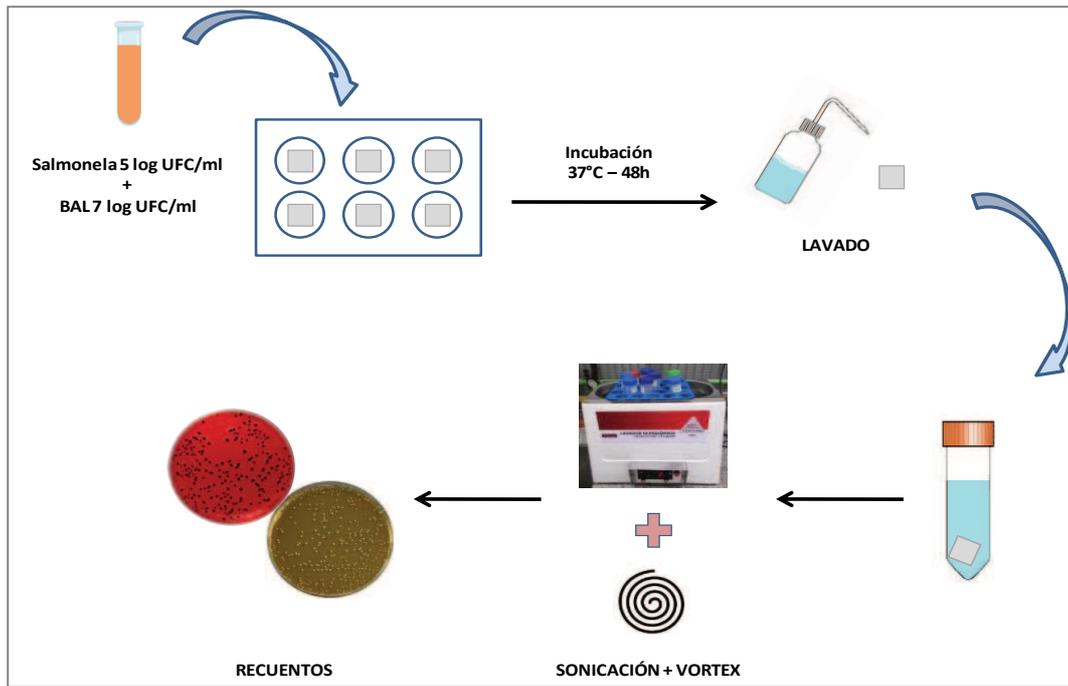


Figura 3.5. Esquema del ensayo de competencia.

3.5.2. Desplazamiento

En este ensayo se utilizaron placas con cubreobjetos en el fondo de cada pocillo al igual que en el ensayo de competencia. Se inocularon tubos de caldo TS con cultivos *overnight* de las cepas indicadoras (ca. 5 log UFC/ml). Los cultivos se inocularon (por triplicado) en los pocillos y las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h, de modo de permitir la formación de BP de salmonela sobre los cubreobjetos. Como control negativo se utilizó el medio de cultivo sin inocular. Luego de la incubación, cada cubreobjeto se retiró de la placa por sus bordes con una pinza estéril, se lavó dos veces con una piseta con agua destilada estéril y se colocaron en nuevas placas de 6 pocillos estériles. En una segunda etapa, se inocularon tubos de caldo MRS con cultivos *overnight* de las BAL (ca. 7 log UFC/ml), se inocularon los pocillos que contenían los cubreobjetos con BP de salmonela y se incubaron a 37 °C durante 48 h. Paralelamente, se realizaron los controles donde se colocó en los pocillos, caldo MRS estéril para poder comparar los recuentos de salmonela en BP, en presencia y ausencia de BAL. La

recuperación de los microorganismos de los cubreobjetos y su posterior recuento se llevó a cabo de la misma manera que en el punto 3.5.1. Un esquema simplificado de la metodología se muestra en la Figura 3.6.

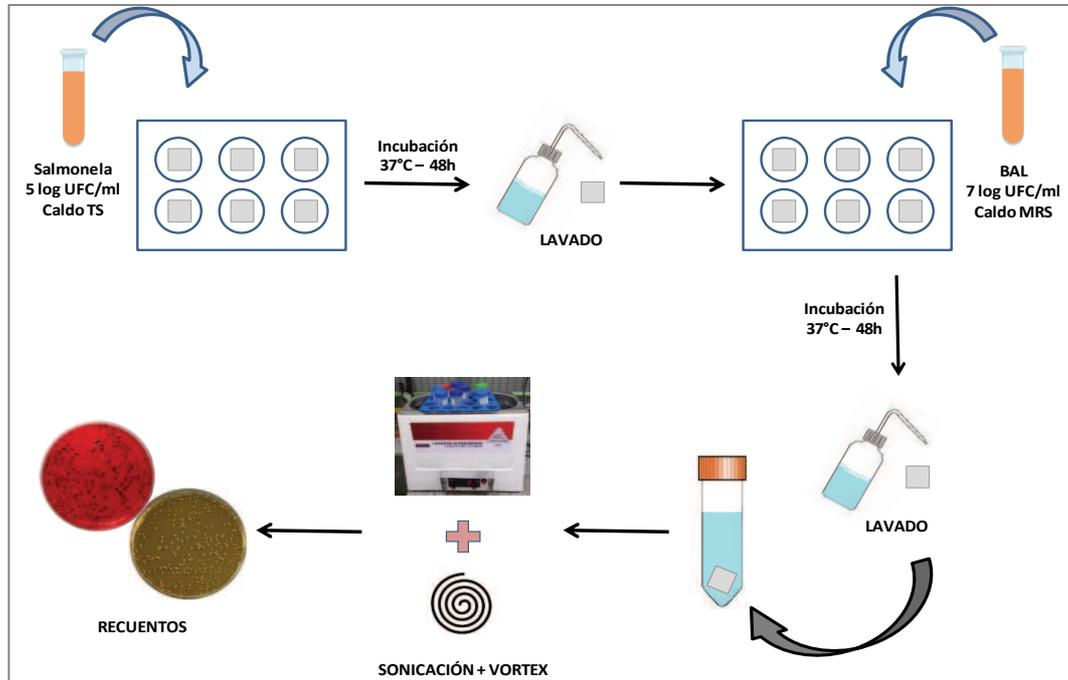


Figura 3.6. Esquema del ensayo de desplazamiento.

3.5.3. Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism versión 5.00 para Windows. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey para distinguir diferencias en los recuentos de BP de todos los grupos, y el test t para comparación de a pares. En todos los casos el nivel de significancia estadística se estableció en $p < 0,05$.

3.6. Ensayo de antagonismo en medio líquido mediante cultivos mixtos

3.6.1. Diseño experimental

Para poder evaluar si las cepas estudiadas en el punto anterior muestran el mismo comportamiento en estado planctónico (CP), o sea en forma libre sin conformar

una BP, se realizó el ensayo de antagonismo en medio líquido. En este ensayo, cultivos mixtos o cocultivos (BAL + bacteria indicadora elegida), al igual que los cultivos control o monocepa fueron incubados a temperaturas controladas. El estudio de la evolución de estos cocultivos permitió determinar la cinética de inhibición de SG ITA S2 y SM ITA S5 frente a las BAL. Se ensayaron dos medios de cultivo:

- TS, caldo de cultivo de uso general;
- MRS, caldo específico para el crecimiento de BAL.

Los cocultivos y sus controles respectivos se almacenaron bajo dos condiciones diferentes: 37 °C durante 48 h y 10 °C durante 10 d (Tabla 3.3). La temperatura 37 °C fue seleccionada por ser la óptima de desarrollo para las cepas indicadoras. La temperatura 10 °C es la temperatura usual de las salas de trozado en las plantas frigoríficas y además equivale a un ligero abuso en el almacenamiento refrigerado de carne de pollo fresca.

Tabla 3.3. Cultivos controles y cocultivos incubados a 37 °C y 10 °C.

CALDO	CULTIVOS	<i>L. plantarum</i> 299 v	<i>L. plantarum</i> F1B	<i>S. Glostrup</i> ITA S2	<i>S. Montevideo</i> ITA S5
	CONTROL	299v	F1B	SG S2	SM S5
TS	COCULTIVO F1B			F1B + SG S2	F1B + SM S5
	COCULTIVO 299v			299v + SG S2	229v + SM S5
	CONTROL	299v	F1B	SG S2	SM S5
MRS	COCULTIVO F1B			F1B + SG S2	F1B + SM S5
	COCULTIVO 299v			299v + SG S2	229v + SM S5

3.6.2. Preparación de cocultivos y cultivos controles

Las cepas se reactivaron como se describió en el punto 3.1., se inocularon de a pares (cepa indicadora + BAL) tanto en caldo MRS como caldo TS de manera de lograr una concentración aproximada de 5 log UFC/ml para la cepa indicadora (SG ITA S2 o SM ITA S5) y de 7 log UFC/ml para la BAL (LP F1B o LP 299v). En paralelo, se prepararon los cultivos controles de cada una de las cepas en ambos medios, en las mismas concentraciones que en los cocultivos.

3.6.3. Análisis microbiológico

Para los cultivos control y cocultivos incubados a 37°C se realizaron recuentos en placa a las 0, 6, 18, 24 y 48h. Para los cultivos control y cocultivos incubados a 10 °C se realizaron recuentos periódicos (cada 24 o 48 h) durante 10d. Los recuentos se realizaron en agar MRS y XLD para BAL y *Salmonella* spp., respectivamente.

3.6.4. Modelado y obtención de los parámetros cinéticos

Los recuentos de BAL y de salmonela se expresaron como logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro (log UFC/ml) y se utilizaron para realizar las curvas experimentales de cada bacteria; tanto en cocultivo como en cultivo control para cada temperatura (10 y 37 °C) y medio de cultivo (MRS y TS) estudiados. Las curvas se ajustaron a un modelo primario, propuesto por Baranyi y Roberts (1994) mediante la aplicación del programa DMFit versión 3.5 (Baranyi y Tamlin, 2004; ComBase; <https://www.combase.cc/index.php/en/2-uncategorised/22-recursos>). Dicho modelo se expresa a través de la Ecuación 1:

$$y(t) = y_0 + \mu_{max} F(t) - \ln\left(1 + \frac{e^{\mu_{max} - 1}}{e^{(y_{max} - y_0)}}\right) \quad (1)$$

Donde, $F(t) = t + \frac{1}{v} \ln(e^{-vt} + e^{-h_0} - e^{-vt-h_0})$; $y(t)$ es el log UFC/ml a cada tiempo t (d); y_0 es la concentración inicial del microorganismo (log UFC/ml); $\mu_{\text{máx}}$ es la máxima velocidad de crecimiento (log UFC ml⁻¹d⁻¹); v se asume igual a $\mu_{\text{máx}}$; h_0 es igual a $(\mu_{\text{máx}} \times \lambda)$; y λ es la duración de la fase lag o de latencia en días.

La ecuación (1) permitió modelar la evolución en el tiempo de los recuentos de BAL y de bacterias indicadoras, a temperatura constante (37 °C y 10 °C) para los distintos medios de cultivo. El software DMFit estimó los siguientes parámetros:

- **Valor inicial (y_0):** concentración inicial de microorganismos (log UFC/ml).
- **Fase lag (λ):** duración de la fase *lag* o de latencia (d).
- **$\mu_{\text{máx}}$:** máxima velocidad de crecimiento (log UFC ml⁻¹d⁻¹).
- **Valor final (y_f):** concentración final de microorganismos (log UFC/ml).

Si se pueden estimar todos los parámetros, el modelo se denomina **completo** (Fig. 3.7(a)). Cuando $\lambda=0$, el modelo es **no lag** (Fig. 3.7 (b)). Si no se logra determinar y_f en el tiempo de ensayo, el modelo se llama **no asintótico** (Fig. 3.7 (c)). El modelo es **lineal** cuando $\lambda=0$, y a la vez no se alcanza un valor de y_f (Fig. 3.7 (d)).

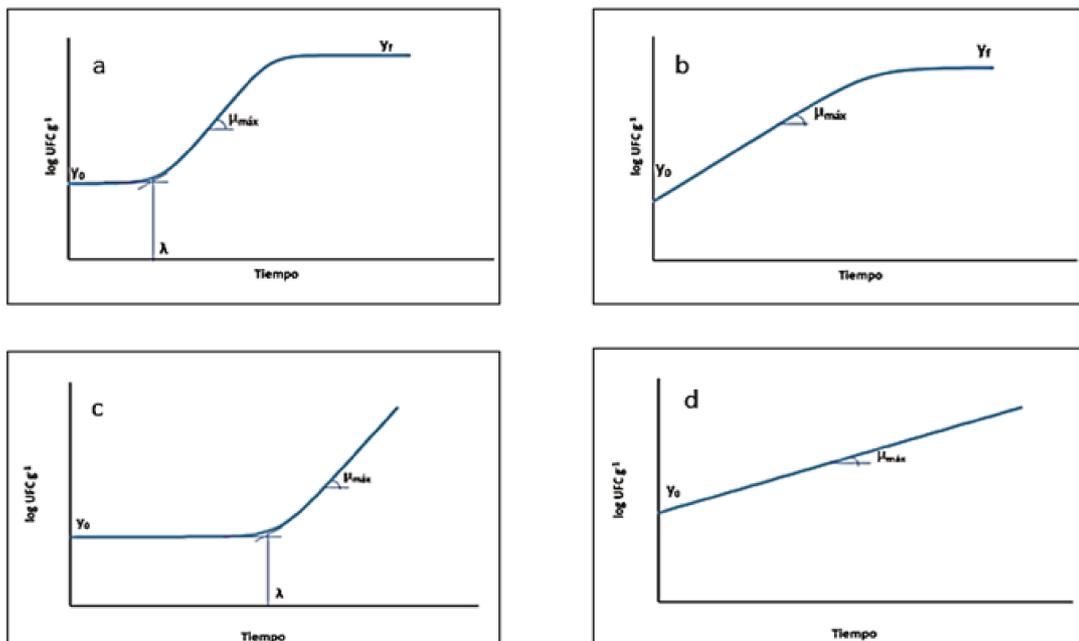


Figura 3.7. Representación de los modelos a) completo; b) no lag; c) no asintótico; d) lineal.

La capacidad de los modelos para predecir con precisión el crecimiento de poblaciones microbianas se evaluó mediante el error estándar del modelo (SE) y el coeficiente de determinación (R^2). El valor R^2 es la proporción de variabilidad en los datos experimentales explicada por el modelo.

3.6.5. Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism versión 5.00 para Windows. Se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey y el test t para distinguir diferencias en los recuentos finales de los cocultivos. El nivel de significancia estadística se estableció en $p < 0,05$.

3.7. Evaluación *in situ* de la actividad antagonista de *L. plantarum* F1B frente a aislamientos autóctonos de *Salmonella* spp. en carne de pollo previamente descontaminada

En ensayos de bioconservación en carnes, aplicar una etapa de descontaminación previa es una estrategia empleada con la finalidad de observar el comportamiento de las cepas en estudio en el alimento modelo (Cho y col., 2010; Morales y col., 2020; Tang y col., 2023). Además, permite analizar la interacción entre las mismas, minimizando las interferencias debidas a posibles interacciones (competencia, sinergismo o antagonismo) con otras especies bacterianas presentes en la microbiota nativa del mismo. En este ensayo se evaluó la actividad antagonista de *Lactiplantibacillus plantarum* F1B, potencial agente biocontrolador, en carne de pollo (*in situ*) previamente descontaminada, frente a *Salmonella* Glostrup ITA S2 y *Salmonella* Montevideo ITA S5. *L. plantarum* F1B fue seleccionada para los ensayos *in situ* debido a que se trata de un aislamiento que demostró en las pruebas *in vitro*

características similares a la cepa comercial *L. plantarum* 299v, y para avanzar en su estudio como cultivo protector.

3.7.1. Muestras de pollo

Se eligieron para estos ensayos alitas de pollo debido a su tamaño reducido y a las características de su estructura superficial, más variable en comparación con una parte deshuesada y/o sin piel. Las alitas de pollo fueron adquiridas en un frigorífico de aves de la ciudad de Santa Fe, el día de su faena. Fueron trasladadas hacia el laboratorio de Microbiología de Alimentos (ITA - FIQ) y procesadas en el mismo día. Durante su traslado y previo al tratamiento de descontaminación se mantuvieron a temperatura de refrigeración. Las alitas fueron acondicionadas, pesadas y manipuladas en condiciones asépticas durante todo el ensayo.

3.7.2. Ensayo preliminar para seleccionar condiciones de descontaminación de pollo

Para seleccionar el tratamiento descontaminante más adecuado se realizó un ensayo comparando 3 procedimientos diferentes:

- *Descontaminación con vapor fluente*: las alitas se colocaron en autoclave con vapor fluente, contenidas en cestillas que permitían el libre paso del vapor y se mantuvieron allí durante 30 s. Luego, para secar su superficie fueron colocadas bajo flujo de aire estéril en flujo laminar vertical BBS-V800 (Biobase, China) durante 20 min (Kure y col., 2020).
- *Descontaminación con vapor fluente más UV-C*: las alitas se colocaron en autoclave con vapor fluente, contenidas en cestillas que permitían el libre paso del vapor y se mantuvieron allí durante 30 s. Una vez retiradas, se colocaron

bajo luz UV-C en flujo laminar vertical durante 15 min de cada lado (Kure y col., 2020).

- *Descontaminación por inmersión en mezcla de ácidos*: las alitas se sumergieron durante 30 s en una solución al 0,4 % de ácido cítrico y ácido acético glacial (pH 2,6). Al finalizar se escurrieron en flujo laminar y luego se llevaron a heladera (4 °C) durante 1 h (Menconi y col., 2013).

En todos los casos, la descontaminación de las muestras fue corroborada mediante recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales (PCA, 30 °C/48h) el mismo día del ensayo.

3.7.3. Preparación de las suspensiones de inoculación

Se definieron las concentraciones aproximadas deseadas en el pollo de LP F1B y de las cepas indicadoras: 8 log UFC/g de pollo de *L. plantarum* F1B y 4 log UFC/g de pollo de salmonela. Para esto, un cultivo *overnight* de LP F1B se centrifugó (5000 rpm, 10 min), se lavó 2 veces con PBS (pH 7,2) y se concentró en el mismo diluyente, de manera de alcanzar una concentración aproximada de 10,5 log UFC/ml (**susp. inoc. grupo F1B**). Para las cepas indicadoras, cultivos *overnight* de *S. Glostrup* ITA S2 y *S. Montevideo* ITA S5 se lavaron y diluyeron en PBS, hasta una ca. de 7 log UFC/ml (**susp. inoc. grupos S2 y S5**). Finalmente, se mezclaron en tubos partes iguales de *L. plantarum* F1B y de *S. Glostrup* ITA S2 o *S. Montevideo* ITA S5 (**susp. inoc. grupos F1B+S2 y F1B+S5**). Las suspensiones se prepararon inmediatamente previo a la inoculación experimental de la carne de pollo.

3.7.4. Diseño experimental

En base a los resultados obtenidos en la prueba preliminar, las alitas de pollo se descontaminaron con vapor fluente en autoclave, tal como se describe en el punto 3.7.2. [Fig. 3.8 (a)]. Luego se llevaron a refrigeración hasta el momento del ensayo, realizado en el mismo día. Las alitas de pollo descontaminadas (65 ± 5 g) fueron distribuidas aleatoriamente en 6 grupos de 8 unidades cada uno según se detalla en la Tabla 3.4.: alitas sin tratar o materia prima (**MP**), alitas tratadas con suspensión de *L. plantarum* F1B (**F1B**), alitas tratadas con suspensión de *S. Glostrup* ITA S2 (**S2**), alitas tratadas con suspensión de *S. Montevideo* ITA S5 (**S5**), alitas tratadas con suspensión de *L. plantarum* F1B + *S. Glostrup* ITA S2 (**F1B/S2**) y alitas tratadas con suspensión de *L. plantarum* F1B + *S. Montevideo* ITA S5 (**F1B/S5**).

Tabla 3.4. Resumen de muestras de alitas de pollo descontaminadas, almacenadas a 10 °C con sus respectivos tratamientos.

Grupo	BAL		Salmonela	
	Cepa	Log UFC/g pollo	Cepa	Log UFC/g pollo
MP	–	–	–	–
F1B	LP F1B	8	–	–
S2	–	–	SG S2	4
S5	–	–	SM S5	4
F1B + S2	LP F1B	8	SG S2	4
F1B + S5	LP F1B	8	SM S5	4

(MP) materia prima, (F1B) alitas tratadas con suspensión de LP F1B, (S2) alitas tratadas con suspensión de SG S2, (S5) alitas tratadas con suspensión de SM S5, (F1B + S2) alitas tratadas con suspensión de LP F1B + SG S2 y (F1B + S5) alitas tratadas con suspensión de LP F1B + S5.

Las alitas de pollo se inocularon en una de sus caras con 130 μ l de la suspensión de inoculación según su grupo, usando micropipeta y espátula de Digrafsky [Fig. 3.8 (b)]. Se dejaron reposar 20 min en flujo laminar para facilitar la adherencia y luego se colocaron en bandejas plásticas y almacenaron a 10°C en heladera. La temperatura elegida para todos los ensayos fue de 10 °C, ya que esta temperatura representa la equivalente a un ligero abuso en el almacenamiento refrigerado de carne de pollo fresca y a la vez es la temperatura usual de las salas de trozado en las plantas frigoríficas.

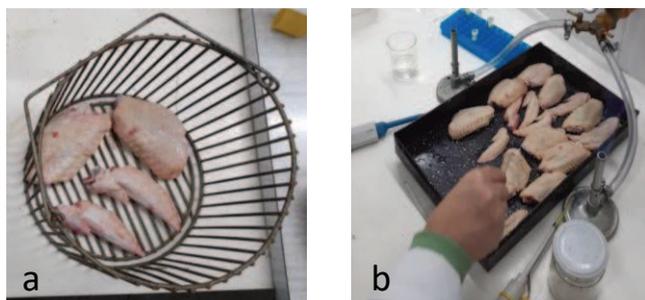


Figura 3.8. Antagonismo *in situ* en carne de pollo descontaminada. a) Descontaminación con vapor fluyente; b) Inoculación.

3.7.5. Análisis microbiológico

Para monitorear la evolución de las BAL y las bacterias indicadoras en el pollo descontaminado se realizaron recuentos en agar MRS y agar XLD, respectivamente, como se describió en el punto 3.1. Los análisis se llevaron a cabo a los 0, 1, 2 y 4 d de conservación a 10 °C. Para ello, cada alita de pollo se colocó en una bolsa de *stomacher* y se agregó un volumen de agua de peptona 0,1 % igual a su peso (dilución 1:2). Se realizaron las diluciones decimales correspondientes y los recuentos con siembra en superficie.

3.7.6. Análisis estadístico

Para analizar los recuentos en pollo, se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism versión 5.00 para Windows. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido

del test de comparaciones múltiples de Tukey y el test t para distinguir diferencias en los recuentos de cada microorganismo. El nivel de significancia estadística se estableció en $p < 0,05$.

3.8. Evaluación *in situ* de la actividad antagonista de *L. plantarum* F1B sobre la microbiota nativa del pollo y frente a *Salmonella* Montevideo ITA S5

En la última etapa de esta Tesis se evaluó en carne de pollo fresca (sin descontaminar) el potencial bioprotector de *L. plantarum* F1B sobre la microbiota nativa del alimento y frente a *S. Montevideo* ITA S5 (seleccionada en función de los resultados obtenidos). Para simular la aplicación del cultivo protector en condiciones próximas a la realidad de una planta, *L. plantarum* F1B **se aplicó en forma de aspersión** y en dos formatos tecnológicos: cultivo fresco (F1B CF) y cultivo liofilizado (F1B CL). Al igual que en el ensayo anterior, las alitas de pollo fueron adquiridas en un frigorífico de aves de la ciudad de Santa Fe, el día de su faena. Fueron trasladadas hacia el laboratorio de Microbiología de Alimentos (ITA - FIQ) y procesadas el mismo día. Durante el traslado y hasta el momento de las pruebas se mantuvieron a temperatura de refrigeración (4°C).

3.8.1. Determinación de las variables operativas para la aspersión de la suspensión de *L. plantarum* F1B en alitas de pollo

Al utilizarse una metodología de aspersión para aplicar el cultivo de *L. plantarum* F1B (en lugar de inoculación directa como se utilizó en el ensayo descrito en la sección 3.7.), fue necesario ajustar algunas de las variables involucradas de modo de garantizar que la concentración final de BAL en pollo sea adecuada para una

estrategia de biocontrol. Se utilizó la metodología de superficie de respuesta aplicando un diseño de Box Behnken con 2 factores en 3 niveles (10 experimentos con 2 réplicas en el punto central). Los dos factores analizados fueron la concentración de la suspensión de aspersión de *L. plantarum* F1B y la relación peso de muestra / volumen de suspensión de aspersión (Tabla 3.5). El rango de concentraciones de LP F1B estudiadas se seleccionó en base a concentraciones generalmente utilizadas para BAL en ensayos *in situ* de bioconservación (generalmente concentraciones ≥ 7 log UFC/ml o g de producto) y a limitantes de infraestructura (biofermentadores, centrífugas para grandes volúmenes) y económicas para producir biomasa en concentraciones aún mayores a las estudiadas. Las relaciones peso/volumen ensayadas se establecieron de acuerdo a resultados de ensayos previos.

Tabla 3.5. Variables operativas de aspersión a utilizar en el diseño experimental de Box Behnken: concentración de la suspensión de aspersión de *L. plantarum* F1B y la relación peso de muestra / volumen de la suspensión de aspersión.

Variables independientes		Niveles
		7
Concentración de la suspensión de aspersión de <i>L. plantarum</i> F1B	$C_{F1B\ asp}$ (log UFC/ml)	8
		9
		5
Relación peso muestra/volumen de la suspensión de aspersión	R (g/ml)	10
		15

Se propone una ecuación polinomial de segundo orden para modelar las respuestas en función de las dos variables independientes de proceso (Montgomery, 2004) y es la siguiente:

$$Y_k = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^2 \beta_{ki}X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{kii}X_i^2 + \beta_{kij}X_iX_j$$

Donde:

- Y_k = Respuesta = Concentración de *L. plantarum* F1B en alitas de pollo (log UFC/g).
- X_i son las variables independientes:
 - X_1 = Concentración de la suspensión de aspersión de *L. plantarum* F1B, C_{F1Basp} (log UFC/ml).
 - X_2 = Relación peso de muestra / volumen de suspensión de aspersión, R (g/ml).
- β_k = son los coeficientes del modelo para cada respuesta.

Finalmente, se optimizó la respuesta, de manera determinar la concentración de la suspensión de aspersión de *L. plantarum* F1B y la relación peso/ volumen óptimos para lograr alcanzar la mayor concentración de *L. plantarum* F1B en las alitas de pollo.

3.8.1.1. Ejecución del diseño experimental

Cultivos *overnight* de *L. plantarum* F1B (ca. 9 log UFC/ml) se centrifugaron (5000 rpm, 10 min), se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en el mismo buffer hasta alcanzar las concentraciones indicadas en el diseño experimental (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Diseño experimental de Box-Behnken para estudiar el efecto combinado de las variables operativas de la aspersión: concentración de la suspensión de aspersión de *L. plantarum* F1B y la relación peso de muestra / volumen de la suspensión de aspersión.

Corrida experimental	Concentración F1B (log UFC/ml)	Relación p/v (g/ml)
1	9	5
2	8	5
3	7	5
4	9	10
5	8	10
6	8	10
7	7	10
8	9	15
9	8	15
10	7	15

Los volúmenes de aspersión se calcularon en base a los pesos de las alitas de pollo, para cumplir la relación peso/volumen especificada por el diseño para las distintas corridas experimentales. Las alitas se colgaron en una estructura de acero inoxidable diseñada para este ensayo y, para cada punto experimental, la aspersión se llevó a cabo sobre ambas superficies del pollo con un dispositivo manual a una distancia de 15 cm y flujo de aspersión constante. Una vez finalizada la aspersión, las alitas se llevaron a flujo laminar durante 20 min para favorecer la adhesión. Los niveles de BAL en pollo se determinaron mediante recuentos en placa en agar MRS (37 °C, 48h).

3.8.2. Preparación de la suspensión de aspersión de *L. plantarum* F1B en sus formatos cultivo fresco (F1B CF) y cultivo liofilizado (F1B CL)

En base a los resultados obtenidos en la sección 3.8.1., para maximizar la concentración de *L. plantarum* F1B en el pollo se utilizó una concentración de la

suspensión de aspersión de *L. plantarum* F1B de 9 log UFC/ml y una relación peso de muestra/volumen de suspensión de aspersión igual a 5 g/L. Para preparar la suspensión en formato cultivo fresco, cultivos *overnight* de *L. plantarum* F1B (ca. 9 log UFC/ml) se centrifugaron (5000 rpm, 10 min), lavaron 2 veces con PBS (pH 7,2) y se resuspendieron en el mismo volumen de suspensión de maltodextrina 2 % p/v (Ingredion, SP, Brasil). Para la suspensión en formato liofilizado, cultivos *overnight* de *L. plantarum* F1B se centrifugaron (5000 rpm; 10 min), se lavaron 2 veces con PBS y se concentraron en una solución de maltodextrina al 15 % (p/v). La suspensión se distribuyó en cristalizadores de vidrio Duran de 90 mm de diámetro interno (Schott, Mainz, Alemania), se congeló a -70 °C y se liofilizó durante 24 h en un liofilizador escala laboratorio (Christ Alpha 1–4 LD Plus, Osterode am Harz, Alemania) (Fig. 3.9). Las condiciones de liofilización fueron 0,002 mbar / -55°C (temperatura de condensador) durante 20 h (secado primario), seguido de 4 h de secado final a +25 °C. Se realizaron los recuentos en agar MRS del cultivo liofilizado, se midió la actividad acuosa del mismo (Aqualab CX2, Decagon Devices, Estados Unidos) y se lo almacenó a -20 °C hasta su uso.

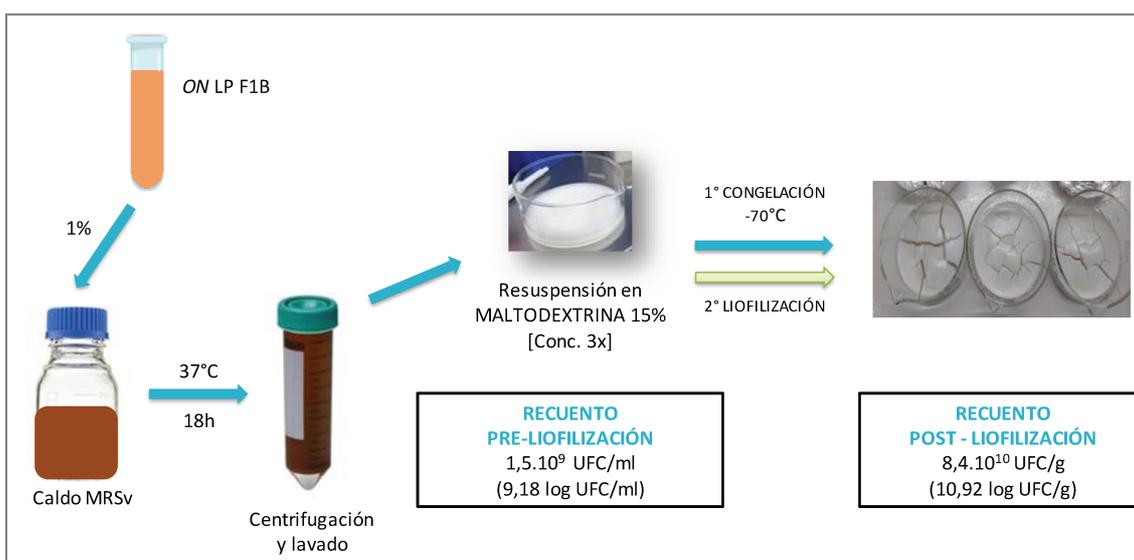


Figura 3.9. Preparación del cultivo de LP F1B liofilizado (F1B CL).

Inmediatamente antes de la aspersión, se preparó la suspensión de F1B CL disolviendo el cultivo liofilizado en agua destilada estéril, de manera de obtener una concentración aproximada de 9 log UFC/ml. La dilución del cultivo liofilizado resultó en una concentración de maltodextrina (usada como crioprotector) en la suspensión final de 2 % p/v, por lo que esta fue la concentración utilizada en la preparación de F1B CF y en la suspensión control.

3.8.3. Ensayo de antagonismo de *L. plantarum* F1B como cultivo fresco o liofilizado sobre la microbiota nativa de carne de pollo fresca

3.8.3.1. Diseño experimental

Alitas de pollo fresco ($64,5 \pm 4,1$ g) fueron distribuidas aleatoriamente en 4 grupos de 8 unidades cada uno: alitas sin tratar o materia prima (**MP**); alitas control tratadas con solución de maltodextrina al 2 % (**C**); alitas tratadas con suspensión *L. plantarum* F1B en formato cultivo fresco (**F1B CF**); y alitas tratadas con suspensión de *L. plantarum* F1B en formato cultivo liofilizado (**F1B CL**). Las alitas se colgaron en una estructura de acero inoxidable y la aspersión se llevó a cabo sobre ambas superficies con un dispositivo manual a una distancia de 15 cm y flujo de aspersión constante (Fig. 3.10).

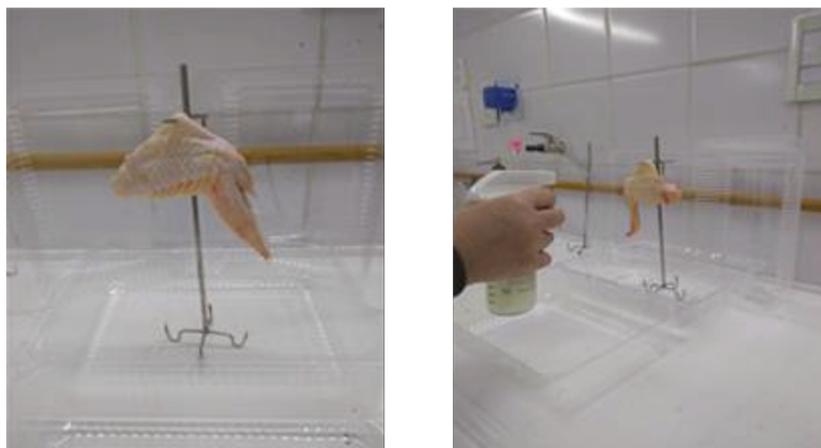


Figura 3.10. Ensayo LP F1B vs. microbiota nativa. Aspersión con las suspensiones F1B CF y F1B CL.

Las alitas se dejaron reposar 20 min en flujo laminar para facilitar la adherencia. Luego fueron colocadas en bandejas plásticas y almacenadas a 10°C hasta su procesamiento (Fig. 3.11).

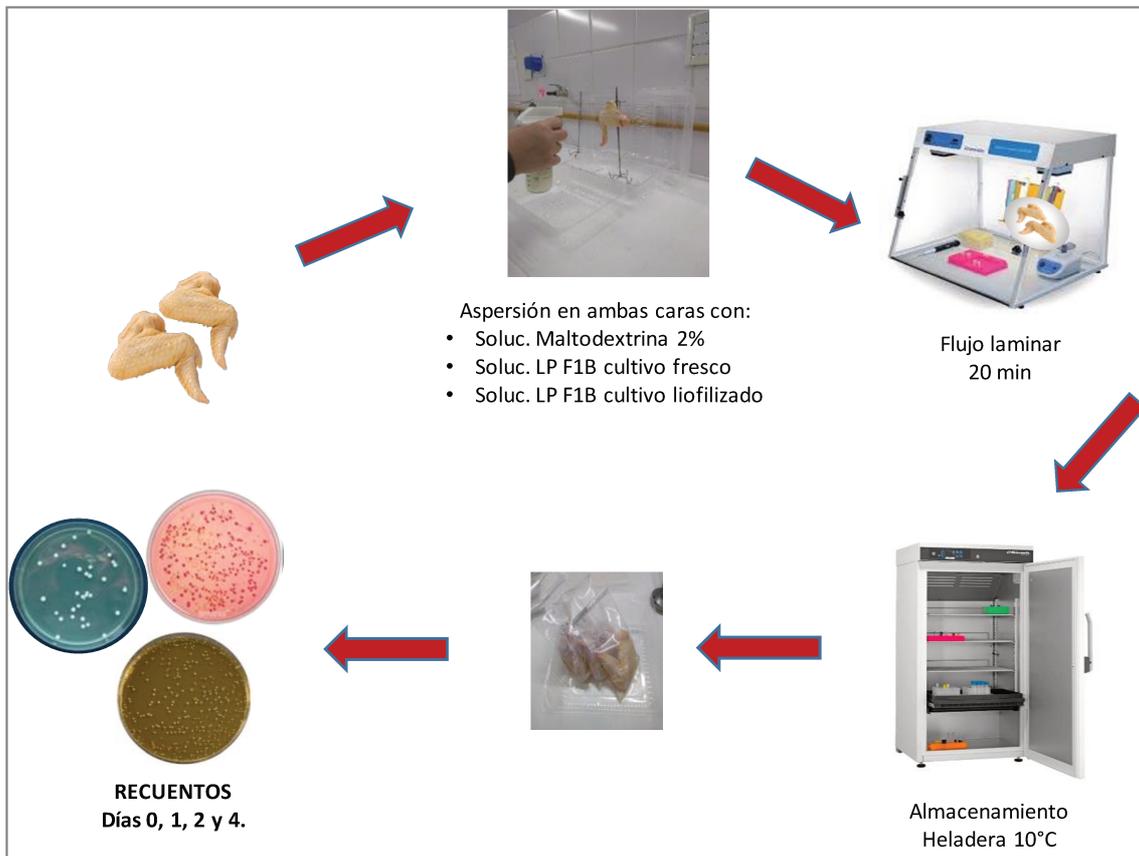


Figura 3.11. Ensayo *in situ* en pollo fresco, *L. plantarum* F1B vs. microbiota nativa.

3.8.3.2. Análisis microbiológico

Los días 0, 1, 2 y 4 de conservación a 10 °C se realizaron recuentos de los siguientes grupos microbianos: aerobios mesófilos totales (AMT; PCA, 30 °C, 48h), psicrótrofos totales (APT; PCA, 7 °C, 10d), Enterobacterias (EB; RVBG, 37 °C, 24h), *Pseudomonas* spp. (Pse; agar Cetrimide, 37 °C, 48h) y BAL (MRS, 37 °C, 48h). Para ello, cada alita de pollo se colocó en una bolsa de *stomacher* y se agregó un volumen de agua de peptona 0,1 % igual a su peso. Se realizaron las diluciones decimales correspondientes y se sembraron en profundidad (AMT, APT y EB) o superficie (Pse y BAL) según la metodología específica para cada grupo microbiano.

3.8.4. Ensayo de antagonismo de *L. plantarum* F1B como cultivo fresco o liofilizado frente a *S. Montevideo* ITA S5 en carne de pollo fresca

3.8.4.1. Preparación de la suspensión de inoculación de *S. Montevideo* ITA S5

Cultivos *overnight* de *S. Montevideo* ITA S5 se diluyeron en buffer PBS hasta una concentración aproximada de 8 log UFC/ml y así, al inocular con un pequeño volumen, lograr una concentración aproximada de 5 log UFC/g de pollo.

3.8.4.2. Diseño experimental

Treinta y dos alitas de pollo fresco (70 ± 6 g) fueron distribuidas aleatoriamente en 4 grupos de 8 unidades cada uno, al igual que en la sección 3.8.3. Sin embargo, en este ensayo todos los grupos fueron contaminados con *S. Montevideo* ITA S5 previo a la aspersión (o a su envasado en caso del grupo MP), por lo que fueron denominados:

MPS = alitas inoculadas con SM S5, sin tratamiento posterior;

CS = control: alitas inoculadas con SM S5 + aspersión c/solución de maltodextrina 2 %;

F1B CF/S = alitas inoculadas con SM S5 + aspersión c/suspensión LP F1B (9 log UFC/ml) en formato cultivo fresco;

F1B CL/S = alitas inoculadas con SM S5 + aspersión c/suspensión LP F1B (9 log UFC/ml) en formato cultivo liofilizado.

En primer lugar, las alitas de pollo se inocularon en una de sus caras con 150 μ l de la suspensión de *S. Montevideo* ITA S5, usando micropipeta y espátula de Digiralsky. Se dejaron reposar 20 min en flujo laminar para facilitar la adherencia y luego se

colgaron en una estructura de acero inoxidable. La aspersión se llevó a cabo con un dispositivo manual como se describió previamente, a una distancia de 15 cm y flujo de aspersión constante, sólo sobre la superficie previamente inoculada con SM S5 y con la suspensión correspondiente a cada grupo. Se dejaron reposar 20 min en flujo laminar para facilitar la adherencia y finalmente se colocaron en bandejas plásticas y almacenaron a 10°C en heladera (Fig. 3.12).

3.8.4.3. Análisis microbiológico

Se realizaron recuentos de *Salmonella* spp. (XLD, 37 °C, 24h) y BAL (MRS, 37 °C, 48h) los días 0, 1, 2 y 4 de conservación a 10 °C. Para ello, cada alita de pollo se colocó en una bolsa de *stomacher* y se agregó un volumen de agua de peptona 0,1 % igual a su peso. Se realizaron las diluciones decimales correspondientes y los recuentos con siembra en superficie.

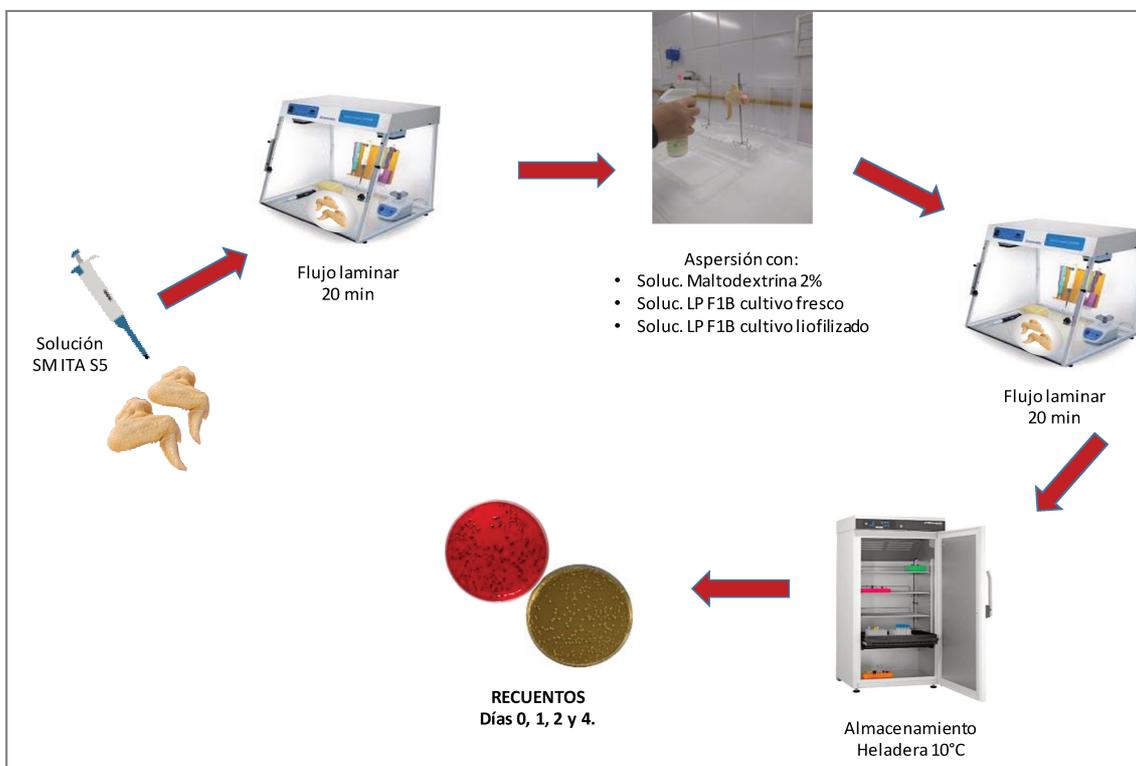


Figura 3.12. Ensayo *in situ* en pollo fresco, *L. plantarum* F1B vs. *S. Montevideo* S5.

3.8.5. Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de las variables de aspersión y optimizar la concentración de BAL en pollo, se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV 15.02.06 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, EE.UU.). Este programa permitió ajustar las ecuaciones polinomiales de 2° orden a los datos experimentales, graficar las superficies predichas a partir de los modelos y realizar la optimización en los rangos experimentales ensayados. Para analizar los recuentos de todos los microorganismos analizados (BAL, *Salmonella* spp. e indicadores) en pollo, se utilizó el software estadístico GraphPad Prism versión 5.00 para Windows. Se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey y el test t para distinguir diferencias en los recuentos de cada microorganismo. El nivel de significancia estadística se estableció en $p < 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Pruebas de antagonismo bacteriano

4.1.1. Ensayo de la doble capa de agar

La capacidad antagonista de *Lactiplantibacillus plantarum* F1B (LP F1B) y de *Lactiplantibacillus plantarum* 299v (LP 299v) frente a siete cepas indicadoras de *Salmonella* spp. se evaluó mediante el método de la doble capa de agar (Fig. 4.1). Para ambas BAL, el diámetro promedio de las colonias fue el mismo, alcanzando los $9,00 \pm 1,00$ mm.

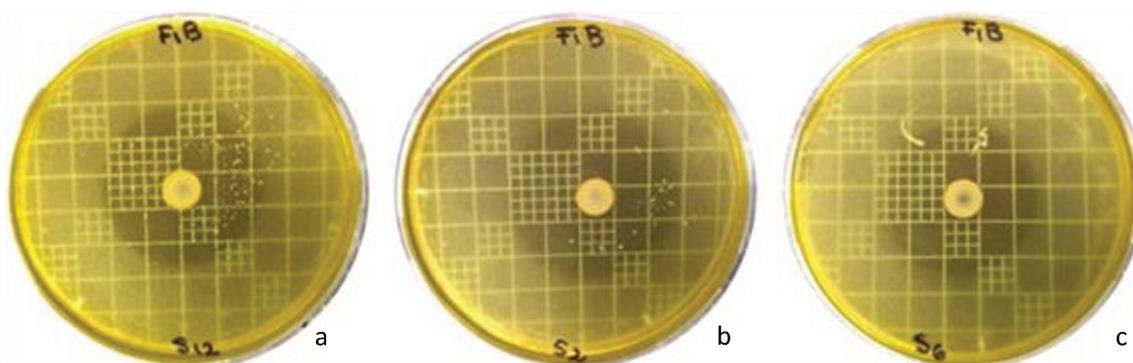


Figura 4.1. Prueba de antagonismo bacteriano (doble capa) de *L. plantarum* F1B frente a (a) *S. Newport* ITA S12, (b) *S. Glostrup* ITA S2 y (c) *S. Agona* ITA S6.

L. plantarum F1B y *L. plantarum* 299v inhibieron el desarrollo de todas las cepas indicadoras (Tabla 4.1.). En la comparación de la actividad inhibitoria de las dos BAL frente a la misma cepa indicadora, no se observaron diferencias significativas. Tampoco se detectaron diferencias en la sensibilidad de las 7 cepas indicadores frente a LP F1B, con un diámetro de inhibición promedio de $40,0 \pm 1,6$ mm. Cuando se evaluó la actividad antagonista de la cepa probiótica comercial LP 299v, sí se observaron diferencias entre cepas indicadoras, siendo las más inhibidas SG S2 y SB S13, y las menos inhibidas SM S5 y SN S12.

Tabla 4.1. Actividad antagonista de *L. plantarum* F1B y *L. plantarum* 299v frente a las cepas indicadoras utilizando el método de la doble capa de agar.

Cepas indicadoras	Diámetro de inhibición total (mm)*	
	<i>L. plantarum</i> F1B	<i>L. plantarum</i> 299v
SG S2	41,00 ± 1,41 ^{aA}	44,00 ± 1,73 ^{bA}
SM S5	40,00 ± 1,00 ^{aA}	38,50 ± 0,71 ^{aA}
SAG S6	37,50 ± 0,71 ^{aA}	41,50 ± 2,12 ^{abA}
SA S10	38,50 ± 2,12 ^{aA}	40,00 ± 1,41 ^{abA}
ST S11B	40,00 ± 0,00 ^{aA}	42,50 ± 0,71 ^{abA}
SN S12	42,00 ± 1,41 ^{aA}	38,50 ± 0,71 ^{aA}
SB S13	41,00 ± 2,00 ^{aA}	45,00 ± 0,00 ^{bA}

(*) Diámetros de inhibición (promedio ± SD en mm; n ≥ 4). En cada columna, letras minúsculas distintas indican diferencias significativas (ANOVA+Tukey; p<0,05) entre cepas indicadoras. En cada fila, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas (test t, p<0,05) entre BAL.

Otros autores han reportado la actividad antagonista de *L. plantarum* frente a *Salmonella* spp. utilizando esta metodología. Teles Santos y col. (2016) observaron la actividad inhibitoria de *L. plantarum* frente a *S. Typhimurium* ATCC 14028, sin detectar diferencias entre las 5 cepas de BAL evaluadas. En otro estudio, *L. plantarum* 998 fue capaz de inhibir SN S12 (Salsi, 2022). Sin embargo, el diámetro de inhibición (26,5 ± 2,7 mm) fue considerablemente menor a los observados para LP F1B y LP 299v frente a la misma cepa indicadora en esta tesis, indicando que el efecto antagonista es cepa dependiente. La metodología de la doble capa permite estudiar la actividad antagonista debido a sustancias inhibitorias capaces de difundir en el agar y actuar sobre las cepas indicadoras. Existen varios mecanismos que pueden explicar la actividad antimicrobiana de las BAL y de los lactobacilos en particular, como ser la producción de bacteriocinas, ácidos orgánicos (ácido láctico y otros ácidos de cadena corta) y otras

sustancias como peróxido de hidrógeno, etanol y dióxido de carbono, (Ibrahim y col., 2021; Wang y col., 2021). Estos compuestos pueden ejercer su acción a través de alteraciones bioquímicas en las diferentes estructuras de las bacterias indicadoras. En el caso de la mayoría de las bacteriocinas, el efecto bactericida se da por la inducción de la permeabilización y formación de poros en la membrana citoplasmática o por interacciones con enzimas esenciales. Cepas específicas de *L. plantarum* son capaces de producir una variedad de bacteriocinas, tales como plantaricinas y plantaciclinas (Parlindungan y col., 20221; Todorov, 2009), y esta característica ha sido utilizada en la bioconservación de carne de pavo (Cho y col., 2010). La producción de ácido es otro mecanismo que podría estar involucrado en la inhibición observada en el ensayo de la doble capa. *L. plantarum* es una especie heterofermentativa facultativa que fermenta los hidratos de carbono produciendo ácido láctico y etanol o ácido acético. El ácido orgánico disminuye el pH local y, por lo tanto, inhibe el crecimiento de las bacterias sensibles a las condiciones ácidas. El pH bajo hace que los ácidos orgánicos sean liposolubles, lo que les permite atravesar la membrana celular y llegar al citoplasma de los microorganismos objetivo (Dinev y col., 2017). Por último, la acción bactericida del peróxido de hidrógeno podría ser el resultado de la oxidación de los grupos sulfhidrilos que provoca la desnaturalización de una serie de enzimas, y de la peroxidación de los lípidos de membrana lo que provoca un aumento de la permeabilidad de la membrana. Además, puede ser un precursor para la producción de radicales libres bactericidas como el superóxido (O_2^-) e hidroxilo (OH^-) que pueden dañar el ADN.

4.1.2. Ensayo de difusión en agar con sobrenadantes libres de células

A continuación, se evaluó la capacidad antagonista de *Lactiplantibacillus plantarum* F1B (LP F1B) y de *Lactiplantibacillus plantarum* 299v (LP 299v) frente a

siete cepas indicadoras de salmonela utilizando los sobrenadantes libres de células (SLC) de ambos lactobacilos, a través de la prueba por difusión en agar (Figura 4.2).

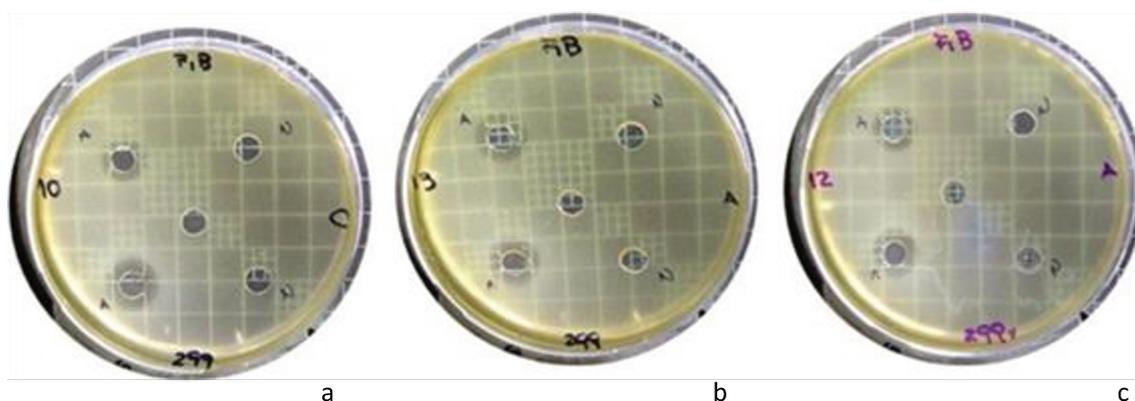


Figura 4.2. Ensayo de difusión en agar con SLC con pH neutralizado (N) y sin neutralizar (A) de las cepas de *L. plantarum* F1B y *L. plantarum* 299v frente a (a) *S. Anatum* ITA S10, (b) *S. Bredeney* ITA S13 y (c) *S. Newport* ITA S12.

Los SLC sin neutralizar (ácidos, SLC-A) de ambas BAL ($\text{pH} = 3,9 \pm 0,1$) inhibieron el crecimiento de todas las cepas indicadoras. Se observó inhibición total y parcial (menor densidad del césped formado por la cepa indicadora) de todas las cepas indicadoras con ambas BAL, excepto *S. Typhimurium* (ST S11B) que no presentó inhibición total con *L. plantarum* F1B (Tabla 4.2). Los halos de inhibición total de las cepas indicadoras promediaron los 8,8 y 9,1 mm y los de inhibición parcial los 12,3 y 12,8 mm para *L. plantarum* F1B y *L. plantarum* 299v, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre los halos de inhibición total de las distintas cepas indicadoras producidos por LP F1B (al igual que se observó en la metodología de la doble capa), pero sí hubo diferencias entre los halos totales producidos por los SLC-A de LP 299v. La mayor inhibición total se observó para SA S10 y los menores correspondieron a SG S2, SAG S6 y SB S13.

Tabla 4.2 Actividad antagonista de los SLC-A de *L. plantarum* F1B y *L. plantarum* 299v frente a las bacterias indicadoras utilizando el método de difusión en agar (diámetro de los pozos: 6 mm).

Cepas indicadoras	Halo de Inhibición (mm) *			
	<i>L. plantarum</i> F1B		<i>L. plantarum</i> 299v	
	D. inh total	D. inh parcial	D. inh total	D. inh parcial
SG S2	8,83±0,29 ^{aA}	12,95±0,69 ^{abA}	8,65±0,58 ^{aA}	12,63±0,29 ^{abA}
SM S5	9,35±1,29 ^{aA}	13,13±0,84 ^{bA}	8,95±1,41 ^{abA}	12,48±0,75 ^{abA}
SAG S6	8,69±0,52 ^{aA}	12,33±0,72 ^{abA}	8,73±0,27 ^{aA}	12,58±0,65 ^{abA}
SA S10	8,25±0,43 ^{aA}	12,17±0,80 ^{abA}	10,25±0,66 ^{bB}	13,67±0,14 ^{bB}
ST S11B	N.D.	11,17±0,29 ^{aA}	9,75±0,25 ^{ab}	13,17±0,38 ^{abB}
SN S12	8,90±0,35 ^{aA}	12,22±0,94 ^{abA}	8,90±0,72 ^{abA}	12,27±0,38 ^{aA}
SB S13	8,65±0,33 ^{aA}	11,97±0,89 ^{abA}	8,70±0,33 ^{aA}	12,80±0,75 ^{abA}

(*) Diámetros de inhibición (promedio ± SD en mm; n ≥ 3). En cada columna, letras minúsculas distintas indican diferencias significativas (ANOVA+Tukey; p<0,05) entre cepas indicadoras. En cada fila, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre BAL (test t, p<0,05) para un mismo tipo de inhibición. N.D.: Inhibición no detectada.

Respecto a la presencia de inhibición parcial, LP F1B produjo diferentes halos entre las cepas indicadoras, siendo la más inhibida SM S5 y la menos inhibida ST S11B. También hubo diferencias entre las inhibiciones parciales producidas por LP 299v, siendo SN S12 y SA S10 las que presentaron la menor y mayor inhibición respectivamente. Al comparar la acción antagonista de las dos BAL sólo se observaron diferencias significativas para *S. Anatum* ITA (SA S10) y *S. Typhimurium* ITA S11B, siendo *L. plantarum* 299v quien indujo mayor inhibición. Finalmente, respecto a la

actividad de los SLC neutralizados (SLC-N; pH = 6,5±0,2), no se observó actividad antagonista en ningún caso. Esto señalaría que la actividad inhibitoria se debió principalmente a la presencia de compuestos ácidos producidos por las BAL. Se ha comprobado que el ácido láctico actúa como un permeabilizador de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, aumentando así su susceptibilidad a los antimicrobianos, incluidas las bacteriocinas (Alakomi y col., 2000). Salsi (2022) evaluó la capacidad antagonista de *L. plantarum* 998 frente a SN S12, usando la misma metodología y observó inhibición total sólo cuando usó los SLC sin neutralizar, aunque con un diámetro de inhibición levemente mayor (10,5 ± 0,9 mm). Ayala y col. (2019) estudiaron el antagonismo entre el SLC de 44 cepas de BAL (aisladas de heces de ganado y diferentes alimentos) y *Salmonella* Montevideo y observaron que no hubo inhibición de esta cepa por ninguna de las BAL ensayadas. Otros autores (Arena y col., 2016; Arrijoja-Breton y col., 2020; Chen y col., 2022; Zhang y col., 2020) encontraron que un gran número de cepas de BAL (entre ellas *L. plantarum*), aisladas de distintas fuentes o procesos alimentarios, inhibieron el crecimiento de bacterias productoras de ETA en las pruebas de difusión en agar con SLC ácidos, pero no observaron dicha inhibición cuando se utilizaron los SLC neutralizados. Esto podría indicar la ausencia de un efecto antibacteriano debido a la presencia de compuestos no ácidos, como las bacteriocinas. Sin embargo, cabe destacar que esto no implica necesariamente que las cepas analizadas sean incapaces de producirlas, sino que las bacterias indicadoras ensayadas no son sensibles a ellas o que las bacteriocinas no se produjeron bajo las condiciones del ensayo (Samanje y Kilic, 2020). Es generalmente aceptado que las BAL producen bacteriocinas que ejercen su acción inhibitoria sobre bacterias íntimamente relacionadas u otras Gram positivas como *Listeria*, dependiendo principalmente su sensibilidad a diferencias en la composición y fluidez de su membrana celular (Lücke,

2000). Por el contrario, se ha establecido que en general las bacterias Gram negativas son intrínsecamente resistentes debido a la presencia de la membrana externa, que constituye una barrera física para el paso y unión de las bacteriocinas producidas por BAL (Pehrson y col., 2015).

En general podría decirse que existió concordancia entre los resultados del método de la doble capa y el de difusión en agar para todas las cepas indicadoras con las dos BAL, excepto en el caso de *S. Typhimurium* S11B que en el método de difusión en agar no presentó un halo de inhibición total con LP F1B que sí se observó en el método de la doble capa. Para explicar este fenómeno podemos decir que en los dos casos existe una exposición a los compuestos ácidos producidos por las BAL, pero en el caso del método de la doble capa, dichos compuestos podrían estar en mayor concentración en el entorno y en la colonia de LP F1B, como para producir un halo de inhibición total de ST S11B. Otro factor que podría explicar esta diferencia en la magnitud de la actividad inhibitoria podría ser que para el método de la doble capa se utilizó una concentración de las cepas indicadoras un orden menor que para el método de difusión.

Los resultados hasta aquí obtenidos confirman la actividad antagonista de las BAL en estudio frente a los serotipos de *Salmonella* spp. aislados del ambiente aviar y fortalece la decisión de estudiar su aplicación como cultivos protectores. Además, ponen de manifiesto que si bien muchas características funcionales son comunes dentro de un mismo género o especie, la capacidad antagonista de las BAL es cepa-dependiente.

4.2. Estudio de las propiedades superficiales de BAL y bacterias indicadoras

4.2.1. Ensayo de autoagregación

La autoagregación es la capacidad que presenta una célula bacteriana de interaccionar con otras bacterias de la misma población formando grumos visibles macroscópicamente que sedimentan clarificando el medio. Esta capacidad se ha relacionado con la formación de BP ya que, en este modo de crecimiento, las bacterias se desarrollan adheridas a una superficie, viva o inerte, y está mediado por la presencia de sustancias poliméricas extracelulares (Rinaudi y col., 2010). Cuando se analizó para las cepas indicadoras, los resultados mostraron que 6 de las 7 cepas de salmonela estudiadas presentaron porcentajes de autoagregación iguales o por encima de 7 % a las 2 horas, excepto SG S2 que fue la cepa indicadora menos autoagregante y mostró valores por debajo de 4 % (Tabla 4.3). A las 4 h se observó un comportamiento similar, nuevamente SG S2 fue la cepa menos autoagregante, aunque en este punto no mostró diferencias significativas con SAG S6, SA S10 y SB S13. Finalmente, luego de 24 h de incubación, se obtuvieron porcentajes de autoagregación considerablemente mayores para todas las cepas indicadoras ensayadas, que variaron entre 23,50 y 45,89 %, siendo el comportamiento cepa-dependiente. Las cepas ST S11B, SN S12 y SB S13 mostraron los mayores valores de autoagregación, siendo ST S11B la más autoagregante a las 24 h.

Tabla 4.3. Porcentajes de autoagregación de bacterias indicadoras y BAL medidos a distintos tiempos.

Cepas	AUTOAGREGACIÓN *		
	(%)		
	2 h	4 h	24 h
SG S2	3,79±1,06 ^{aA}	7,87±1,12 ^{aB}	29,63±1,44 ^{abC}
SM S5	11,79±0,75 ^{eA}	15,56±1,04 ^{eB}	27,41±1,87 ^{abC}
SAG S6	9,95±0,42 ^{dA}	9,95±0,73 ^{abA}	24,36±0,96 ^{aB}
SA S10	6,98±0,74 ^{bcdA}	9,20±0,40 ^{abA}	23,50±2,41 ^{aB}
ST S11B	9,19±0,65 ^{deA}	13,93±1,59 ^{deA}	45,89±6,91 ^{cB}
SN S12	9,69±2,20 ^{deA}	11,53±0,21 ^{bcdAB}	38,36±12,82 ^{abcC}
SB S13	8,81±0,12 ^{bcdA}	10,38±0,34 ^{abB}	37,49±0,65 ^{abcC}
LP F1B	14,02±1,51 ^{aA}	23,53±2,30 ^{aB}	61,30±2,72 ^{aC}
LP 299v	14,15±2,54 ^{aA}	21,44±0,07 ^{aB}	58,79±2,92 ^{aC}

(*) Porcentajes de autoagregación (promedio ± SD en mm; n = 3). En cada columna, letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre cepas de la misma especie. En cada fila, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre los distintos tiempos para una misma cepa. ANOVA+Tukey; p<0,05.

En cuanto al comportamiento de cada cepa indicadora a través del tiempo, podemos dividir las en dos grupos: las cepas SG S2, SM S5 y SB S13 mostraron un aumento significativo de los porcentajes de autoagregación a las 2, 4 y 24 h de incubación, mientras que las cepas SAG S6, SA S10, ST S11B y SN S12 mostraron valores similares de los porcentajes a las 2 y 4 h para luego sí observarse un aumento significativo a las 24 h (Fig. 4.3).

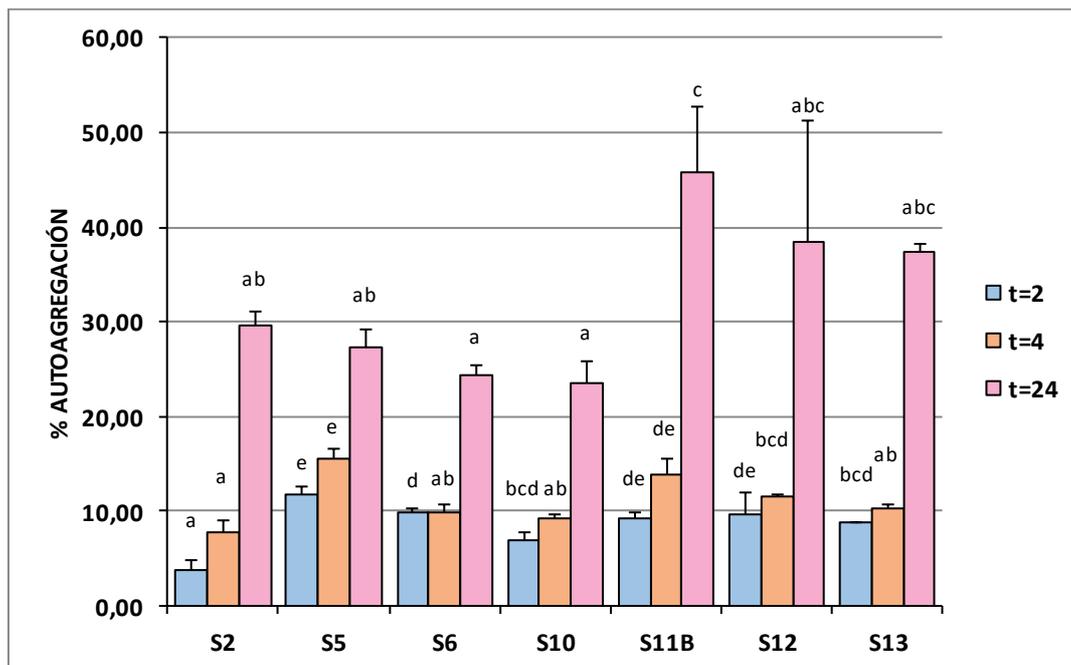


Figura 4.3. Autoagregación de *Salmonella* spp. medida a 2, 4 y 24 h. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las cepas indicadoras a un mismo tiempo ($p < 0,05$).

Otros investigadores han analizado la autoagregación de *Salmonella* spp. encontrando una variabilidad considerable entre cepas. Beshiru y col. (2018) estudiaron la autoagregación de 12 cepas de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y otras serovariedades. Encontraron que el porcentaje de autoagregación de estas cepas a las 24 h fue entre 15 y 47 %. Merino y col. (2019) obtuvieron a las 20 h valores de autoagregación que oscilaron entre 15 y 54 % para 13 diferentes cepas de salmonela. Por otro lado, Wang y col. (2013) determinaron el porcentaje de autoagregación de *Salmonella enterica* serovariedades Heidelberg, Derby, Agona, Indiana, Infantis y Typhimurium encontrando una alta variabilidad entre ellas, obteniendo valores desde 5 % hasta 80 % de autoagregación. Esta dispersión puede ser resultado de variaciones específicas de la superficie celular entre serotipos, en particular diferentes proteínas de superficie, que han sido consideradas mediadoras en el proceso de agregación y pueden conferir ventajas para la supervivencia en el ambiente (Poimenidou y col., 2009). Se ha

demostrado que tanto componentes extracelulares como superficiales de las bacterias, tales como exopolisacáridos, lipopolisacáridos, flagelos, y moléculas señales del *quorum sensing* y del ambiente, están involucrados en los fenómenos de autoagregación y formación de BP (Nocelli y col., 2016). La complejidad fisiológica y estructural de las BP ha revelado que estos grupos de bacterias tienen un desarrollo cooperativo y altamente coordinado, mediante la co-expresión de celulosa y fimbrias curli las cuales están involucradas en fenómenos de agregación bacteriana y adhesión a superficies (Anriany y col., 2006; Jonas y col., 2007). Salmonela produce estructuras en la superficie celular, como carbohidratos y proteínas, que están involucradas en la autoagregación bacteriana. Estas estructuras pueden dar lugar a comunidades bacterianas que, dependiendo de las condiciones ambientales, pueden formar BP (Knowles y col., 2005).

En cuanto a la autoagregación de las BAL, LP F1B y LP 299v mostraron valores similares entre sí (Fig. 4.4), obteniéndose valores de $61,30 \pm 2,72 \%$ y $58,79 \pm 2,92 \%$ respectivamente a las 24 h de incubación. Cada una de ellas mostró el mismo comportamiento a través del tiempo: un aumento significativo del porcentaje de autoagregación entre cada una de las mediciones (Tabla 4.3.). De acuerdo a la clasificación descrita por Merino y col. (2019), en función de su capacidad para autoagregar, ambas BAL pueden considerarse altamente autoagregantes ($\%A > 50$).

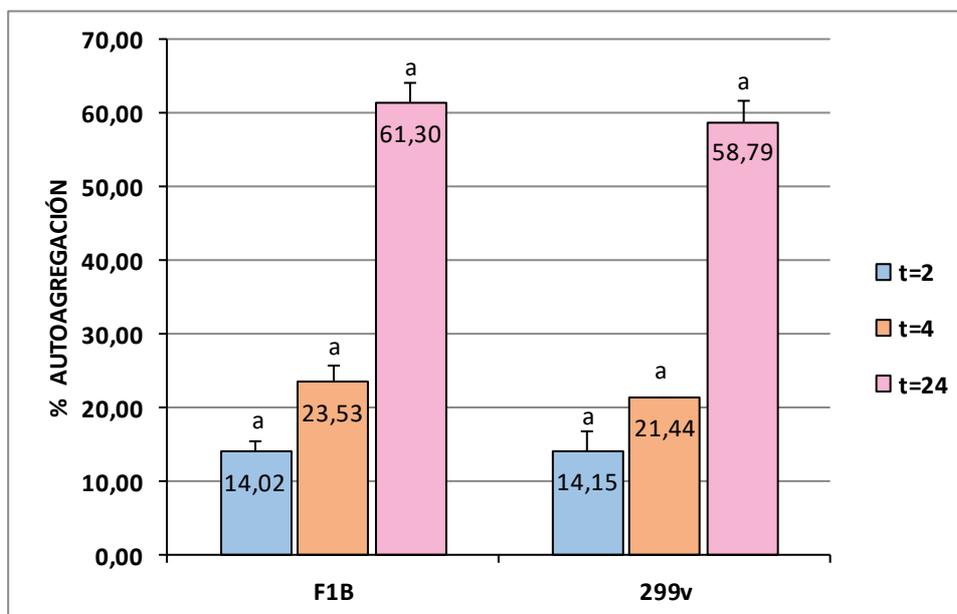


Figura 4.4. Autoagregación de BAL medida a 2 h, 4 h y 24 h. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las cepas de BAL a un mismo tiempo ($p < 0,05$).

Cabe destacar que las BAL estudiadas en este ensayo obtuvieron, en promedio, mayores porcentajes de autoagregación que las cepas de salmonela. Esto mismo observaron Collado y col. (2008) cuando estudiaron la capacidad de autoagregar de una cepa de *L. plantarum* y una de *Salmonella* Typhimurium entre otras cepas probióticas y patógenas. Sin embargo, Merino y col. (2019) analizaron la autoagregación (20 h) de 7 cepas de BAL y obtuvieron resultados variables. De las dos cepas de *L. plantarum* analizadas, una resultó moderadamente autoagregante ($50 > \%A > 20$) mientras que la otra no superó el 5 % de autoagregación ($\%A < 20$) resultando no autoagregante. Además, se observó que las cepas de *L. plantarum* que producen EPS presentaron baja autoagregación, lo que podría indicar que no hay una relación entre la producción de EPS y la capacidad de interacción entre las bacterias. Por otro lado, Li y col. (2015) estudiaron 18 cepas de BAL de diferentes especies y también encontraron que la capacidad autoagregativa es cepa-dependiente y debe estudiarse en cada caso. La habilidad de las cepas de BAL para autoagregar dependería de estructuras de superficie

tales como proteínas de adhesión, de la hidrofobicidad superficial (Leccese Terraf y col., 2014) y la presencia de polisacáridos extracelulares (Kos y col., 2003; Walter y col., 2008).

4.2.2. Ensayo de hidrofobicidad

Los resultados de hidrofobicidad obtenidos para las cepas de *Salmonella* spp. y BAL se muestran en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Hidrofobicidad superficial de cepas de salmonela y BAL a 37 °C.

Cepas	HIDROFOBICIDAD (%) *
SG S2	60,49±0,65 ^{bcd}
SM S5	53,19±4,00 ^{ab}
SAG S6	46,90±1,32 ^a
SA S10	56,71±3,98 ^{bc}
ST S11B	55,33±2,64 ^{bc}
SN S12	61,05±2,89 ^{cd}
SB S13	71,16±0,81 ^e
LP F1B	21,16±1,44 ^a
LP 299v	47,03±0,37 ^b

(*) Hidrofobicidad (%), promedio ± SD, n=3). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cepas de la misma especie.

Todas las cepas indicadoras mostraron porcentajes relativamente elevados de hidrofobicidad, siendo *S. Bredeney* ITA S13 (71,16 ± 0,81 %) y *S. Agona* ITA S6 (46,90 ± 1,32 %) las que presentaron mayor y menor hidrofobicidad. Según la clasificación hecha por Di Bonaventura y col. (2008), las cepas se pueden clasificar según su hidrofobicidad en altamente hidrofóbicas (≥ 50 %), moderadas (de 20 a 50 %) e hidrofílicas (≤ 20 %). Como se observa en la Tabla 4.4., la mayoría de las cepas de

salmonela clasificaron como altamente hidrofóbicas, mientras que sólo SAG S6 clasificó como moderadamente hidrofóbica (Figura 4.5).

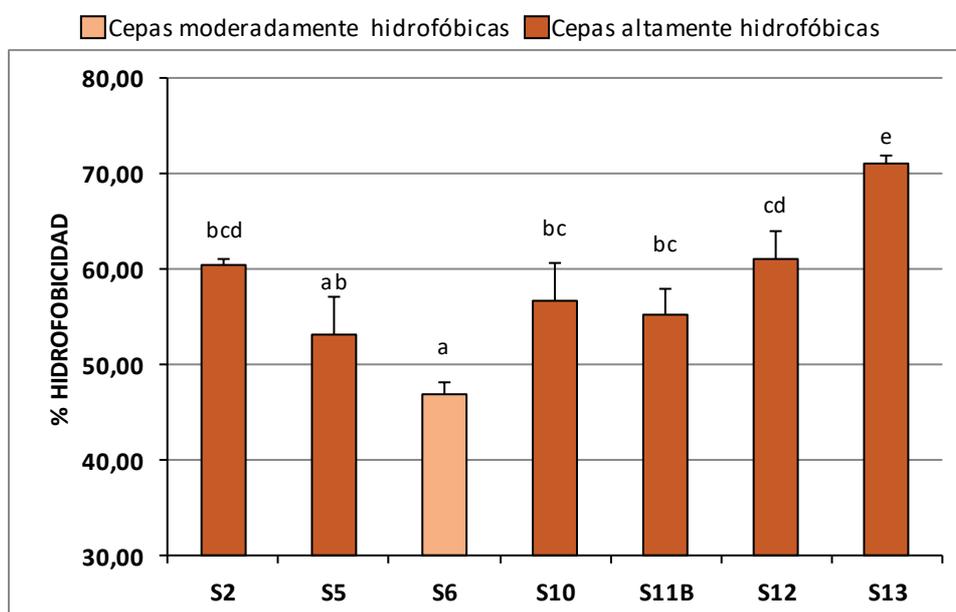


Figura 4.5. Hidrofobicidad (% , promedio \pm SD, n=3) de *Salmonella* spp. a 37 °C. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto a las BAL, LP 299v obtuvo un porcentaje de hidrofobicidad ($47,03 \pm 0,37$ %) significativamente mayor que LP F1B ($21,16 \pm 1,44$ %). Ninguna de las cepas de BAL superó el 50 % de hidrofobicidad, por lo que LP F1B Y LP 299v fueron categorizadas como moderadamente hidrofóbicas (Figura 4.6). Además, las BAL estudiadas obtuvieron, en promedio, porcentajes menores de hidrofobicidad que las cepas de salmonela.

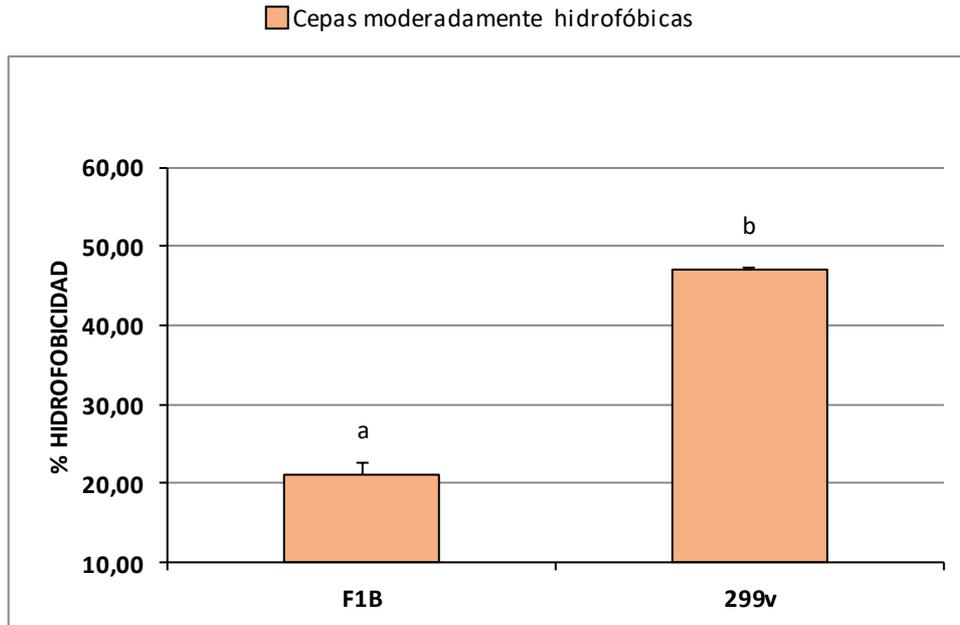


Figura 4.6. Hidrofobicidad superficial (% , promedio \pm SD, n=3) de BAL a 37 °C. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Woo y Ahn (2013) observaron que la hidrofobicidad de una cepa *S. Typhimurium* obtuvo un valor de 55,3 %, similar a la obtenida en esta Tesis, mientras que, en comparación con las bacterias patógenas, observaron afinidades relativamente bajas al xileno en las cepas de BAL estudiadas. En contraposición, Collado y col. (2008) obtuvieron valores de hidrofobicidad más altos para una cepa de *L. plantarum* en comparación con la de *Salmonella Typhimurium*. Merino y col. (2019) refirieron valores de hidrofobicidad muy variables para las cepas de *Salmonella Enteritidis* y *Typhimurium* estudiadas, con valores que oscilaron entre 1,2 y 44,3 %. Para explicar en cierta medida esta situación, expresan que debe tenerse en cuenta que el método empleado está afectado por varios factores tales como el tipo de hidrocarburo utilizado, la viscosidad del mismo o el tamaño de las gotas formados durante el mezclado (Dillon y col., 1986). Otros factores como los procedimientos de manipulación de los cultivos también pueden afectar la superficie celular (Pembrey y col., 1999). Algunos estudios

sobre la química de la superficie de las células microbianas han demostrado que la presencia de material proteínico en la superficie celular se traduce en una mayor hidrofobicidad, mientras que las superficies hidrófilas se asocian con la presencia de polisacáridos (Collado y col., 2008).

4.2.3. Relación entre la autoagregación y la hidrofobicidad

Cuando se evaluó la posible relación entre la autoagregación e hidrofobicidad de las cepas (sin distinguir entre BAL e indicadoras), se observó una correlación negativa significativa entre la hidrofobicidad de las cepas en estudio y la autoagregación a 2 y 4 h de incubación (correlación de Pearson: $r = -0,7276 / p=0,0263$ y $r = -0,8042 / p=0,0090$ para 2 h y 4 h de AA respectivamente; Fig. 4.7.). Es decir, las cepas más autoagregantes fueron menos hidrófobas. Para 24 h de autoagregación no fue posible establecer una correlación con hidrofobicidad.

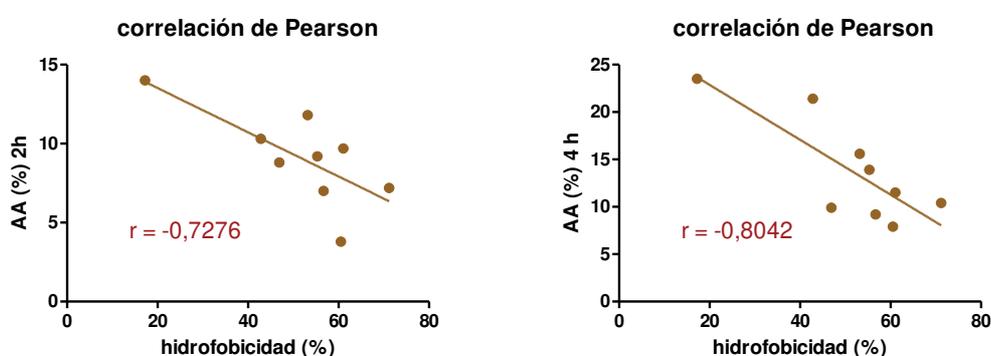


Figura 4.7. Correlación de Pearson entre hidrofobicidad superficial (%) y autoagregación (%) de cepas de BAL e indicadoras.

Collado y col. (2008) estudiaron la relación entre las propiedades superficiales de bacterias patógenas y probióticas en cuanto a su capacidad de autoagregar y la hidrofobicidad superficial por partición en xileno. No observaron una correlación entre

estas propiedades para las cepas patógenas, entre ellas *Salmonella* Typhimurium, mientras que si se demostró una correlación positiva para las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Por el contrario, Merino y col. (2019) pudieron dividir en dos grupos las cepas de salmonela estudiadas, según la relación entre porcentaje de hidrofobicidad y autoagregación. Las cepas que resultaron con moderada hidrofobicidad mostraron una buena correlación con la autoagregación, pero no se observó esto para las cepas hidrofílicas. Las cepas que tienen una hidrofobicidad moderada presentaron valores de autoagregación entre el 28 % y el 34 %, mientras que las cepas hidrofílicas presentaron un rango de autoagregación entre 16 % y 54 %.

4.3. Determinación de la capacidad de las BAL y de bacterias indicadoras de formar biopelícula

4.3.1. Formación de biopelícula en placa de poliestireno. Cuantificación por tinción con cristal violeta

La formación de BP de bacterias es muy variable y depende de muchos factores inherentes al microorganismo, al ambiente y a la superficie donde pueda adherirse. El riesgo que trae aparejado su formación sobre superficies en contacto con alimentos ha impulsado el estudio de la capacidad de formar BP en condiciones que simulen los ambientes de las industrias alimenticias. En este ensayo se determinó la capacidad de formación de BP de las cepas de BAL y de salmonela utilizando la técnica de tinción por cristal violeta bajo diferentes condiciones (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Capacidad de formación de BP de BAL y salmonela en diferentes condiciones de crecimiento.

Cepas	TS		MRS		PBS	
	37 °C	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C	4 °C
SG S2	+++	-	-	-	++	-
SM S5	+	-	-	-	+	-
SAG S6	++	-	-	-	+	-
SA S10	++	-	-	-	+	-
ST S11B	++	-	-	-	-	-
SN S12	++	-	-	-	++	-
SB S13	++	-	-	-	++	+
LP F1B	-	-	-	-	-	-
LP 299v	+	+	+	+	-	+

Los valores se expresaron como: (-) no forma, (+) débil formadora, (++) moderada formadora, (+++) fuerte formadora.

Para los serotipos de salmonela estudiados se observó un marcado efecto de la composición del medio de cultivo y la temperatura de incubación sobre la formación de biopelícula. A 37 °C, todas las cepas formaron BP en TS: una fuerte (*S. Glostrup* ITA S2), 5 moderadas y una débil formadora (*S. Montevideo* ITA S5), mientras que en MRS no se observó formación de BP para ninguno de los serotipos. En PBS, la mayoría de las cepas indicadoras formaron BP moderada o débilmente (excepto *S. Typhimurium* S11B), algunos serotipos disminuyeron su capacidad de formación de BP respecto a lo observado en TS y otros la mantuvieron. Analizando el comportamiento a 4 °C, en los medios de cultivo TS y MRS ninguna de las cepas formó BP mientras que en PBS solo SB S13 lo hizo débilmente. Otros autores han observado distintas capacidades de *Salmonella* spp. de formar BP según las condiciones experimentales propuestas. Castelijm y col. (2012) estudiaron la formación de BP de 51 cepas de *Salmonella* spp. encontrando cepas formadoras en un medio rico en nutrientes, cepas que sólo formaron

BP en medio diluido y otras que no formaron en ningún medio y lo relacionaron con una inducción de características específicas que están ausentes o no inducidas en las cepas no formadoras. Paytubi y col. (2017) observaron que cuando salmonela crece en un medio mínimo cambia la formación de BP a través de un aumento de la producción de los componentes de la matriz extracelular, sugiriendo que las condiciones fisiológicas y, por lo tanto, las condiciones ambientales, definen el tipo de BP que forma *Salmonella* spp. La formación y adherencia de la BP no ocurre por el mismo mecanismo en los diferentes medios. Las cepas utilizan diferentes estrategias y expresan diferentes genes promotores de BP en función de los recursos ambientales disponibles. Las estructuras superficiales, es decir, proteínas y otras moléculas con propiedades adhesivas, así como factores que simplemente contribuyen a la hidrofobicidad de la superficie celular, podrían expresarse de manera muy diferente según el medio de crecimiento influyendo en las propiedades de adherencia de la cepa (Hancock y col., 2011). La influencia de los serotipos en la capacidad de producción de BP por parte de las cepas de salmonela aún no se ha dilucidado, y pocos estudios han comparado sus diferencias. Las características específicas de cada serovar podrían aumentar o disminuir su capacidad para producir biofilm (Wang y col., 2013).

También se observaron diferencias en la capacidad de salmonela de formar BP según la temperatura de incubación. A 37 °C todas las cepas formaron BP, pero cuando se incubaron a 4 °C no hubo formación. En 2003, Stepanović y col. ensayaron a diferentes temperaturas la formación de BP de 30 cepas de *Salmonella* spp. (29 cepas de *Salmonella* Enteritidis y 1 cepa de *Salmonella* Typhimurium) que fueron aisladas de humanos, animales y alimentos. La cantidad de BP formada a 30 °C después de 24 h de incubación fue estadísticamente mayor que las formadas a 22 °C y 37 °C. Concluyeron que la temperatura tiene una influencia marcada sobre la expresión de adhesinas

superficiales y, por lo tanto, sobre la formación de BP. Una disminución de la temperatura de incubación puede reducir el crecimiento bacteriano, pero también puede favorecer la producción de BP porque las cepas son capaces de expresar componentes que no se producirían en otras condiciones. Merino y col. (2019) obtuvieron resultados similares cuando ensayaron 16 cepas de *Salmonella* spp., la cantidad de BP formada a 28 °C después de 24 h de incubación fue estadísticamente mayor que las formadas a 20 °C y 37 °C. Pocos autores han estudiado la formación de BP de *Salmonella* spp. a temperatura de refrigeración. Borges y col. (2018) estudiaron la capacidad de formación de BP de un gran número de cepas de salmonela (incluidas varias cepas de *S. Typhimurium*, *S. Anatum*, *S. Bredeney* y *S. Agona*) en caldo TS a distintas temperaturas, encontraron que el 71,6 % de las cepas produjeron BP a 37 °C, mientras que sólo el 52,3 % formó BP a 12 °C y el 39,5 % a 3 °C, independientemente del serotipo. Si bien el porcentaje de cepas de salmonela que formaron BP disminuyó al disminuir la temperatura, resultó alarmante el alto porcentaje de cepas que formaron BP a 12 °C y 3 °C siendo estas la temperatura máxima recomendada para las salas de trozado en la industria frigorífica y la temperatura ideal de las heladeras hogareñas respectivamente. Cáceres y col. (2019) estudiaron la formación de BP de cepas de *E. coli* productoras de toxina shiga y encontraron que la variable temperatura afectó de manera contundente su formación, ya que, a temperaturas de refrigeración (4 °C) las cepas no desarrollaron BP, e inclusive su crecimiento fue menor y en forma planctónica. La temperatura de refrigeración si bien permitió la viabilidad de la bacteria, no favoreció el desarrollo de BP. En concordancia con nuestros resultados, estos hallazgos sugieren que, al igual que el metabolismo planctónico, la variable temperatura influye sobre el desarrollo de BP, ya que en las cepas de salmonela ensayadas se vio favorecido

por temperaturas cercanas a las encontradas en su entorno natural (huésped animal o humano) y no así por temperaturas más bajas que constituirían una situación de estrés.

Respecto a la capacidad de las BAL de formar BP, en caldo TS *L. plantarum* 299v no modificó su capacidad de formar BP al variar la temperatura y calificó como débil formadora en ambos casos. El mismo comportamiento se observó cuando se cultivó en caldo MRS, un medio más complejo especialmente formulado para el crecimiento de bacterias ácido lácticas. En PBS tuvo un comportamiento diferente, formó BP débilmente a 4 °C, pero no se observó cuando se incubó a 37 °C. *L. plantarum* F1B no formó BP en ninguna de las condiciones ensayadas, pero esto no significa que no pueda hacerlo sobre otra superficie, tanto abiótica como biótica, ya que algunas superficies son más propicias que otras para la adherencia microbiana. Ruiz y col. (2019) encontraron que 8 cepas de BAL cultivadas en MRS a temperatura ambiente resultaron altamente formadoras de BP, mientras que aquellas mantenidas a temperatura de refrigeración se consideran débilmente formadoras. Concluyeron que, el desarrollo a bajas temperaturas reduce el metabolismo y por lo tanto la formación de BP ya que todas las reacciones biológicas fundamentales dependen de la temperatura. De manera similar, Cisneros y col. (2019) observaron que diez cepas de *L. plantarum* formaron BP más fuertes cuando se cultivaron a 30 °C que cuando lo hicieron a 10 °C. Sin embargo, Emanuel y col. (2010) y Pérez-Ibarreche y col. (2016) han informado previamente que la capacidad de las BAL para formar BP aumentaba a baja temperatura. Esto indicaría que la formación de BP y sus condiciones óptimas dependen de la cepa en estudio. Merino y col. (2019) ensayaron la formación de BP de 7 cepas de BAL a 30 °C y concluyeron que 6 de ellas fueron fuertes o moderadas formadoras de BP cuando crecieron en MRS, mientras que en el medio BHI las cepas fueron débiles o no

formadoras. Encontraron que la capacidad de formar BP de las cepas de BAL se modificó según el caldo en el que fueron incubadas.

4.4. Determinación de la capacidad de las BAL de reducir biopelículas de bacterias indicadoras

En base a los resultados obtenidos en los ensayos de la sección 4.3. se seleccionaron las cepas indicadoras *S. Glostrup* ITA S2 (fuerte formadora de BP) y *S. Montevideo* ITA S5 (débil formadora de BP) para evaluar la capacidad de *L. plantarum* F1B y *L. plantarum* 299v de reducir o inhibir la formación de BP de salmonela. Se analizaron los mecanismos de interacción entre cepas BAL e indicadoras mediante tests *in vitro* de formación de BP. La capacidad reductora o inhibitoria de las BAL fue evaluada mediante dos ensayos: competencia y desplazamiento.

4.4.1. Competencia

Se evaluó si las BAL ejercieron un efecto sobre el desarrollo de las BP de salmonela al cultivarlas en simultáneo en caldo TS. Luego del ensayo se examinó la formación de BP de ambos microorganismos por recuento en placa y los resultados se expresaron en log UFC/cm². Debido a que la formación de BP por parte de las cepas de salmonela es una condición necesaria para poder realizar este estudio, la elección del medio de cultivo se basó en el ensayo de formación de BP (sección 4.3). Allí se observó que, de los dos medios de cultivo utilizados, las bacterias indicadoras formaron BP en caldo TS y no en MRS. Además, en un ensayo de competencia preliminar se comparó el comportamiento de ambas cepas de salmonela en TS, MRS y una mezcla de ambos medios de cultivo (resultados no mostrados) y la mayor formación de BP se observó en caldo TS.

La formación de BP de *S. Glostrup* ITA S2 se redujo significativamente ($p=0,0014$; test t) cuando esta cepa se coincubó con *L. plantarum* 299v mientras que cuando se coincubó con *L. plantarum* F1B no se observó una reducción significativa, pero sí una tendencia ($p=0,0620$; test t). Los valores en los dos cocultivos no presentaron diferencias significativas entre sí (test t) (Fig. 4.8).

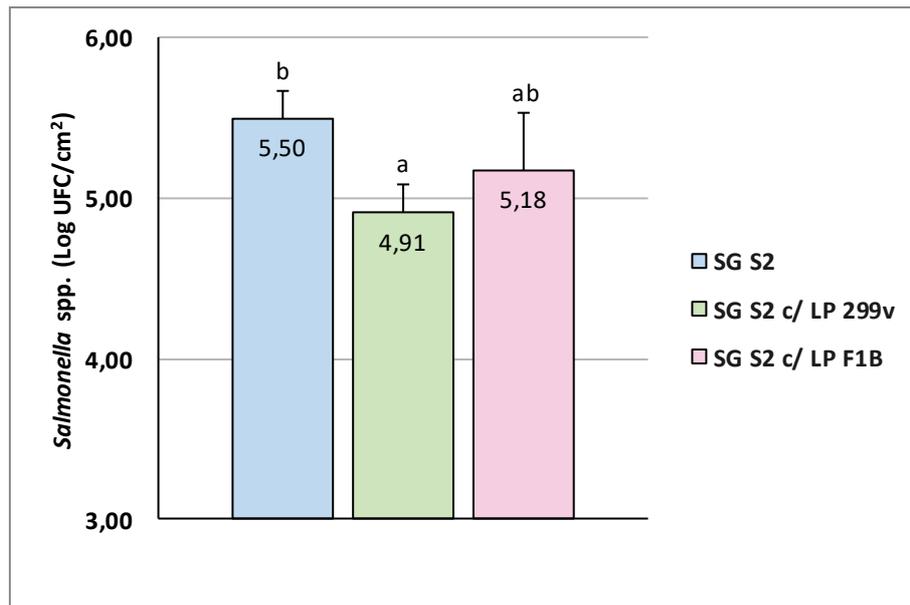


Figura 4.8. Efecto de las BAL sobre el desarrollo de BP de SG S2 en ensayo de competencia ($n=3$). Diferencias significativas entre recuentos se indicaron con letras diferentes ($p<0,05$).

Por otro lado, la formación de BP de *S. Montevideo* ITA S5 no fue afectada significativamente con respecto al control cuando se co-incubó con LP 299v o LP F1B. En ambos cocultivos se obtuvieron valores ligeramente mayores de BP de SM S5 con respecto al control, pero esa diferencia no fue significativa (Fig. 4.9). Esto podría deberse a que las BAL en caldo TS no cuentan con los nutrientes adecuados para lograr un desarrollo óptimo y ejercer una acción antagonista.

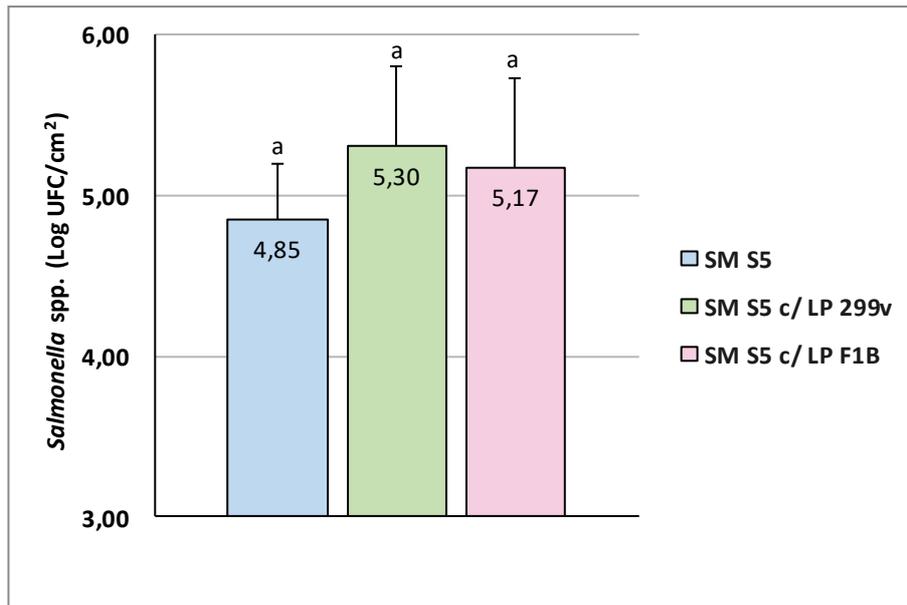


Figura 4.9. Efecto de las BAL sobre el desarrollo de BP SM S5 en ensayo de competencia (n=3). Diferencias significativas entre recuentos se indicaron con letras diferentes ($p < 0,05$).

Cuando se compararon los controles de ambas cepas de salmonela, se observó que SG S2 formó más BP que SM S5 ($p=0,0146$; test t). Esto concuerda con los resultados obtenidos en el ensayo de formación de BP con cristal violeta, donde SG S2 calificó como fuerte formadora y SM S5 calificó como débil formadora de BP (Fig. 4.10).

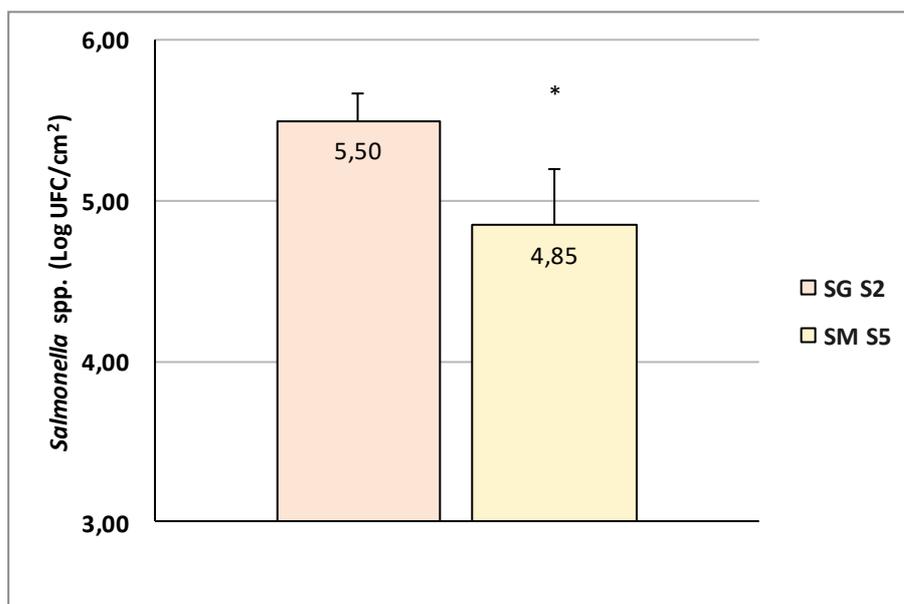


Figura 4.10. Comparación de la formación de BP de las cepas de salmonela control. * Indica diferencia significativa entre cepas (test t).

Respecto al comportamiento de las BAL, la capacidad de formar BP de LP 299v fue modificada por la presencia de SM S5 y no por SG S2. La formación de BP de *L. plantarum* 299v fue significativamente mayor en presencia de SM S5 ($p=0,0104$; test t) con respecto a su control, mientras que cuando se cocultivó con SG S2 no cambió su capacidad de formar BP (Fig. 4.11). Resulta interesante que LP 299v fue capaz de inhibir la formación de BP de SG S2 mientras que su capacidad de formar BP no se modificó por la presencia de la salmonela. Sin embargo, LP 299v no afectó la formación de BP de SM S5, pero sí aumento su capacidad propia de formar BP en cocultivo con ella (respecto a su control).

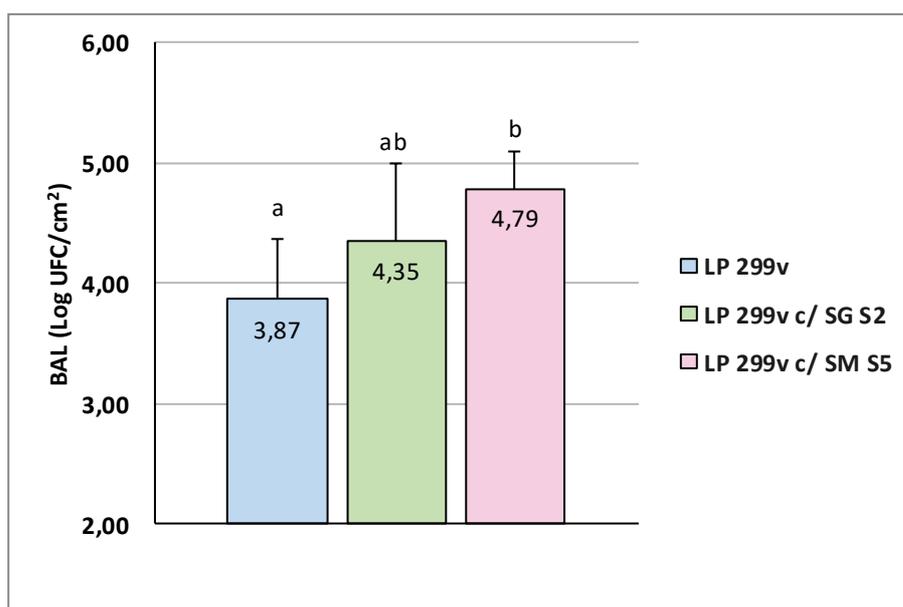


Figura 4.11. Efecto de la presencia de SG S2 y SM S5 sobre la formación de BP de *L. plantarum* 299v en ensayo de competencia (n=3). Diferencias significativas entre recuentos se indicaron con letras diferentes ($p<0,05$).

La formación de BP de *L. plantarum* F1B se muestra en la Figura 4.12. En presencia de *S. Montevideo* ITA S5, resultó levemente disminuida con respecto a su control, aunque no significativamente. En cambio, sí se observó un aumento

significativo en presencia de *S. Glostrup* ITA S2 con respecto a su control ($p=0,0354$; test t). Los valores en los dos cocultivos presentaron diferencias significativas entre sí ($p=0,0200$; test t). Al contrario de lo observado para LP 299v, LP F1B sólo fue capaz de reducir levemente la formación de BP de SG S2 (aunque no significativamente), y en simultáneo ella aumentó ($p<0,05$) su capacidad de formación de BP cuando se cocultivaron. Por otro lado, LP F1B no afectó la BP de SM S5 y tampoco se vio afectada en su capacidad de formar BP en cocultivo con ella.

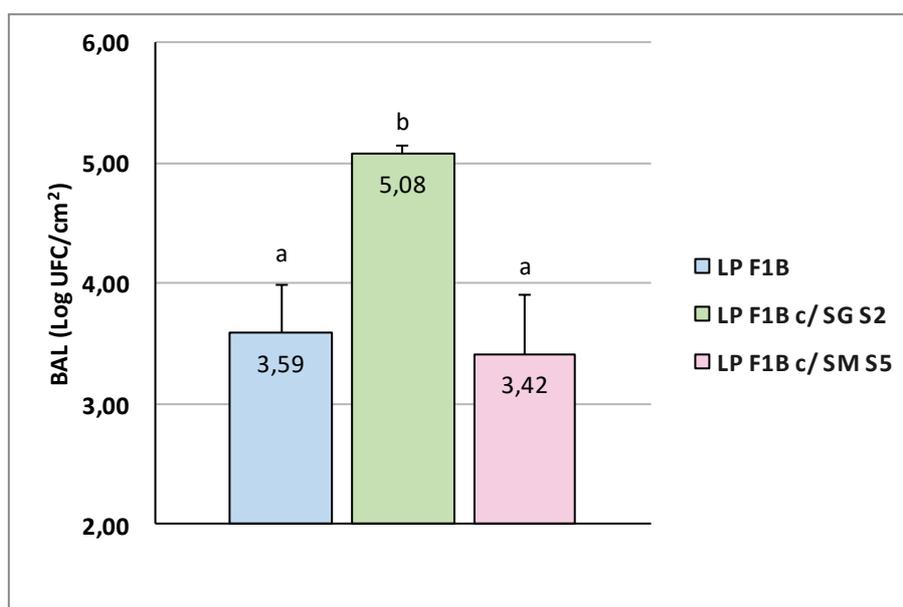


Figura 4.12. Efecto de la presencia de SG S2 y SM S5 sobre la formación de BP de *L. plantarum* F1B en ensayo de competencia ($n=3$). Diferencias significativas entre recuentos se indicaron con letras diferentes ($p<0,05$).

Diversos estudios han demostrado que las BAL son capaces de prevenir la adhesión celular y controlar la formación de BP de distintos patógenos (Jara y col., 2020; Tousehik y col., 2021, Cisneros y col., 2021). Aunque los mecanismos exactos todavía no están definidos, esta actividad antagonista puede deberse a la competencia por nutrientes y sitios de adhesión o a la liberación de metabolitos antimicrobianos como bacteriocinas, biosurfactantes, ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno. Las bacteriocinas pueden comprometer la integridad celular al disipar la fuerza protomotriz

y alterar las membranas bacterianas a través de la formación de poros o la inhibición de la síntesis de peptidoglicano. Los ácidos orgánicos, como el ácido láctico, conducen a una disminución del pH que puede inhibir el crecimiento de microorganismos sin afectar a las BAL debido a su tolerancia a un pH bajo. Los biosurfactantes pueden afectar a los compuestos de la superficie celular (por ejemplo, las proteínas de la superficie) y eliminar los lipopolisacáridos de las bacterias Gram (-), disminuyendo la hidrofobicidad de la superficie celular y evitando una mayor adhesión bacteriana a las superficies en contacto con los alimentos. El peróxido de hidrógeno es un compuesto que contiene oxígeno con propiedades reactivas que pueden dañar biomoléculas como el ADN (Tomé y col., 2023). Entre las BAL, *L. plantarum*, es una de las especies más versátiles ya que, además de contar con valiosas habilidades tecnológicas y características probióticas reconocidas, se ha demostrado que exhibe actividad antagónica contra microorganismos patógenos y alterantes. Su efecto antimicrobiano se ha atribuido a la producción de ácidos orgánicos, incluidos los ácidos láctico y fenil-láctico y también se ha informado la síntesis de bacteriocinas y/o sustancias similares a las bacteriocinas para ejercer la actividad antagónica (Arena y col., 2016). Das y col. (2013) informaron que una cepa de *L. plantarum*, aislada de un producto alimenticio tradicional de la India, inhibió efectivamente la capacidad de crecimiento, invasión y formación de BP de una cepa de *Salmonella* Enteritidis. Ruiz y col. (2019), encontraron que una cepa de *L. plantarum* redujo la totalidad de la producción de BP de *S. Typhimurium*, entre otras cepas. Así mismo, Merino y col. (2019) encontraron que la reducción de la formación de BP de *S. Enteritidis* 115 en cocultivo con *L. plantarum* 83114 fue del 75 %. Sin embargo, Woo y Ahn (2013) no observaron reducciones significativas en el número de células de BP de una cepa *S. Typhimurium* cuando se puso en competencia con 4 cepas BAL. En nuestro ensayo, se observó una reducción

significativa de la formación de BP de SG S2 por efecto de LP 299v, mientras que no se observó un efecto de las BAL sobre la formación de BP de SM S5. Las condiciones bajo las que se desarrolló el ensayo (utilizándose caldo TS) podrían haber enmascarado el potencial efecto inhibitor de las BAL, ya que no contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento óptimo de las cepas de *L. plantarum*.

4.4.2. Desplazamiento

En los ensayos de desplazamiento, se determinó la capacidad de las BAL de remover total o parcialmente las BP de salmonela previamente formadas. Tanto *L. plantarum* 299v como *L. plantarum* F1B fueron capaces de remover totalmente las BP de ambas cepas indicadoras (Fig. 4.13 y Fig. 4.14).

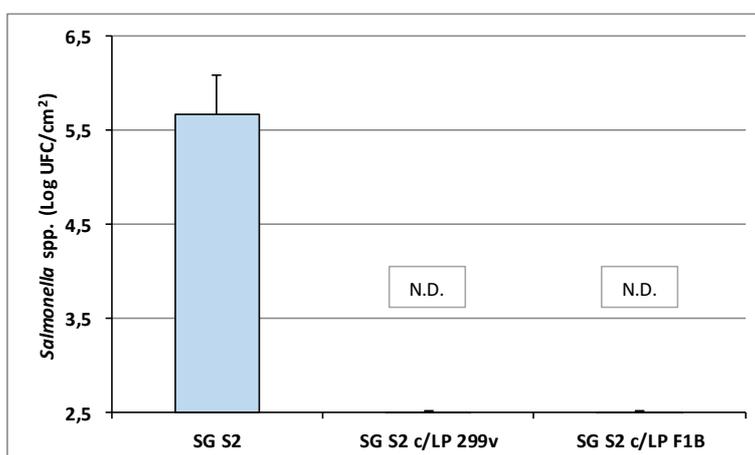


Figura 4.13. Efecto de las BAL sobre la BP preformada de SG ITA S2 en ensayo de desplazamiento (n=3). N.D. = valores por debajo del límite de detección.

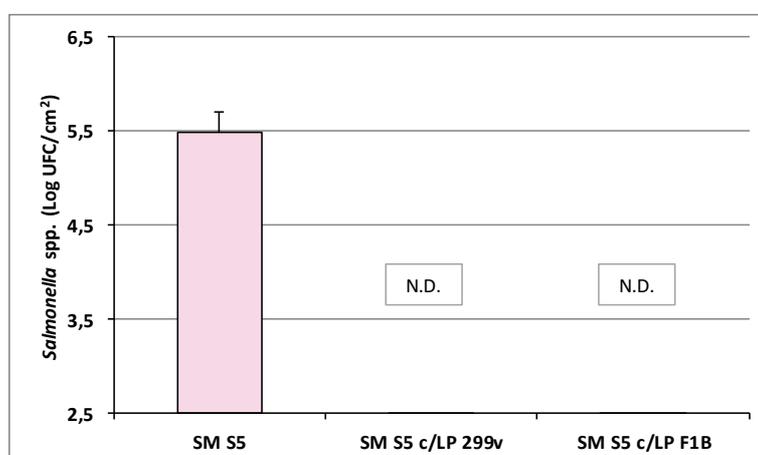


Figura 4.14. Efecto de las BAL sobre la BP preformada de SM ITA S5 en ensayo de desplazamiento (n=3). N.D. = valores por debajo del límite de detección.

Las BP control de las cepas indicadoras mostraron recuentos de $5,67 \pm 0,41$ log UFC/cm² y $5,49 \pm 0,21$ log UFC/cm² para SG S2 y SM S5, respectivamente. Luego de inoculadas las BAL, en todos los casos los recuentos se redujeron significativamente, hasta valores no detectables mediante el método de recuento en placa.

En cuanto a las BAL, se observó que *L. plantarum* 299v no formó BP en su cultivo control ni en presencia de las BP de ambas cepas de salmonela previamente formadas. *L. plantarum* F1B fue capaz de formar BP levemente (Fig. 4.15) y su capacidad no se modificó cuando se cocultivó con SG S2 ni con SM S5.

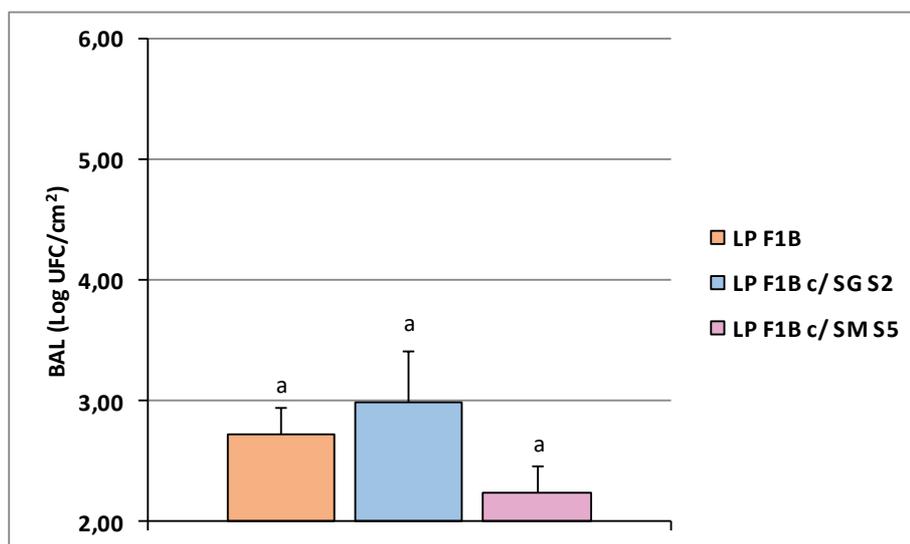


Figura 4.15. Efecto de la presencia de SG ITA S2 y SM ITA S5 sobre la formación de BP de *L. plantarum* F1B en ensayo de desplazamiento (n=3). Diferencias significativas entre recuentos se indicaron con letras diferentes (p<0,05).

En el ensayo de desplazamiento, la presencia de salmonela no afectó el comportamiento de las BAL, pero sí en todos los casos se observó una disminución de la BP de las bacterias indicadoras hasta niveles no detectables. Cabe destacar que, la formación de BP de SG S2 y SM S5 fue más inhibida en este ensayo que en el ensayo de Competencia. Puede postularse que el principal mecanismo utilizado por las BAL para la eliminación de la BP de salmonela preformada fue la producción de ácido láctico

(Tomé y col., 2023). En este ensayo las cepas de *L. plantarum* fueron cultivadas en caldo MRS, que es un caldo rico en nutrientes y que fue diseñado para el óptimo crecimiento de las bacterias ácido lácticas. En el ensayo de Competencia, ambas cepas antagonicas fueron coincubadas en caldo TS, un caldo de uso general de composición más simple. En un estudio de desplazamiento a 37 °C realizado por Ruiz y col. (2022), las BP de STEC y *S. Typhimurium*, previamente aisladas de un caso clínico de síndrome urémico hemolítico y de un criadero de cerdos respectivamente, fueron reducidos al incorporar el cultivo de *L. plantarum* (en MRS) de origen porcino ($p < 0,01$). Sin embargo, Woo y Ahn (2013), determinaron que la actividad de desplazamiento de las células planctónicas de las BAL incubadas en caldo TS, no fue eficaz contra *S. Typhimurium*. Estos resultados reflejan que es necesario evaluar cada BAL en particular para determinar si posee el potencial de desplazar la formación de BP de un patógeno específico. Por otro lado, estos resultados destacan la capacidad antagonica de LP F1B (cepa autóctona), similar a la de la cepa probiótica comercial LP 299v. Los resultados de las pruebas de reducción de BP sobre serotipos de salmonela aislados del ambiente aviar, son alentadores y constituyen el primer paso para estudiar su aplicación como cultivo protector en carne de pollo y/o superficies de procesamiento.

4.5. Ensayo de antagonismo en medio líquido mediante cultivos mixtos

Para poder evaluar si las cepas estudiadas en el punto anterior muestran el mismo comportamiento en estado de cultivo planctónico, se realizó el ensayo de antagonismo en medio líquido donde cultivos mixtos o cocultivos (BAL + bacteria indicadora) fueron incubados a 37 °C durante 48 h, al igual que los cultivos control o monocepa tanto de las bacterias indicadoras como de las BAL. En paralelo, se realizó el mismo ensayo a 10 °C durante 10 días. Esta temperatura fue seleccionada ya que se

considera temperatura de abuso de almacenamiento refrigerado en carne de pollo fresca y, a la vez, es la temperatura usual de las salas de trozado en las plantas frigoríficas.

4.5.1. Modelado y obtención de los parámetros cinéticos

Se estudió la evolución de los cocultivos en el tiempo para determinar las cinéticas de interacción. El modelo de Baranyi y Roberts describió satisfactoriamente la mayoría de los conjuntos de datos experimentales de las curvas obtenidas correspondientes a cocultivos y cultivos controles. Los valores experimentales correspondientes al crecimiento o inactivación (según el caso) presentaron comportamiento sigmoide y los parámetros del modelo se estimaron mediante regresión no lineal utilizando el programa de ajuste de curvas DMfit (<https://www.combase.cc/index.php/en/>). La bondad de ajuste se evaluó mediante el error estándar (SE) y el coeficiente de determinación (R^2). Los parámetros cinéticos estimados: velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}), velocidad máxima de inactivación ($-\mu_{max}$) y fase de latencia (lag), se presentan en las Tablas 4.6 y 4.7 (para TS y MRS a 37 °C respectivamente) y Tablas 4.8 y 4.9 (para TS y MRS a 10 °C respectivamente).

4.5.1.1. Interacciones durante la incubación a 37 °C

En caldo TS, la evolución de los recuentos de *S. Glostrup* ITA S2 en cocultivo con *L. plantarum* 299v no difirió de la de su cultivo control, con velocidades de crecimiento prácticamente iguales. En cocultivo con *L. plantarum* F1B, la velocidad de crecimiento de SG S2 casi duplicó la del cultivo control (Tabla 4.6). Las tres curvas experimentales se ajustaron a modelos *no lag* y en torno a las 10 h entraron en fase estacionaria hasta el final de la incubación [Fig. 4.16 (a) y (b)]. Cuando se compararon los niveles de SG S2 al cabo de las 48 h de incubación, no se detectaron diferencias significativas en los recuentos del control respecto de los co-cultivos, alcanzándose

valores de 8,5 - 9 log UFC/ml en fase estacionaria. En cuanto a *Salmonella* Montevideo ITA S5, la evolución en cocultivo con LP 299v y con LP F1B no difirió de la de su cultivo control, con velocidades de crecimiento muy similares (Tabla 4.6). Las tres curvas experimentales se ajustaron a modelos *no lag* y en torno a las 10 h entraron en fase estacionaria hasta el final de la incubación [Fig. 4.16 (c) y (d)]. Al compararse los recuentos finales (48 h) de SM S5, niveles significativamente menores ($p=0,0368$, test t) se observaron para el cocultivo con LP 299v, respecto al control.

Tabla 4.6. Parámetros cinéticos estimados del modelo de Baranyi y Roberts para el ajuste de la evolución de los recuentos de los cultivos control y cocultivos conservados en caldo TS a 37 °C durante 48 horas.

Mo	Cultivo	Parámetros cinéticos del modelo				Modelo Baranyi-Roberts
		μ_{max} (log UFC. ml ⁻¹ . h ⁻¹)	lag (horas)	R ²	SE Modelo	
S2	control	0,652±0,121	-	0,961	0,339	No lag
	CC 299v	0,591±0,0813	-	0,974	0,266	No lag
	CC F1B	1,0128±0,287	-	0,899	0,579	No lag
S5	control	0,807±0,108	-	0,981	0,226	No lag
	CC 299v	0,719±0,174	-	0,944	0,369	No lag
	CC F1B	0,884±0,193	-	0,947	0,4	No lag
299v	control	0,125±0,0307	-	0,915	0,111	No lag
	CC S2	0,322±0,23	-	0,55	0,476	No lag
	CC S5	0,152±0,0529	-	0,884	0,111	No lag
F1B	control	0,0736±0,0399	-	0,796	0,168	No lag
	CC S2	0,173±0,0215	-	0,985	0,0524	No lag
	CC S5	0,0336±0,00108	-	0,999	0,015	No lag

μ_{max} : tasa o velocidad máxima de crecimiento o inactivación, lag: fase de latencia, R²: coeficiente de determinación, SE Modelo: error estándar del ajuste del modelo.

En cuanto al comportamiento de las BAL en caldo TS (Tabla 4.6), sus curvas experimentales se ajustaron a modelos no lag, y en general tuvieron velocidades de crecimiento menores que las cepas de salmonela, tanto en su cultivo control como en cocultivo, siendo los valores más bajos para LP F1B control y para su cocultivo con SM ITA S5. Partiendo de recuentos iniciales cercanos a 7 log UFC/ml, alcanzaron valores aproximados de 8 log UFC/ml en su fase estacionaria y hasta el final del período de incubación, confirmando su escaso crecimiento en este medio de cultivo.

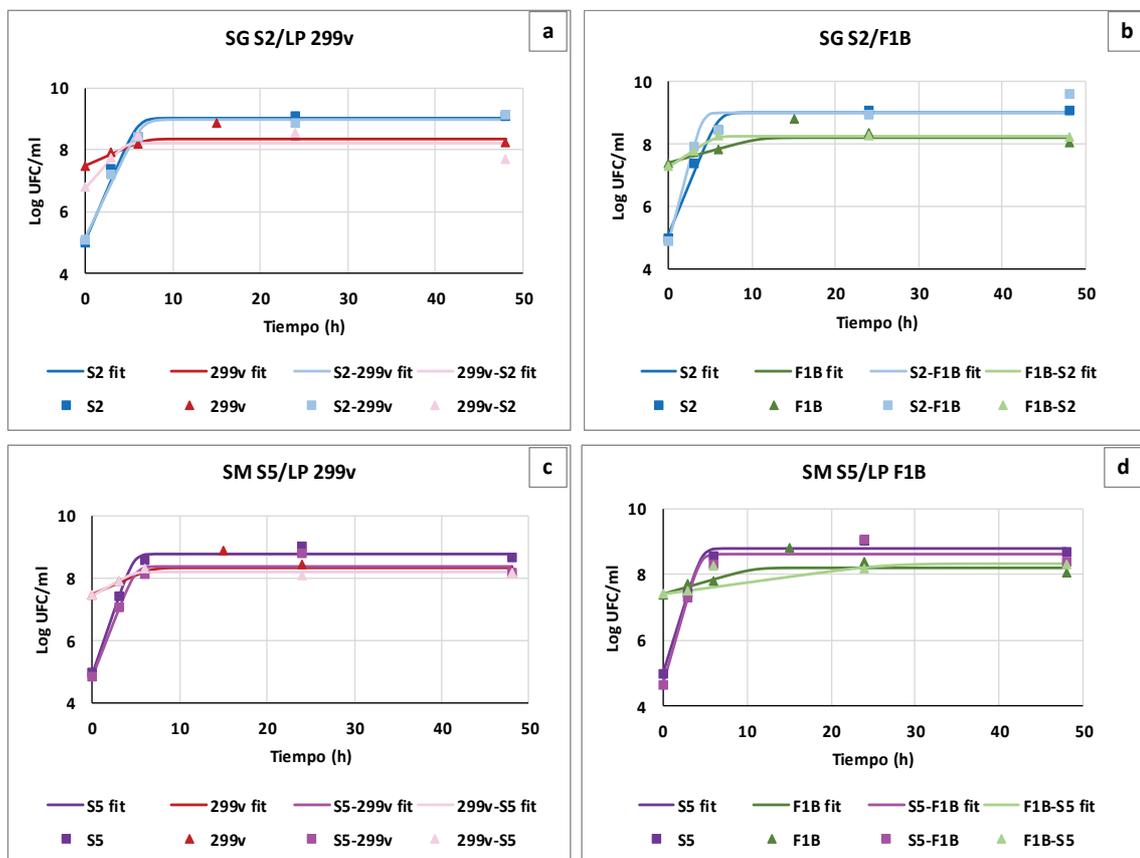


Figura 4.16. Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de las BAL y cepas indicadoras, como cultivo control y cocultivos, en caldo TS a 37 °C.

En caldo MRS (Tabla 4.7), el cultivo control de *S. Glostrup* ITA S2 se ajustó a un modelo *no lag*, y creció hasta las 22 h de incubación (8,5 log UFC/ml) en que comenzó la fase estacionaria. Sin embargo, en cocultivo con LP 299v y LP F1B, se observó una disminución de sus recuentos, presentando tasas de decrecimiento similares

entre sí ($\mu = -0,214 \log \text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ y $\mu = -0,197 \log \text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ respectivamente). A las 18 h de incubación en ambos casos se alcanzaron niveles no detectables [Fig. 4.17 (a) y (b)]. De manera similar, *S. Montevideo* ITA S5 también se desplazó desde una cinética de crecimiento en su cultivo control a una de decrecimiento en cocultivo con LP 299v y LP F1B [Fig. 4.17 (c) y (d)].

Tabla 4.7. Parámetros cinéticos estimados del modelo de Baranyi y Roberts para el ajuste de la evolución de los recuentos de los cultivos control y cocultivos conservados en caldo MRS a 37 °C durante 48 horas.

Mo	Cultivo	Parámetros cinéticos del modelo				Modelo Baranyi-Roberts
		μ_{max} (log UFC. ml ⁻¹ . h ⁻¹)	lag (horas)	R ²	SE Modelo	
S2	control	0,172±0,0251	-	0,995	0,121	No lag
	CC 299v	-0,214±0,0882	-	0,81	0,884	No lag
	CC F1B	-0,299±1,81e-16	5,933±7,29e-15	1	1,54e-15	Trilinear
S5	control	0,262±0,0335	-	0,994	0,142	No lag
	CC 299v	-0,197±0,0918	-	0,755	0,953	No lag
	CC F1B	-0,193±0,096	-	0,723	1,0151	No lag
299v	control	0,288±0,000425	-	1	0,00147	No lag
	CC S2	0,258±0,0295	-	0,984	0,113	No lag
	CC S5	0,222±0,026	-	0,985	0,106	No lag
F1B	control	0,234±0,0495	-	0,947	0,191	No lag
	CC S2	0,25±0,0259	-	0,987	0,099	No lag
	CC S5	0,225±0,0395	-	0,963	0,148	No lag

μ_{max} : tasa o velocidad máxima de crecimiento o inactivación, **lag**: fase de latencia, **R²**: coeficiente de determinación, **SE Modelo**: error estándar del ajuste del modelo.

En MRS, *L. plantarum* 299 v y *L. plantarum* F1B, presentaron tasas de crecimiento similares tanto para sus cultivos control como para sus cocultivos con SG S2 y SM S5 con valores que promediaron los 0,250 log UFC.ml⁻¹.h⁻¹ y se ajustaron a un modelo *no lag*. Ambas BAL detuvieron su crecimiento para entrar en fase estacionaria aproximadamente a las 10 horas de almacenamiento a 37 °C (Fig. 4.17).

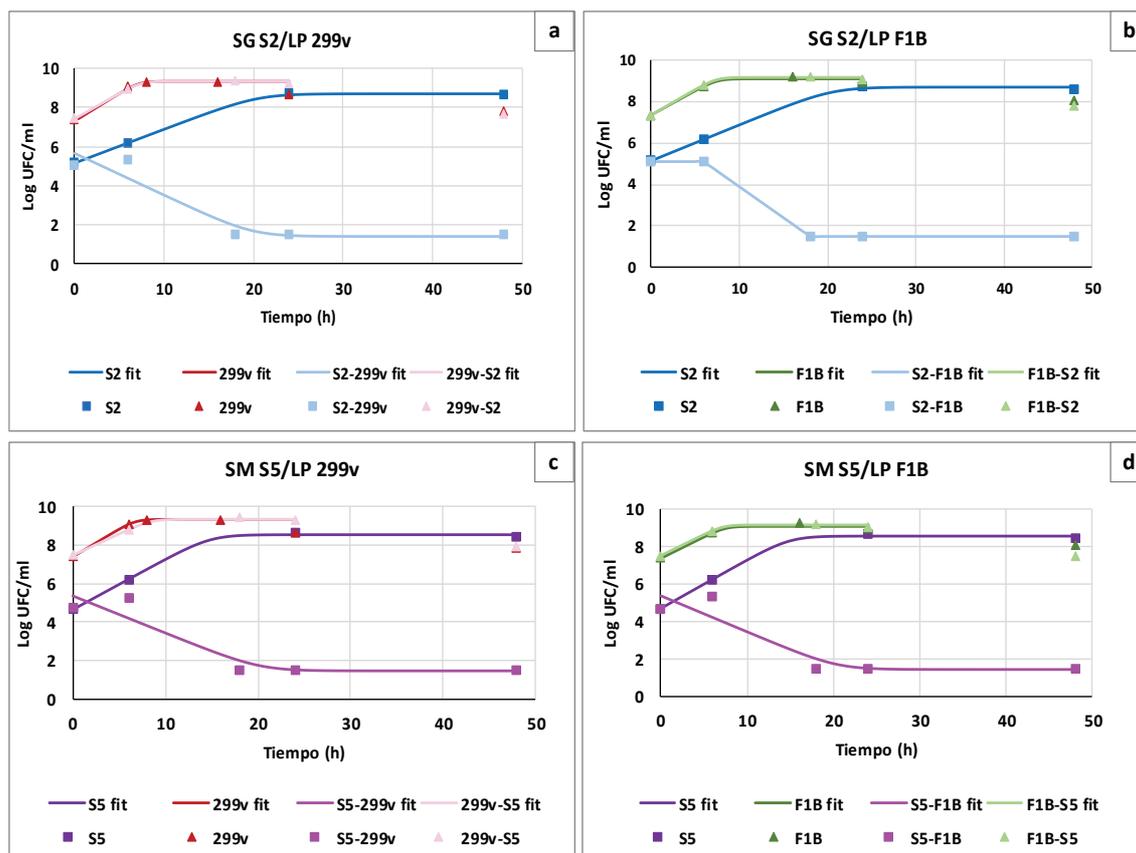


Figura 4.17. Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de las BAL y cepas indicadoras, como cultivo control y cocultivos, en caldo MRS a 37 °C.

Cuando ambas BAL cuando se cocultivaron en MRS con ambas cepas de salmonela, inhibieron su crecimiento hasta niveles no detectables. Sin embargo, cuando se cocultivaron en caldo TS no se observó inhibición de las cepas indicadoras. Cuando comparamos los cultivos control de las BAL en ambos caldos, vemos que la tasa de crecimiento fue 2 y 3 veces mayor en MRS que en TS para LP 299v y LP F1B, respectivamente (Tablas 4.6 y 4.7). Además, para ambas BAL, los recuentos alcanzados

en fase estacionaria en caldo TS (8 log UFC/ml) fueron de 1 orden log menor que en MRS (9 log UFC/ml). Al cabo de las 48 h a 37 °C el pH promedio de todos los cocultivos en TS resultó igual a $6,00 \pm 0,67$, mientras que en los cocultivos en caldo MRS alcanzó un valor promedio de $4,10 \pm 0,04$. El caldo MRS está especialmente formulado para el crecimiento de las BAL y tiene, además de nutrientes específicos, una concentración de glucosa 10 veces mayor que el caldo TS lo que explicaría la mayor producción de ácidos orgánicos y, por ende, la diferencia de comportamiento de las cepas de BAL en este estudio.

4.5.1.2. Interacciones durante la incubación a 10 °C

En caldo TS, *S. Glostrup* ITA S2 en cocultivo con LP 299v presentó una fase lag de 3 d que resultó 1,3 veces menos extensa que la de su cultivo control y creció más rápidamente en comparación con su cocultivo con LP F1B y su cultivo control, ajustándose a un modelo de crecimiento completo (Fig. 4.18 (a) y (b)). Luego de la fase lag, el crecimiento de SG S2 en el control y en cocultivo con LP F1B ocurrió de manera ininterrumpida desde el inicio hasta el final de la incubación, por lo que se ajustó a un modelo *no asintótico*, pudiendo haberse extendido esta fase o haber llegado a una fase estacionaria si el tiempo de incubación hubiera sido mayor (Tabla 4.8). Los valores finales (10 días) de SG S2 no mostraron diferencias significativas entre el control y los cocultivos. Por su parte, *S. Montevideo* ITA S5 se ajustó en su control y en sus cocultivos a un modelo completo de crecimiento [Fig. 4.18 (c) y (d)]. En cocultivo con F1B presentó una fase lag más corta, pero una velocidad de crecimiento más lenta que su cultivo control y que el cocultivo con LP 299v. Cuando se compararon los valores de recuento de SM S5 al cabo de 10 d a 10 °C, niveles significativamente menores se

observaron para los cocultivos ($p=0,0090$ y $p=0,0057$ para el cocultivo con LP 299v y LP F1B respectivamente; test t), respecto a los del cultivo control.

Tabla 4.8. Parámetros cinéticos estimados del modelo de Baranyi y Roberts para el ajuste de la evolución de los recuentos de los cultivos control y cocultivos conservados en caldo TS a 10 °C durante 10 días.

Mo	Cultivo	Parámetros cinéticos del modelo				
		μ_{\max} (log UFC. ml ⁻¹ . d ⁻¹)	lag (días)	R ²	SE Modelo	Modelo Baranyi- Roberts
S2	control	0,698±0,0541	4,549±0,341	0,981	0,182	No asintótico
	CC 299v	0,864±0,195	3,477±0,74	0,946	0,368	Completo
	CC F1B	0,625±0,126	3,625±1,0911	0,875	0,505	No asintótico
S5	control	0,907±0,115	2,616±0,468	0,977	0,252	Completo
	CC 299v	0,732±0,103	2,217±0,572	0,97	0,244	Completo
	CC F1B	0,656±0,0545	1,768±0,383	0,988	0,15	Completo
299v	control	0,47±0,106	5,823±0,242	0,983	0,0566	Completo
	CC S2	0,178±0,043	4,832±1,0239	0,842	0,135	No asintótico
	CC S5	0,221±0,0586	5,53±0,97	0,817	0,156	No asintótico
F1B	control	0,0795±0,0506	4,78±2,856	0,348	0,16	No asintótico
	CC S2	0,0868±0,0239	2,14±2,113	0,797	0,12	No asintótico
	CC S5	0,443±0,483	6,0716±0,772	0,673	0,116	Completo

μ_{\max} : tasa o velocidad máxima de crecimiento o inactivación, lag: fase de latencia, R²: coeficiente de determinación, SE Modelo: error estándar del ajuste del modelo.

Con respecto a las BAL incubadas en TS a 10 °C, LP 299v en cocultivo con SG S2 y SM S5 mostró velocidades de crecimiento 2 veces menores respecto a su cultivo control, ajustando a modelos no asintóticos y completo, respectivamente. Por el contrario, LP F1B en cocultivo con SM S5 ajustó a un modelo de crecimiento completo presentando una fase lag de 6 d y μ_{max} 5 veces mayor que cuando se cocultivó con SG S2, donde su crecimiento se ajustó a un modelo *no asintótico*, al igual que el cultivo control (Tabla 4.8).

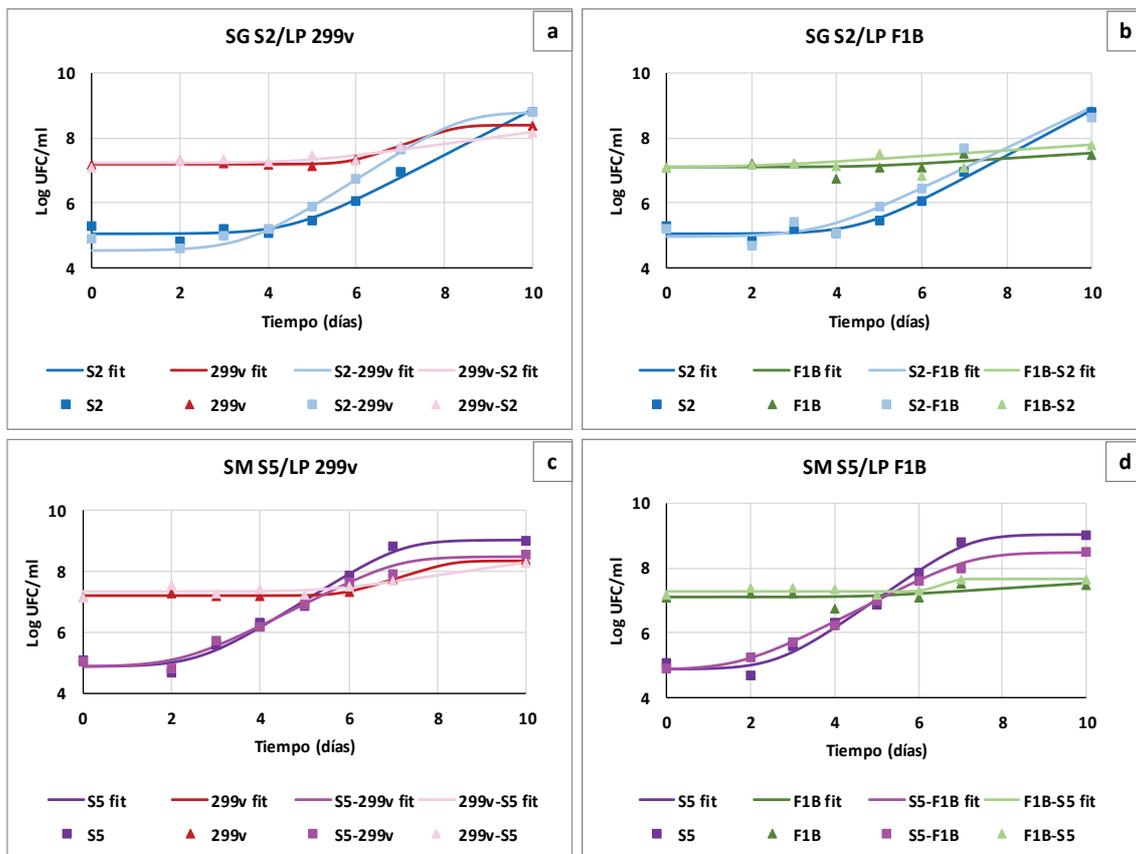


Figura 4.18. Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de las BAL y cepas indicadoras, como cultivo control y cocultivos, en caldo TS a 10 °C.

Finalmente, en caldo MRS a 10 °C, los recuentos de los cultivos control de *S. Glostrup* ITA S2 y *S. Montevideo* ITA S5 se mantuvieron estables durante los 10 d del ensayo y no ajustaron a ningún modelo (Fig. 4.19). Sin embargo, SG S2 en cocultivo con LP 299v y LP F1B, experimentó una fase de latencia 6-7 d para después disminuir

sus recuentos aceleradamente. Ambos cocultivos se ajustaron a un modelo de decrecimiento completo. *S. Montevideo* ITA S5, en cocultivo con ambas BAL, también experimentó una fase de latencia de 6 - 7 d. Sin embargo, en cocultivo con LP F1B su tasa de inactivación resultó 3 veces mayor que con LP 299v [Fig. 4.18 (c) y (d)]. En todos los casos, salmonela alcanzó niveles no detectables al día 9 (o día 10 para SM S5 / LP 299v).

Tabla 4.9. Parámetros cinéticos estimados del modelo de Baranyi y Roberts para el ajuste de la evolución de los recuentos de los cultivos control y cocultivos conservados en caldo MRS a 10 °C durante 10 d.

Parámetros cinéticos del modelo						
Mo	Cultivo	μ_{\max} (log UFC. ml ⁻¹ . d ⁻¹)	lag (d)	R ²	SE Modelo	Modelo Baranyi- Roberts
	control	NO AJUSTÓ A NINGÚN MODELO				
S2	CC 299v	-1,922±0,678	6,266±0,267	0,992	0,141	Completo
	CC F1B	-2,025±0,302	7,145±0,147	0,992	0,128	Completo
	control	NO AJUSTÓ A NINGÚN MODELO				
S5	CC 299v	-1,148±0,237	6,575±0,595	0,917	0,439	No asintótico
	CC F1B	-3,556±4,721	7,632±0,491	0,997	0,0748	Completo
	control	0,303±0,0281	1,644±0,465	0,985	0,0852	Completo
299v	CC S2	0,33±0,055	2,303±0,786	0,961	0,15	Completo
	CC S5	0,241±0,0313	1,931±1,119	0,929	0,186	No asintótico
	control	0,276±0,1	3,427±1,0968	0,874	0,173	Completo
F1B	CC S2	0,874±0,755	5,339±0,701	0,89	0,224	Completo
	CC S5	0,186±0,0321	2,604±1,338	0,882	0,175	No asintótico

μ_{\max} : tasa o velocidad máxima de crecimiento o inactivación, **lag**: fase de latencia, **R²**: coeficiente de determinación, **SE Modelo**: error estándar del ajuste del modelo.

Respecto al comportamiento de las BAL en MRS a 10 °C, tanto en cultivo control como en sus dos cocultivos, LP 299v se mantuvo en fase lag entre 1 y 2 d para luego comenzar a crecer [Fig. 4.19 (a) y (c)]. Su crecimiento en el cocultivo con SM ITA S5 ocurrió de manera ininterrumpida desde el inicio hasta el final del almacenamiento, por lo que se ajustó a un modelo *no asintótico*. Sin embargo, en el cultivo control y su cocultivo con SG S2, desarrolló modelos *completos*, sin marcadas diferencias entre los valores de velocidad de crecimiento. LP F1B, en cocultivo con SG S2, creció a mayor velocidad que la de su control y su cocultivo con SM S5, pero con una fase de latencia más extensa [Fig. 4.19 (b) y (d)]. Tal como sucedió con LP 299v, LP F1B en cocultivo con SM S5 creció de manera ininterrumpida desde el inicio hasta el final de la incubación ajustándose a un modelo *no asintótico*.

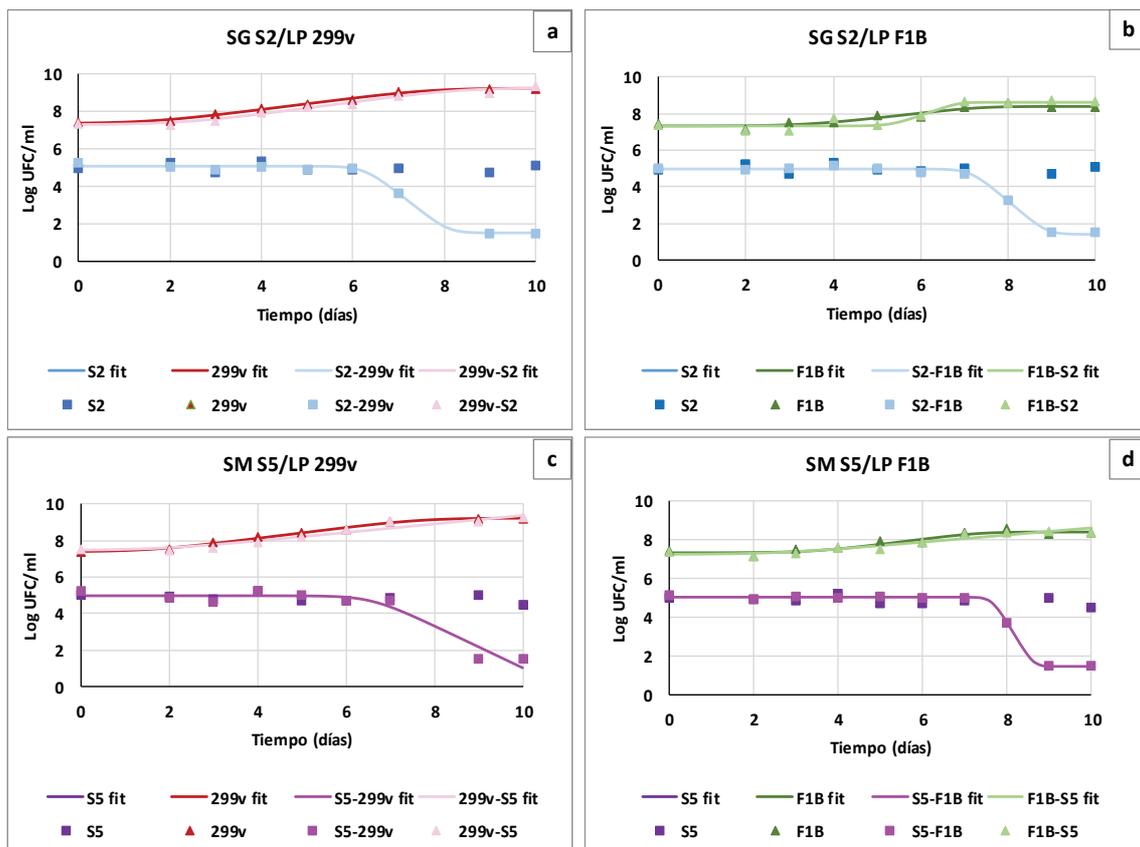


Figura 4.19. Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de las BAL y cepas indicadoras, como cultivo control y cocultivos, en caldo MRS a 10 °C.

En MRS a 10°C se observó la inactivación de ambas cepas indicadoras en ambos cocultivos. Esto se contrapone con lo sucedido a la misma temperatura en caldo TS, donde se observó una cinética de crecimiento en todos los casos (Fig 4.18). Por otro lado, ambas BAL crecieron en MRS (1 y 2 órdenes log para 10°C y 37°C respectivamente) y ejercieron un efecto inhibitorio del crecimiento de ambas cepas de salmonela. Esto avalaría su aplicación en ambientes refrigerados de las plantas de faena de pollo para biocontrol, ya que a temperaturas de refrigeración (3-4 °C) las BAL utilizadas como cultivos protectores se mantendrían viables sin afectar las propiedades sensoriales del alimento, pero, al aumentar la temperatura (hacia los 10 °C), comenzarían a crecer lentamente, con el potencial de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y controlar la microbiota alterante.

4.6. Evaluación *in situ* de la actividad antagonista de *L. plantarum* F1B frente a aislamientos autóctonos de *Salmonella* spp. en carne de pollo previamente descontaminada

En el ensayo de antagonismo en medio líquido a 10 °C se observó que LP F1B tuvo un comportamiento similar a la cepa probiótica comercial LP 299v y fue capaz de mantenerse viable, crecer e inhibir el crecimiento de ambas cepas de salmonela en un medio de crecimiento óptimo como el MRS. Además, redujo los niveles finales de ambas cepas indicadoras a esa temperatura en caldo TS. Para evaluar si LP F1B mantiene su capacidad de crecer y/o ejercer un efecto inhibitorio sobre salmonela en carne de pollo almacenada a 10 °C, en un primer ensayo se decidió disminuir la población de BAL nativas u otras bacterias que pueden estar presentes naturalmente en la carne de pollo a través de un proceso de descontaminación.

4.6.1. Ensayo preliminar para seleccionar condiciones de descontaminación de pollo

Para seleccionar el tratamiento de descontaminación más apropiado, se evaluó la disminución de la carga de microorganismos aerobios mesófilos totales correspondientes a los distintos tratamientos de descontaminación aplicados en carne de pollo (Fig. 4.20).



Figura 4.20. Variación en los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales (AMT) luego de la aplicación de tratamientos descontaminantes (T) con respecto a la carga inicial de la materia prima (MP).

En las muestras tratadas por inmersión en mezcla de ácidos, el recuento de AMT experimentó un descenso de 0,46 log UFC/g pollo con respecto al recuento de la materia prima. Las muestras tratadas con vapor fluente durante 30 s experimentaron un descenso mayor que alcanzó un valor de 2,37 log UFC/g pollo. Finalmente, con la combinación de vapor fluente durante 30 s seguido de un tratamiento con luz UV- C durante 15 min de cada lado ocurrió el descenso de mayor magnitud (2,85 log UFC/g pollo). En consecuencia, el tratamiento con inmersión en mezcla de ácidos fue poco eficaz en comparación con los otros dos tratamientos aplicados que tuvieron un rendimiento similar. Para el ensayo de antagonismo *in situ* en carne de pollo descontaminada y conservada a 10°C se requiere, además de una disminución significativa de la microbiota nativa de la carne de pollo, un tratamiento de aplicación

sencillo y que permita mantener a las muestras en las mejores condiciones. En base a estas premisas, se optó por aplicar para la descontaminación el método que aplica sólo vapor fluente durante 30 s.

4.6.2. Interacción entre *L. plantarum* F1B y aislamientos autóctonos de salmonela en carne de pollo previamente descontaminada

El comportamiento de *S. Glostrup* ITA S2 y *S. Montevideo* ITA S5 frente a *L. plantarum* F1B se evaluó en alitas de pollo descontaminadas e inoculadas o no (MP) con distintas suspensiones, según su grupo:

MP = Materia prima (alitas sin tratar);

F1B = Alitas tratadas con suspensión de *L. plantarum* F1B;

S2 = Alitas tratadas con suspensión de *S. Glostrup* ITA S2;

S5 = Alitas tratadas con suspensión de *S. Montevideo* ITA S5;

F1B / S2 = Alitas tratadas con suspensión de *L. plantarum* F1B + *S. Glostrup* ITA S2;

F1B / S5 = Alitas tratadas con suspensión de *L. plantarum* F1B + *S. Montevideo* ITA S5.

Los recuentos de BAL y de *Salmonella* spp. en las suspensiones con las que se inocularon los distintos grupos de alitas de pollo se presentan en la Fig. 4.21.

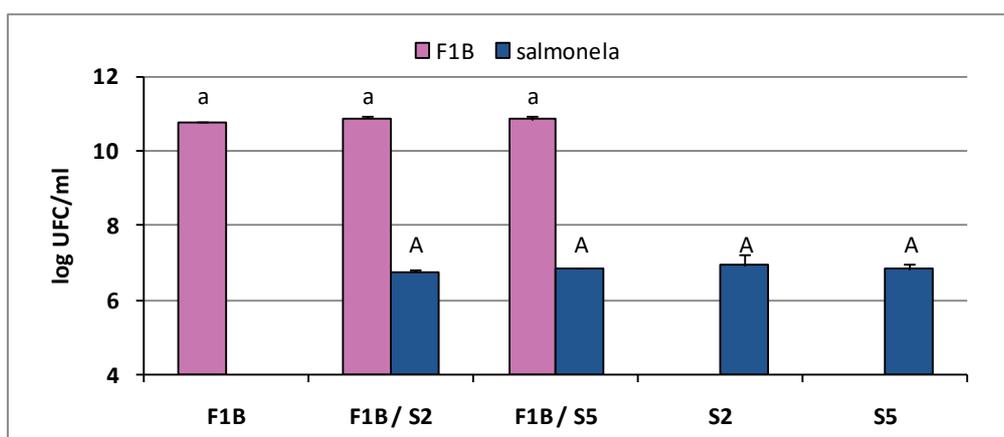


Figura 4.21. Recuentos de LP F1B, SG S2 Y SM S5 en las suspensiones de inoculación utilizadas para el ensayo en carne de pollo descontaminada. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las suspensiones de LP F1B o de SG S2 y SM S5.

Los resultados indican que no existieron diferencias significativas en las concentraciones de LP F1B ni de cada salmonela entre las suspensiones de inoculación, es decir, todos los grupos fueron inoculados con suspensiones que aportaron los mismos niveles de microorganismos. Los valores de recuento de *L. plantarum* F1B en las diferentes muestras de pollo almacenadas a 10 °C se muestran en la Tabla 4.10. Al día 4 de muestreo, no fue posible realizar los recuentos ya que no pudieron distinguirse las colonias típicas de BAL debido al desarrollo de colonias inespecíficas.

Tabla 4.10. Recuentos de LP F1B en muestras de alitas de pollo descontaminadas a los días 0, 1 y 2 de almacenamiento a 10 °C.

MUESTRA	tiempo	<i>L. plantarum</i> F1B
	días	Log UFC/g pollo
F1B	0	8,13±0,25 a
	1	8,06±0,16 a
	2	7,86±0,01 a
F1B/S2	0	8,13±0,25 a
	1	8,39±0,03 a
	2	8,20±0,02 a
F1B/S5	0	8,13±0,25 a
	1	8,28±0,10 a
	2	8,26±0,04 a

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos días para cada muestra (ANOVA+Tukey).

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de LP F1B en pollo descontaminado entre los distintos grupos de muestras. Es decir, tanto cuando *L. plantarum* F1B fue inoculado de manera individual (grupo F1B) como de manera combinada con *Salmonella* Glostrup ITA S2 (grupo F1B/S2) o *Salmonella* Montevideo ITA S5 (grupo F1B/S5), su concentración se mantuvo estable en carne de pollo hasta el día 2 de almacenamiento a 10 °C. Esto demuestra que *L. plantarum* F1B no fue afectado

por la temperatura de refrigeración usada para este ensayo ni por la presencia de salmonela, pero que tampoco tuvo las condiciones para crecer. Esto era esperable si se considera que, en los medios de cultivo TS o MRS incubados a 10 °C, LP F1B mostró en todos los casos fases lag de al menos 2 días, y que la disponibilidad de fuentes de carbono en la superficie de la carne de pollo es limitada. El mismo comportamiento fue observado por Cho y col. (2010) para *L. plantarum* BFE 5092, cepa productora de bacteriocinas, en carne de pavo previamente descontaminada por radiación a 8 °C. La BAL en estudio fue capaz de mantenerse viable pero no de crecer, manteniéndose en niveles similares a los iniciales (7 log UFC/g) durante los 9 d de ensayo.

Cuando se analizó el comportamiento de *Salmonella* spp. en carne de pollo descontaminada, los recuentos iniciales (día 0) de ambas cepas indicadoras no presentaron diferencias significativas entre sí, confirmando que todos los grupos iniciaron el ensayo con la misma carga de patógeno. Los valores de recuentos de SG S2 y SM S5 en las muestras de pollo durante el tiempo de almacenamiento a 10 °C se muestran en la Tabla 4.11. Al igual que sucedió con el recuento de BAL, no fue posible realizar los recuentos de salmonela al día 4, ya que no pudieron distinguirse las colonias típicas debido al crecimiento de colonias inespecíficas. Cuando se analizó el comportamiento de salmonela en cada grupo de muestras por separado a través del tiempo (ANOVA+Tukey), se observó que ambos grupos control (no tratados con LP F1B) presentaron el mismo comportamiento: recuentos similares en los días 0 y 1, y significativamente mayores en el día 2 de almacenamiento a 10 °C. Por el contrario, en ambos grupos co-inoculados con LP F1B, no se detectaron diferencias significativas en los recuentos durante todo la incubación (Tabla 4.11).

Tabla 4.11. Recuentos de SG S2 y SM S5 en muestras de alitas de pollo descontaminadas a los días 0, 1 y 2 de almacenamiento a 10 °C.

MUESTRA	tiempo días	Salmonela	Salmonela / F1B
		control	
		Log UFC/g pollo	
SG S2	0	3,62±0,45 ab A	3,63±0,16 a A
	1	3,32±0,40 a A	3,47±0,68 a A
	2	4,74±0,37 c A	4,49±0,50 a A
SM S5	0	3,38±0,40 a A	3,59±0,34 a A
	1	2,65±0,49 a A	2,35±0,49 a A
	2	4,40±0,91 c A	3,98±1,20 a A

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos días para cada grupo de muestra (ANOVA+Tukey). Letras mayúsculas distintas en una misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en un mismo tiempo (test t).

Cuando se aplicó el test t para comparar las medias durante el almacenamiento respecto al día 0, se observó que los recuentos de *S. Glostrup ITA S2* tanto en el grupo control como en el grupo combinado con LP F1B (F1B/S2), tuvieron el mismo comportamiento: luego del primer día de almacenamiento a 10 °C los recuentos disminuyeron 0,30 y 0,21 log UFC/g respectivamente, aunque no significativamente, mientras que al segundo día de almacenamiento, los recuentos aumentaron a niveles superiores a los iniciales ($p=0,0205$ y $p=0,0474$; Fig. 4.22).

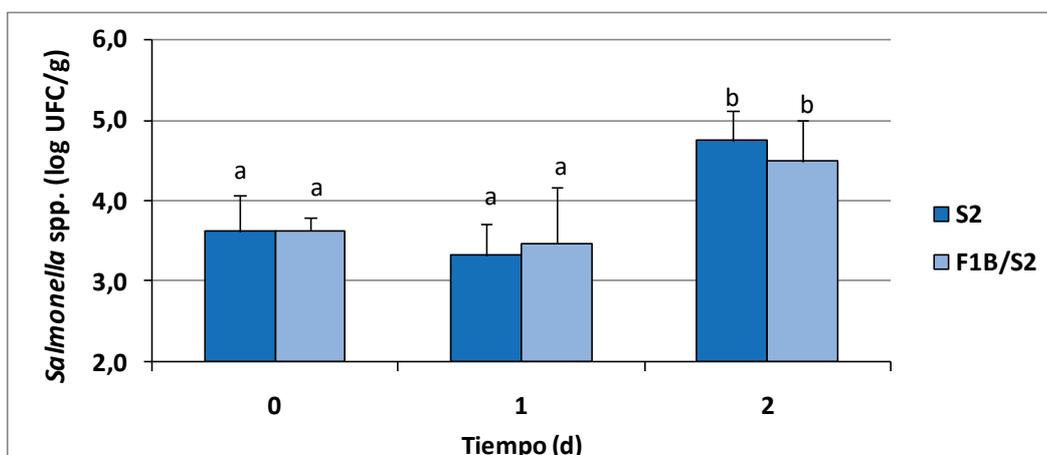


Figura 4.22. Recuentos de *Salmonella* Glostrup ITA S2 en pollo descontaminado almacenado a 10°C (promedio±SD). Para cada grupo, letras minúsculas diferentes a

las asignadas al día 0 indican diferencia significativa respecto al recuento inicial (test t; $p < 0,05$).

En el caso de *S. Montevideo* ITA S5 (Fig. 4.23), sus recuentos en el grupo control disminuyeron luego de 1 día de almacenamiento a 10 °C pero no significativamente (0,73 log UFC/g; $p=0,0746$), mientras que al segundo día los recuentos aumentaron a niveles superiores a los del día 0 ($p=0,0020$). Para el grupo combinado con LP F1B (F1B/S5) los recuentos de salmonela disminuyeron significativamente al cabo del primer día de almacenamiento a 10 °C (1,24 log UFC/g; $p=0,0418$), y volvieron a niveles similares a los iniciales en el segundo día. La disminución más pronunciada observada en los recuentos de la cepa indicadora al día 1 y la menor proliferación de SM S5 observada en el día 2, podrían indicar un efecto inhibitor de LP F1B frente a SM S5.

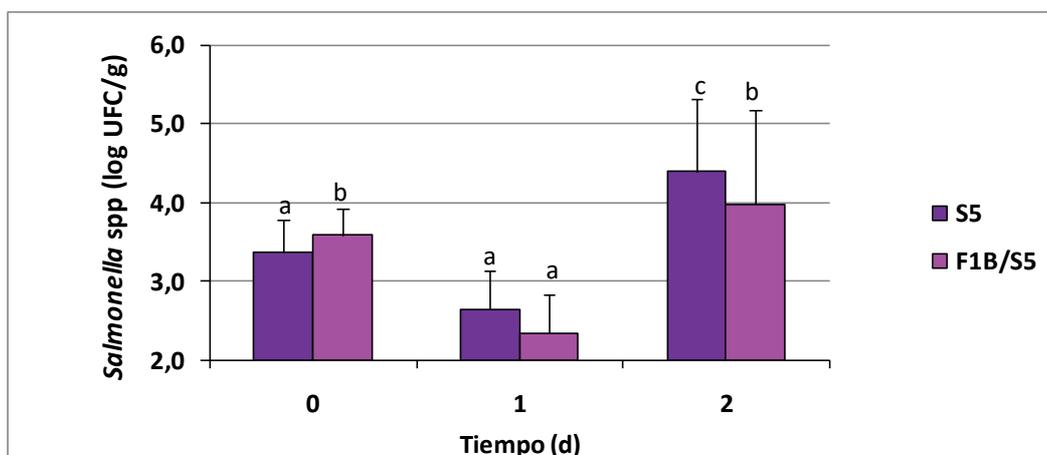


Figura 4.23. Recuentos de *Salmonella* Montevideo ITA S5 en pollo descontaminado almacenado a 10 °C (promedio \pm SD). Para cada grupo, letras minúsculas diferentes a las asignadas al día 0 indican diferencia significativa respecto al recuento inicial (test t; $p < 0,05$).

Finalmente, los recuentos de *Salmonella* spp. entre el grupo F1B/S2 y su control para cada uno de los puntos temporales fueron similares y no existieron diferencias significativas entre ellos. Para *S. Montevideo* ITA S5, si bien en los días 1 y 2 se observaron menores recuentos en presencia de LP F1B con respecto a los del control

(0,30 y 0,95 log UFC/g respectivamente), esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 4.24).

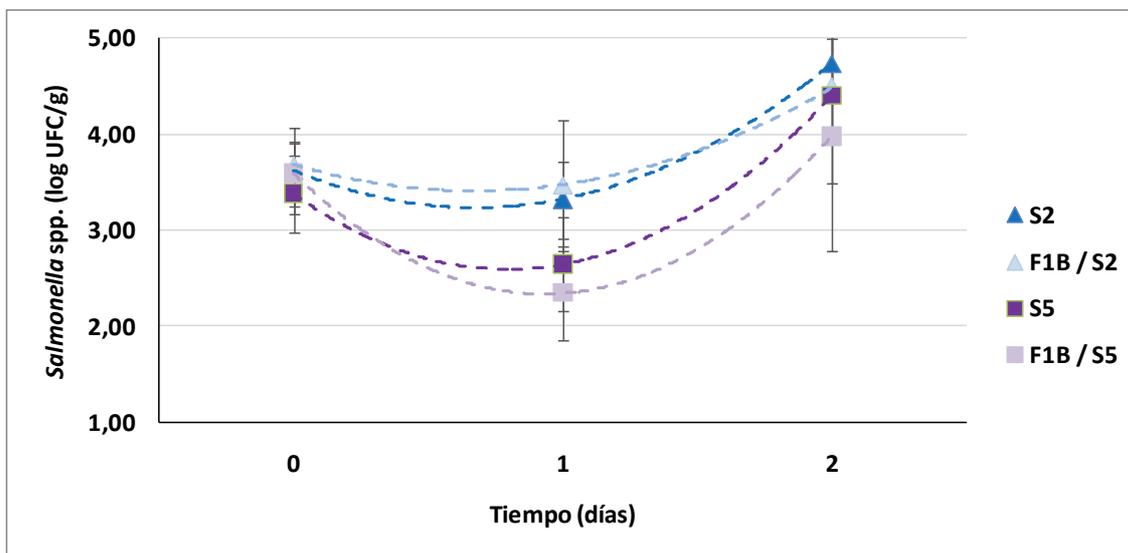


Figura 4.24. Recuentos de *Salmonella* spp. a los 0, 1 y 2 d en alitas de pollo descontaminadas almacenadas a 10 °C.

4.6.3. Comparación del comportamiento de *L. plantarum* F1B y *S. Montevideo* ITA S5 en cocultivos líquidos y en pollo descontaminado a 10 ° C

La capacidad inhibitoria de LP F1B sobre SM S5 observada en este ensayo coincide con los resultados obtenidos en el ensayo de cocultivos líquidos, a la misma temperatura de incubación (sección 4.5.1.2). En cocultivo con LP F1B en caldo MRS a 10 °C, se observó inhibición total de SM S5 mientras que en cocultivo con LP F1B en caldo TS, al igual que en pollo descontaminado y conservado a la misma temperatura, sólo se observó una disminución de los recuentos de SM S5. Esto puede deberse a que la concentración de glucosa libre en el medio es un factor crítico para la fermentación y producción de ácidos orgánicos por las BAL. A mayor disponibilidad del carbohidrato en el medio, mayor será la producción de ácidos orgánicos y más rápido descenderá el pH, logrando el efecto antagonista esperado. El medio MRS usado en el ensayo de cocultivos líquidos, contiene glucosa en forma de dextrosa (D-glucosa) en alta

concentración (20,0 g/L vs. 2,5 g/L en caldo TS), por lo tanto, es fácilmente utilizable por las bacterias presentes en el medio. Por el contrario, la carne de pollo contiene muy poca glucosa, gran parte en forma de glucógeno dentro de las células musculares, siendo poco disponible y de difícil metabolización (Morales y col., 2020). Como demostraron los recuentos de LP F1B en la carne de pollo descontaminada, la BAL no fue capaz de crecer durante los dos días de almacenamiento a 10 °C, si bien se mantuvo en niveles estables. A su vez, *Salmonella* Montevideo S5 fue aislada de carne de pollo. Es sabido que el entorno que rodea a un microorganismo contribuye a la expresión génica y a su adaptación al medio (Cases y col., 2003), por lo tanto, SM S5 probablemente es una cepa adaptada para sobrevivir y multiplicarse en este medio.

Otra diferencia entre cocultivo y el ensayo *in situ*, fue la variabilidad observada en los recuentos debido a la complejidad de la matriz alimentaria, tanto en su composición como en su microbiota. En este ensayo se aplicó un tratamiento de descontaminación para minimizar la interferencia de otros microorganismos. Aquellos microorganismos que sobrevivieron, con el paso del tiempo y a la temperatura de almacenamiento, encontraron las condiciones para su desarrollo. La inactivación incompleta de poblaciones microbianas puede aumentar los riesgos para la selección de cepas resistentes o adaptadas (Gálvez y col., 2010). Esto podría haber contribuido a la imposibilidad de realizar la lectura de los recuentos al día 4 de almacenamiento.

En base a los resultados obtenidos en esta sección, se seleccionó a *S.* Montevideo ITA S5 para inocularla en pollo fresco (no descontaminado) y evaluar si LP F1B presenta actividad antagonista en presencia de la diversidad de microorganismos naturalmente presentes en el mismo.

4.7. Evaluación *in situ* de la actividad antagonista de *L. plantarum* F1B sobre la microbiota nativa del pollo y frente a *Salmonella* Montevideo ITA S5

4.7.1. Determinación de las variables operativas para la aspersión de la suspensión de *L. plantarum* F1B en alitas de pollo

Para definir las condiciones a ser utilizadas en los ensayos en pollo fresco tratado con *L. plantarum* F1B por aspersión, se utilizó un diseño de Box Behnken cuyas variables fueron la concentración de LP F1B en la suspensión de aspersión y la relación peso de muestra / volumen de suspensión de aspersión. Como respuesta se utilizó la concentración de *L. plantarum* F1B en alitas de pollo. Los datos experimentales provenientes de la aplicación del diseño experimental se exponen en la Tabla 4.12.

Tabla 4.12. Concentraciones de *L. plantarum* F1B obtenidas en alitas de pollo para cada concentración de LP F1B en suspensión y relación peso de muestra/ volumen de suspensión.

Variables independientes			Respuesta
Corrida	Conc. LP F1B en suspensión (log UFC/ml)	Relación peso/volumen (g/ml)	Concentración de LP F1B en pollo (log UFC/g)
1	9	15	6,97
2	8	5	6,45
3	7	15	5,12
4	8	10	6,23
5	7	5	5,37
6	8	10	6,19
7	9	10	7,39
8	8	15	6,21
9	7	10	5,31
10	9	5	7,55

Los datos experimentales se ajustaron a una ecuación polinomial de 2° orden (Ecuación 2) y mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) se determinó la significancia de cada variable (Tabla 4.13).

$$\text{Rto BAL}_{\text{pollo}} = -1,76803 + 0,914645 * \text{conc. BAL}_{\text{sol}} + 0,0960548 * \text{rel. p/V} + 0,0166857 * (\text{conc. BAL}_{\text{sol}})^2 - 0,01627 * \text{conc. BAL}_{\text{sol}} * \text{rel. p/V} - 0,0000605714 * (\text{rel. p/V})^2 \quad (2)$$

Tabla 4.13. Análisis de varianza del modelo obtenido para la concentración de *L. plantarum* F1B en alitas de pollo en función de la concentración de *L. plantarum* F1B en la suspensión de aspersión y la relación peso de muestra / volumen de suspensión de aspersión.

Fuente de variación	G.L.	Suma de Cuadrados	
		Concentración de LP F1B en pollo	Valor P
A: Conc. de LP F1B en suspensión	1	6,22915	0,0000*
B: Relación peso/ vol	1	0,18709	0,0120*
AA	1	0,00064963	0,8096
AB	1	0,0264713	0,1758
BB	1	0,00000535048	0,9825
Error Total	4	0,0392348	
Coef. Determinación (R ²)		99,3948 %	

G.L: grados de libertad. *Indica diferencia significativa (p<0,05)

Ambas variables operativas estudiadas influyeron significativamente (p < 0,05) sobre la concentración de *L. plantarum* F1B en pollo, siendo la concentración de la suspensión la variable con mayor importancia (Fig. 4.25). Además, el valor R² indicó un buen ajuste del modelo, ya que explica más del 99 % de la variabilidad en la concentración de *L. plantarum* F1B en el pollo (Tabla 4.13).

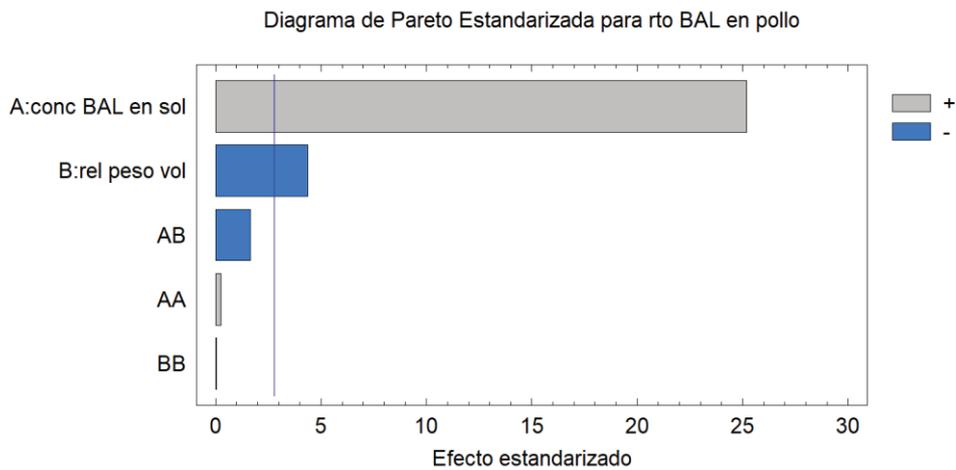


Figura 4.25. Diagrama de Pareto estandarizado para la variación de *L. plantarum* F1B en alitas de pollo.

La Ecuación 2 dio origen a la gráfica de superficie de respuesta que se observa en la Fig. 4.26. La concentración de *L. plantarum* F1B en pollo se maximiza cuando aumenta la concentración de LP F1B en la suspensión de aspersion y disminuye la relación peso de muestra /volumen de suspensión.

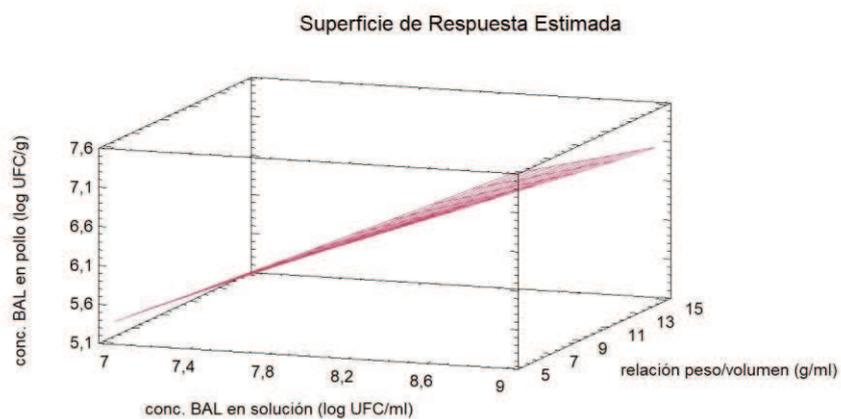


Figura 4.26. Gráfica de superficie de respuesta estimada para la variación de la concentración de LP F1B en pollo, en función de la relación peso de muestra/volumen y la concentración de LP F1B en suspensión.

Finalmente, se aplicó la función de Optimización de Respuesta para obtener el valor de cada variable independiente que maximiza los recuentos de LP F1B en pollo. Como resultante, la combinación de las variables operativas **concentración de LP F1B en suspensión de 9 log UFC/ml y relación peso de muestra/volumen de suspensión de 5 g/ml**, permitiría maximizar la concentración de *L. plantarum* F1B en el pollo, con un valor óptimo de 7,56 log UFC/g. Estas variables se seleccionaron para la aspersión de la suspensión de LP F1B en pollo fresco en los ensayos siguientes.

4.7.2. Ensayo de antagonismo de *L. plantarum* F1B como cultivo fresco (F1B CF) o liofilizado (F1B CL) sobre la microbiota nativa de carne de pollo fresca

Las alitas de pollo fueron inoculadas o no con las distintas suspensiones, de acuerdo al diseño experimental:

MP = Materia prima: alitas sin tratar;

C = Control: alitas tratadas con solución de maltodextrina al 2 % p/v;

F1B CF = alitas tratadas con suspensión *L. plantarum* F1B en formato cultivo fresco;

F1B CL = alitas tratadas con suspensión *L. plantarum* F1B en formato cultivo liofilizado.

Comportamiento de LP F1B en pollo fresco

Las suspensiones de inoculación de *L. plantarum* F1B en sus dos formatos, cultivo fresco y cultivo liofilizado, se prepararon como se detalla en la sección 3.8.2.

Los recuentos de BAL de dichas suspensiones se muestran en la Fig. 4.27.

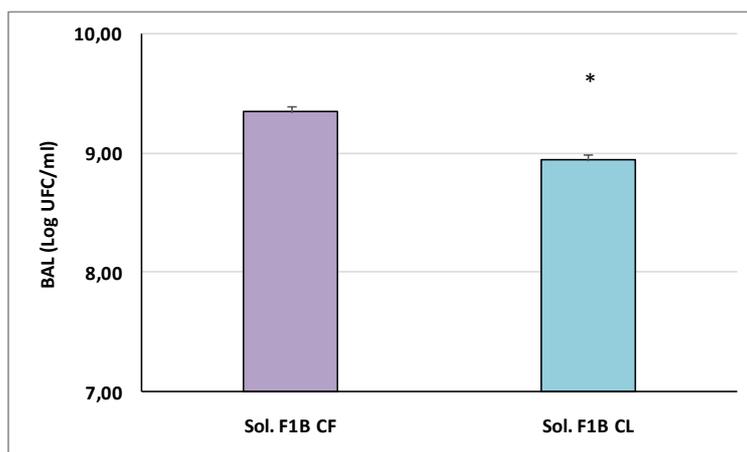


Figura 4.27. Recuentos de LP F1B en las suspensiones utilizadas para la aspersión de alitas de pollo frescas conservadas a 10 °C. *Diferencias significativas (test t; $p < 0,05$).

Se observaron diferencias significativas ($p=0,0145$) entre las concentraciones de las dos suspensiones de aspersión, con recuentos mayores en la suspensión cultivo fresco (9,35 log UFC/ml) respecto al formato cultivo liofilizado (8,94 log UFC/ml). Sin embargo, ambas concentraciones fueron cercanas a 9 log UFC/ml, la concentración de la suspensión de LP F1B arrojada por el diseño para maximizar los recuentos de la BAL en el pollo (sección 4.7.1).

Los recuentos de la BAL en pollo fresco almacenado a 10 °C se muestran para cada punto temporal en la Fig. 4.28. En cada día de muestreo se observó el mismo comportamiento. Los recuentos de BAL nativas presuntivas de la microbiota nativa del pollo en los grupos MP y C no presentaron diferencias significativas entre sí. A su vez, los recuentos de BAL en los grupos tratados con las suspensiones de aspersión de LP F1B en sus dos formatos tecnológicos (F1B CF y F1B CL) fueron similares entre sí y significativamente mayores que los recuentos en los grupos MP y C, como era esperable.

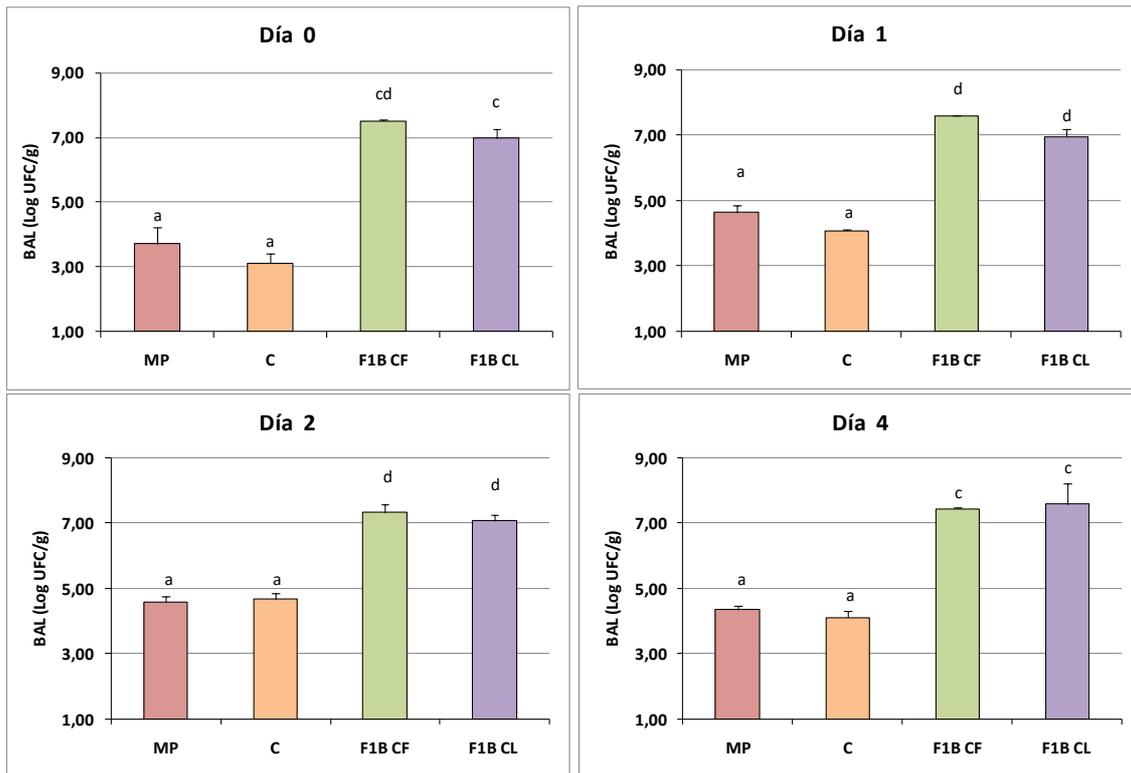


Figura 4.28. Recuentos de BAL en pollo fresco almacenado a 10 °C, por día de muestreo en los distintos grupos de muestras: MP=materia prima; C= control; F1B CF y F1B CL = LP F1B cultivo fresco y liofilizado. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA+Tukey; $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,005$; $p < 0,001$).

Cuando se analizó el comportamiento de cada grupo de muestras tratadas con LP F1B por separado, se observó que, tanto en las alitas tratadas con el cultivo en formato fresco como liofilizado, los recuentos de BAL se mantuvieron estables ($7,48 \pm 0,11$ y $7,15 \pm 0,30$ log UFC/g para F1B CF y F1B CL, respectivamente) durante todo el ensayo, sin detectarse diferencias significativas en el tiempo [Fig. 4.29 (a) y (b)]. Esto demuestra que, tal como sucedió en el ensayo de antagonismo *in situ* en carne de pollo descontaminada a 10 °C, *L. plantarum* F1B no fue afectado por la temperatura usada en este estudio.

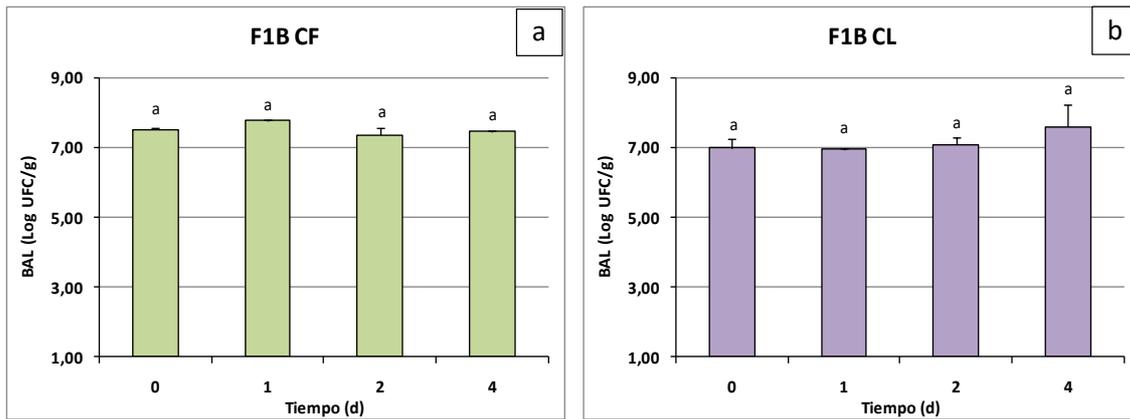


Figura 4.29. Recuentos de BAL en pollo fresco almacenado a 10 °C, para los grupos tratados con LP F1B cultivo fresco (F1B CF) y liofilizado (F1B CL). Letras distintas indican diferencias significativas en el tiempo (ANOVA+Tukey; $p < 0,05$).

Finalmente, se evaluó la influencia de la liofilización en la capacidad de LP F1B de mantenerse viable en el pollo. Cuando se compararon los recuentos de BAL entre los grupos F1B CF y F1B CL, no se observaron diferencias significativas debido al tratamiento tecnológico ni al tiempo de almacenamiento (Fig. 4.30). El recuento promedio global de LP F1B obtenido en las alitas de pollo fresco fue $7,32 \pm 0,23$ log UFC/g, cercano al valor óptimo predicho por el diseño ($7,56$ log UFC/g). Estos resultados indican que la liofilización no afectó la capacidad de LP F1B de mantenerse viable en las condiciones del ensayo, mostrando un comportamiento similar al del cultivo fresco.

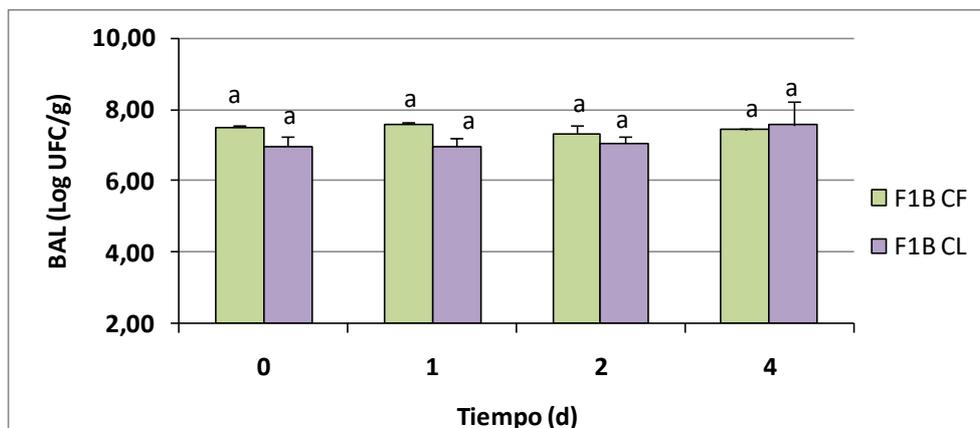


Figura 4.30. Comparación de recuentos de BAL a tiempo 0, 1, 2 y 4 d para los grupos de muestras F1B CF y F1B CL a 10 °C. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA+Tukey; $p < 0,05$).

La obtención de cultivos deshidratados con alto número de células viables y estabilidad al almacenamiento es un paso fundamental con vistas a la transferencia de un cultivo potencialmente biopreservante a la industria. La técnica más ampliamente utilizada para la comercialización de cultivos de BAL en la actualidad es la liofilización. En la actualidad, existen en el mercado empresas multinacionales que comercializan cultivos concentrados de cepas protectoras liofilizadas. Chr Hansen (Dinamarca) cuenta con un producto denominado *SAFEPRO*[®], compuesto por cepas de BAL liofilizadas que ayudan a prevenir el deterioro, prolongar la vida útil y mantener o mejorar la seguridad de alimentos frescos. Se presenta en varias versiones, incluso algunas específicamente para su uso en carne, salmón o ensaladas. Sacco System (Italia) ofrece la línea de cultivos protectores *4Protection* compuesto por bacterias lácticas, para la protección de productos cárnicos y embutidos, entre otros alimentos. Los productos para aplicación en industria cárnica pueden utilizarse mediante inoculación directa o para el tratamiento de superficies y están principalmente destinados a prevenir y combatir la contaminación de los productos por *Listeria monocytogenes* gracias a dos mecanismos de acción: la producción de bacteriocinas (*Carnobacterium*) o la competición bacteriana (*Lactobacillus sakei*). La cepa LP F1B demostró ser una cepa robusta, obteniéndose luego de la liofilización un cultivo deshidratado con elevada sobrevida (10,92 log UFC/g) y actividad acuosa satisfactoria ($a_w=0,047\pm 0,001$). Además, el empleo de maltodextrina al 15 % fue efectivo como protector durante la liofilización y durante el almacenamiento de los cultivos liofilizados (resultados no mostrados). Estos resultados son alentadores ya que apoyan la factibilidad de aplicar este proceso a la cepa en estudio, con vistas a una potencial transferencia.

Efecto de LP F1B sobre microorganismos aerobios mesófilos totales (AMT)

Los valores de los recuentos de AMT en los distintos grupos de muestras de pollo durante el almacenamiento a 10 °C se muestran para cada punto temporal en la Fig. 4.31.

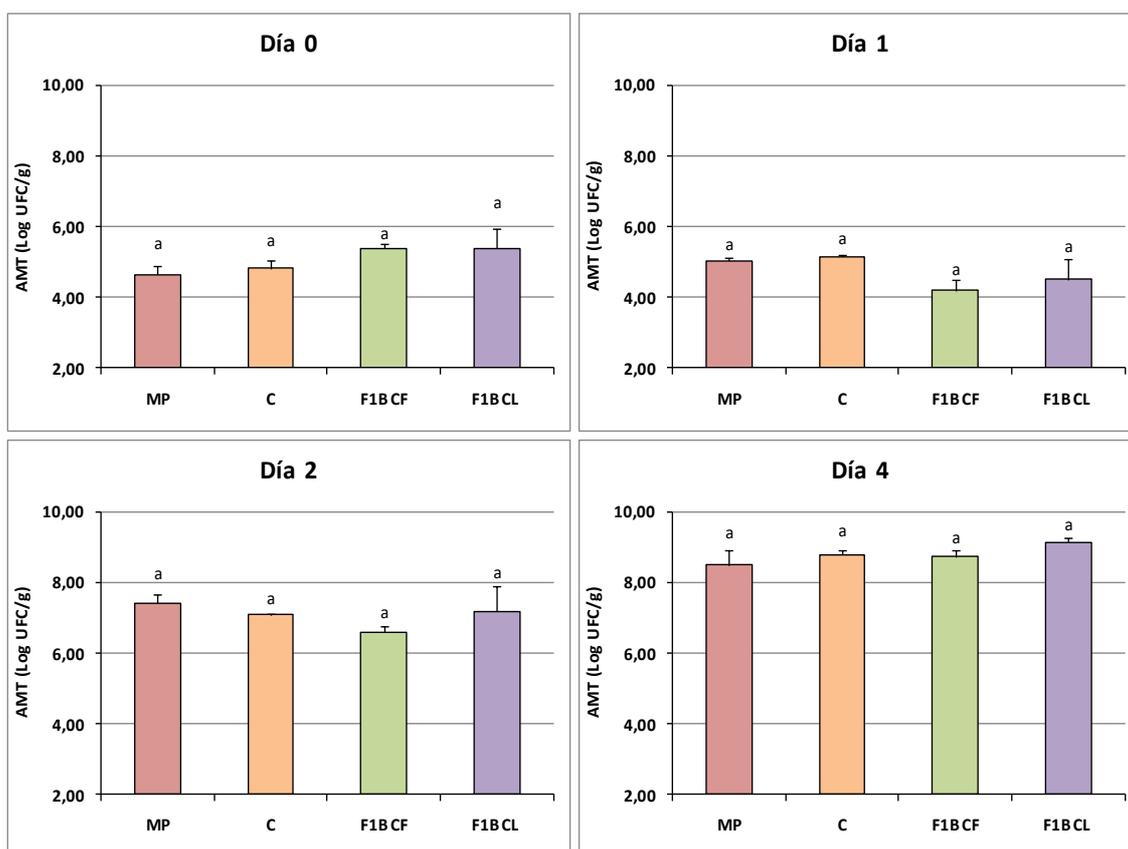


Figura 4.31. Recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales (AMT) en pollo fresco almacenado a 10 °C, por día de muestreo en los distintos grupos de muestras: MP=materia prima; C= control; F1B CF y F1B CL = LP F1B cultivo fresco y liofilizado. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA+Tukey; $p < 0,05$).

Para cada día de muestreo, los recuentos de AMT fueron similares entre los cuatro grupos de muestras (ANOVA+Tukey). En particular, en los días 1 y 2 se observó una disminución significativa en los recuentos de AMT del grupo F1B CF respecto a los del grupo MP (test t, $p=0,0424$ y $p=0,0218$ para los días 1 y 2, respectivamente).

Cuando se analizó el comportamiento de cada grupo de muestras por separado a través del tiempo, se observó que los recuentos de AMT en el grupo MP y C tuvieron el mismo comportamiento. No hubo diferencias significativas entre los recuentos iniciales

y los del día 1, mientras que en los días de muestreo posteriores se observaron valores significativamente más elevados (Fig. 4.32).

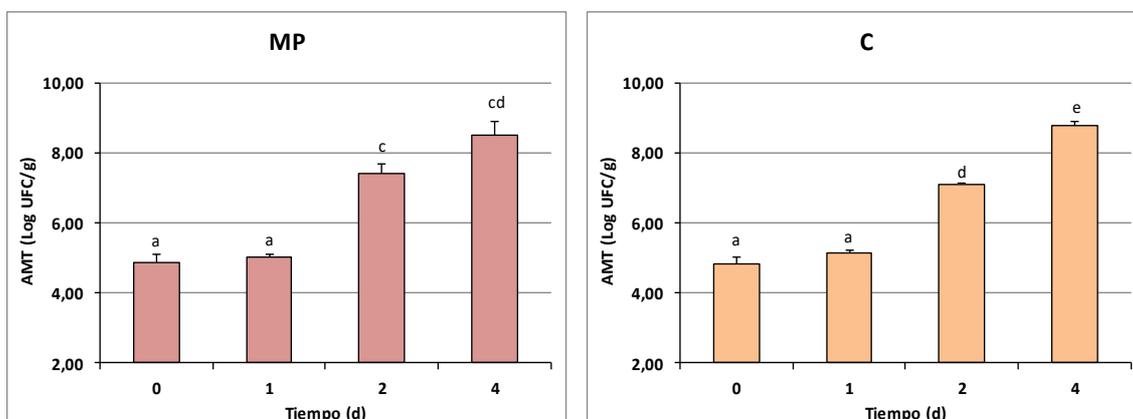


Figura 4.32. Recuentos de AMT en pollo fresco almacenado a 10 °C, para los grupos MP y C. Letras distintas indican diferencias significativas en el tiempo (ANOVA+Tukey; $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,005$; $p < 0,001$).

En los recuentos de AMT de los grupos de muestras tratadas por aspersión con las suspensiones de LP F1B en sus dos formatos tecnológicos, se observaron niveles más bajos en el día 1 respecto a sus cargas iniciales respectivas. Sin embargo, esto sólo fue estadísticamente significativo para el grupo F1B CF. En el día 2 los niveles de AMT retornaron a valores similares a los iniciales para ambos grupos, mientras que al día 4 los valores se elevaron significativamente (Fig. 4.33).

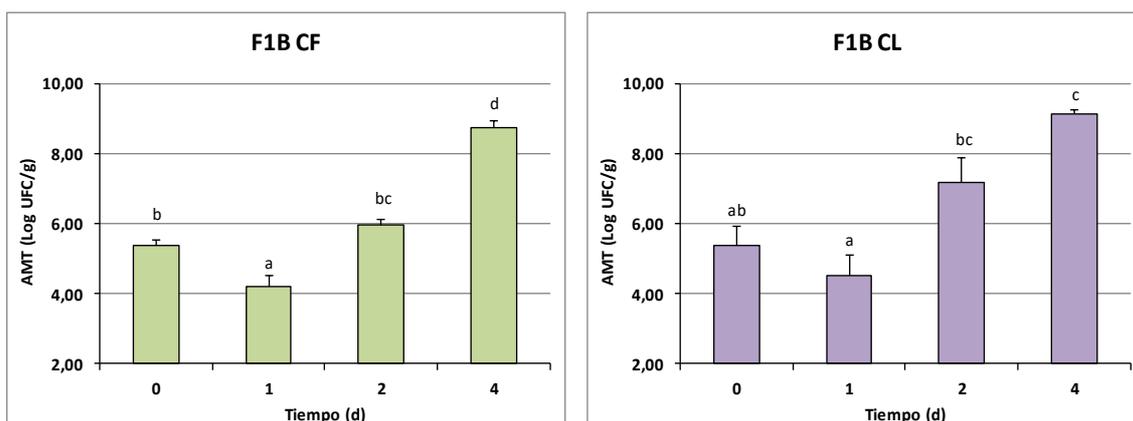


Figura 4.33. Recuentos de AMT en pollo fresco almacenado a 10 °C, para los grupos tratados con LP F1B cultivo fresco (F1B CF) y liofilizado (F1B CL). Letras distintas indican diferencias significativas en el tiempo (ANOVA+Tukey; $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,005$; $p < 0,001$).

Efecto de LP F1B sobre Enterobacterias

Los recuentos de Enterobacterias en los distintos grupos de muestras de pollo durante el almacenamiento a 10 °C se muestran para cada punto temporal en la Fig. 4.34.

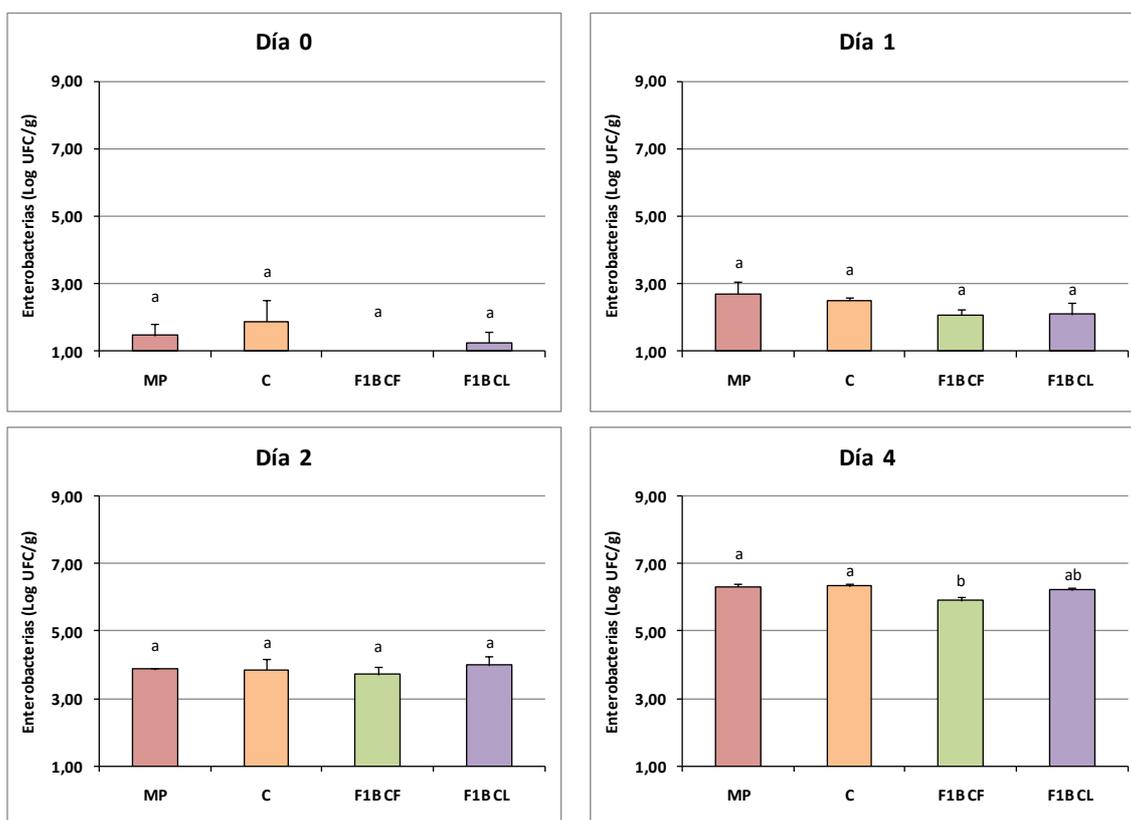


Figura 4.34. Recuento de Enterobacterias en pollo fresco almacenado a 10 °C, por día de muestreo, en los distintos grupos de muestras: MP=materia prima; C= control; F1B CF y F1B CL = LP F1B cultivo fresco y liofilizado. Letras distintas indican diferencias significativas entre grupos (ANOVA+Tukey; $p < 0,05$).

Para los días 0 y 1, los valores de recuento de todos los grupos de muestras se mantuvieron cercanos al límite de detección de la técnica empleada y sin diferencias significativas entre sí. Sólo en el día 4 se observaron diferencias significativas en los niveles de Enterobacterias, con menor concentración en las muestras tratadas con cultivo fresco de F1B respecto a los grupos MP y C, mientras que para las muestras F1B CL se encontraron valores intermedios al resto de los grupos. Respecto a los recuentos

de Enterobacterias en cada grupo, estos tuvieron comportamientos similares, aumentando significativamente durante el almacenamiento.

Efecto de LP F1B sobre *Pseudomonas* spp.

Los recuentos de *Pseudomonas* spp. en los distintos grupos de muestras de pollo durante el almacenamiento a 10 °C se muestran para cada punto temporal en la Fig. 4.35.

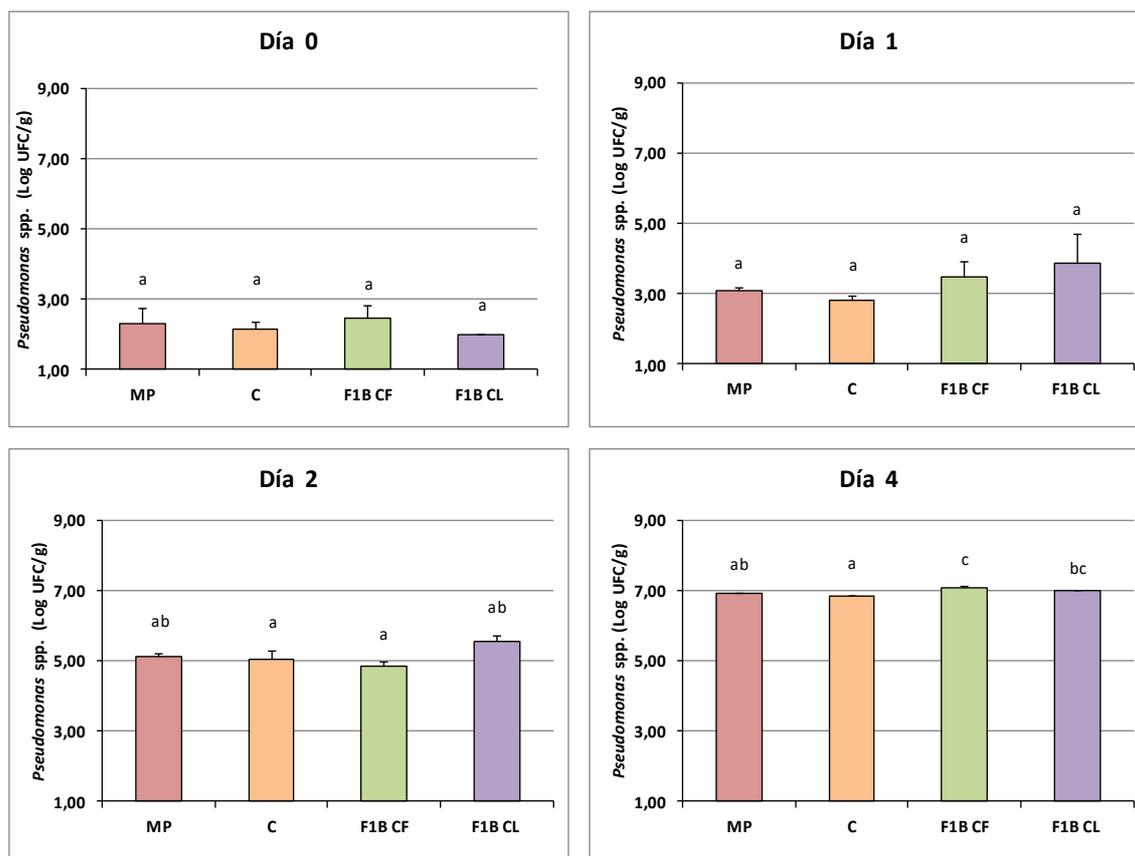


Figura 4.35. Recuento de *Pseudomonas* spp. en pollo fresco almacenado a 10 °C, por día de muestreo, en los distintos grupos de muestras: MP=materia prima; C= control; F1B CF y F1B CL = LP F1B cultivo fresco y liofilizado. Letras distintas indican diferencias significativas entre grupos (ANOVA+Tukey; p<0,05).

En los días 0, 1 y 2 se observaron recuentos similares de *Pseudomonas* spp. en los cuatro grupos. Finalmente, en el día 4 se observaron niveles similares entre las muestras tratadas con ambas suspensiones de aspersión de F1B, mayores a los detectados para MP y C ($p<0,05$). Por otro lado, los recuentos de *Pseudomonas* spp. en cada grupo tuvieron comportamientos similares, aumentando significativamente durante el almacenamiento.

Efecto de LP F1B sobre APT

Los valores de recuentos de aerobios psicrótrofos totales en los distintos grupos de muestras de pollo durante el almacenamiento a 10 °C se muestran para los días 0 y 1 en la Fig. 4.36.

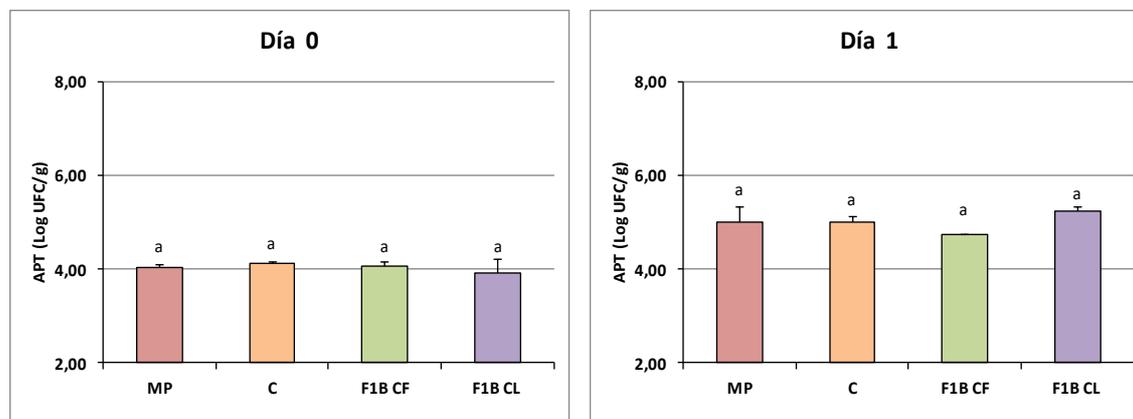


Figura 4.36. Recuentos de microorganismos aerobios psicrótrofos totales (APT) en pollo fresco almacenado a 10 °C, por día de muestreo en los distintos grupos de muestras: MP=materia prima; C= control; F1B CF y F1B CL = LP F1B cultivo fresco y liofilizado. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA+Tukey; $p < 0,05$).

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de APT al día 1 con respecto a los niveles iniciales. En los días 2 y 4 se observaron valores superiores a 7 log UFC/g en todos los grupos de muestras. Por otro lado, los recuentos de APT en cada uno de los grupos tuvieron comportamientos similares, con niveles crecientes en función del tiempo.

El deterioro de la carne de pollo se debe principalmente al crecimiento de bacterias alterantes en su superficie, incluso a temperaturas de refrigeración. Estas bacterias durante su metabolismo producen limo y compuestos volátiles detectables por los sentidos del olfato y el gusto. *Pseudomonas* spp. ha sido reportada como el principal género responsable de la alteración en carne de pollo fresca envasada en condiciones aerobias. Es una bacteria psicrótrofa que presenta tiempos de generación más cortos que otros microorganismos presentes en los alimentos frescos. Predominan en alimentos frescos conservados en refrigeración si los valores de pH y a_w le son favorables como

en la carne de pollo (Morales y col., 2020). Su actividad proteolítica y lipolítica genera una gran cantidad de metabolitos sensorialmente desagradables y la alteración puede detectarse cuando la población microbiana alcanza alrededor de 7 – 8 log UFC/g (ICMSF, 2001). Otras bacterias que pueden estar presentes en la carne de pollo deteriorada en ambientes con oxígeno, son las Enterobacterias cuya importancia radica en que, en productos frescos de origen animal, son indicadores de contaminación de origen fecal y las BAL. Sin embargo, cuando la conservación se lleva a cabo en atmósfera modificada o al vacío con film de baja permeabilidad al oxígeno, predominan *Brochothrix thermosphacta* y las BAL.

En este ensayo se observó un efecto antagonista de LP F1B en su formato fresco sobre los recuentos de aerobios mesófilos totales. Se obtuvieron niveles más bajos en el día 1 respecto a su carga inicial (- 1,2 log UFC/g). Luego, los niveles de aerobios mesófilos totales retornaron a valores similares a los iniciales en el día 2, mientras que al día 4 los valores se elevaron significativamente. No se observó antagonismo entre la BAL en estudio y *Pseudomonas* spp. y el recuento de aerobios psicrótrofos totales. Esta similitud era esperable ya que del total de APT en carne de pollo, un alto porcentaje pertenecen al género *Pseudomonas* spp. El recuento al día 4 de *Pseudomonas* spp. llegó a valores cercanos a los 7 log UFC/g en todos los grupos, evidenciando el deterioro microbiológico de la carne, además una marcada reducción de la calidad organoléptica de la misma (principalmente olor desagradable). El recuento de Enterobacterias no se vio afectado por la presencia de LP F1B en ninguno de sus formatos tecnológicos. Morales y col. (2020) ensayaron en carne de pollo almacenada a 8 °C, el efecto antagonista de una cepa de BAL nativa *L. sakei* 63 frente a *Pseudomonas* spp. y Enterobacterias. Observaron el antagonismo en ambos grupos bacterianos a partir del día 2 y hasta el día 4 con una reducción en los recuentos de aproximadamente 2 log

UFC/cm². Mientras que, en el grupo control, observaron el deterioro de la carne de pollo evidenciado por los niveles de recuento mayores a 7,5 log UFC/cm², pero también por las características organolépticas (principalmente olor). En este mismo estudio, remarcaron que el pollo tratado con *L. sakei* 63 presentó un aroma más ácido similar a la manteca, en conjunto con limo superficial, pero que no fue motivo de rechazo por personal no entrenado y, por lo tanto, podría no ser un problema para el consumidor habitual. Castellano y col. (2010) informan un olor similar en carne de vacuno biopreservada con BAL, y coincidieron en que no es rechazable para un panel de expertos. Se describe que las BAL en carne fresca producen un proceso de fermentación suave que no produce variaciones organolépticas evidentes, debido al bajo contenido de carbohidratos y fuerte capacidad buffer de la carne (Favaro y Todorov, 2017). Cho y col. (2010) en el ensayo de antagonismo *in situ* en carne de pavo fresca a 10 °C observaron que *L. plantarum* BFE 5092 no ejerció ningún efecto inhibitor sobre los AMT, Enterobacterias y mohos y levaduras durante los 8 d que duró el ensayo.

4.7.3. Ensayo de antagonismo de *L. plantarum* F1B como cultivo fresco o liofilizado frente a *S. Montevideo* ITA S5 en carne de pollo fresca

En este ensayo, todos los grupos fueron contaminados con *S. Montevideo* ITA S5 previo a recibir su tratamiento de acuerdo al diseño experimental:

MPS = alitas inoculadas con SM S5, sin tratamiento posterior;

CS = control: alitas inoculadas con SM S5 + aspersion c/solucion de maltodextrina 2 %;

F1B CF/S = alitas inoculadas con SM S5 + aspersion c/suspension LP F1B (9 log UFC/ml) en formato cultivo fresco;

F1B CL/S = alitas inoculadas con SM S5 + aspersion c/suspension LP F1B (9 log UFC/ml) en formato cultivo liofilizado.

Comportamiento de LP F1B en pollo fresco

Al igual que sucedió en el ensayo anterior (sección 4.7.2), los recuentos de *L. plantarum* F1B en las suspensiones cultivo fresco y cultivo liofilizado presentaron diferencias significativas ($p=0,0491$, test t), siendo mayor la concentración de F1B CF. Sin embargo, esto no afectó la concentración inicial alcanzada para ambos formatos en la carne de pollo fresca. Los recuentos de BAL en los distintos grupos de muestras durante el almacenamiento a 10 °C se muestran la Tabla 4.14.

Tabla 4.14. Recuentos de BAL en los distintos grupos de muestras a los 0, 1, 2 y 4 d de almacenamiento a 10 °C.

MUESTRA	tiempo	BAL
	días	Log UFC/g pollo
MPS	0	3,27±0,12 a
	1	3,34±0,09 a
	2	4,24±0,00 c
	4	5,48±0,00 d
CS	0	3,12±0,07 a
	1	3,20±0,05 a
	2	4,17±0,08 c
	4	5,48±0,00 d
F1B CF/S	0	7,55±0,32 a
	1	7,58±0,02 a
	2	7,21±0,12 a
	4	7,72±0,20 a
F1B CL/S	0	7,22±0,16 a
	1	7,17±0,18 a
	2	7,05±0,03 a
	4	7,32±0,05 a

Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre los distintos días para cada grupo de muestra por ANOVA + Tukey.

Cuando se analizó el comportamiento de cada grupo de muestras a través del tiempo se observó que los recuentos de BAL nativas presuntivas en los grupos MPS y CS tuvieron el mismo comportamiento. Como se observa en la Fig. 4.37, en el día 1 de almacenamiento a 10 °C los recuentos de BAL nativas presuntivas fueron similares a los recuentos iniciales, mientras que en los días siguientes de muestreo se observó que las concentraciones de las BAL propias de la microbiota del pollo fueron aumentando en función del tiempo ($p < 0,05$).

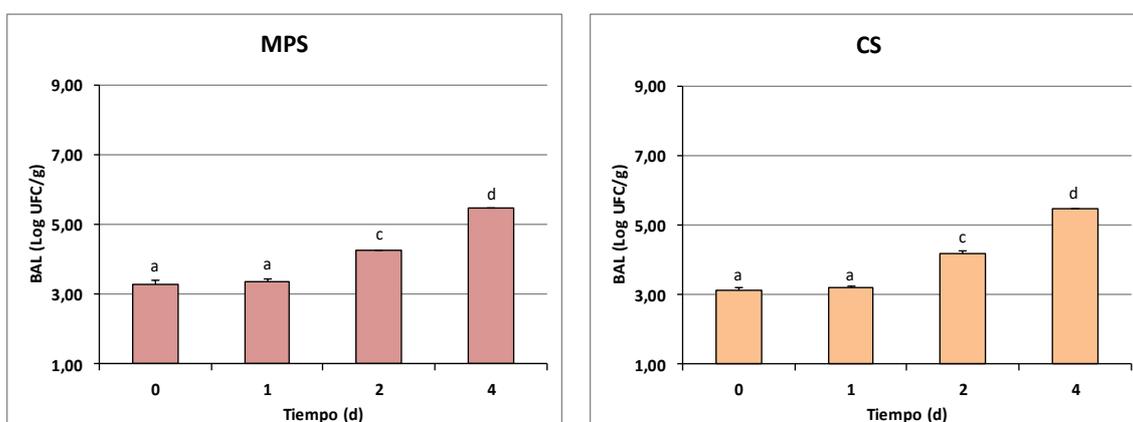


Figura 4.37. Recuentos de BAL en pollo fresco almacenado a 10 °C para los grupos MPS=materia prima+SM S5 y CS= control+SM S5; a través del tiempo. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA+Tukey; $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,005$; $p < 0,001$).

En los grupos de muestras tratadas con las suspensiones de aspersión de LP F1B en ambos formatos, F1B CF/S y F1B CL/S, los recuentos de BAL se mantuvieron estables en el pollo fresco durante todo el tiempo del ensayo (Fig. 4.38). Tal como sucedió en el ensayo de antagonismo *in situ* en carne de pollo descontaminada a 10°C, *L. plantarum* F1B no fue afectado por la temperatura de refrigeración ni por la presencia de salmonela.

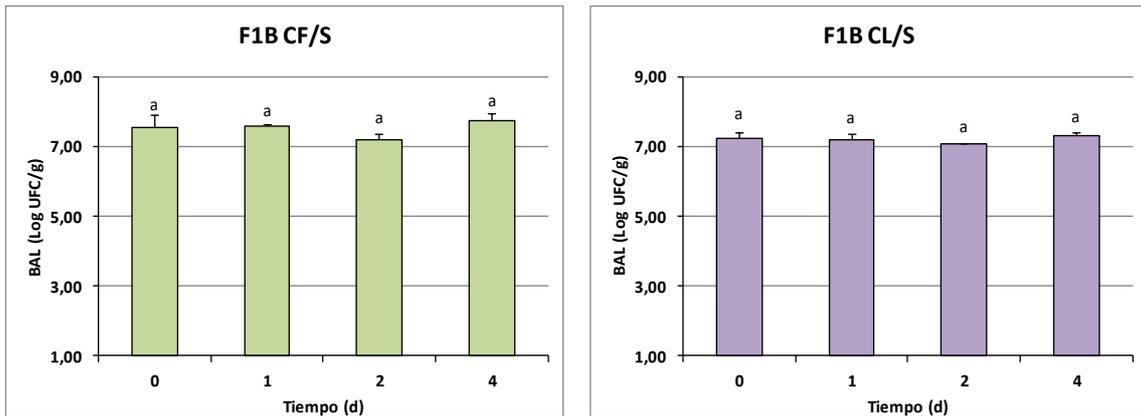


Figura 4.38. Recuentos de BAL en pollo fresco almacenado a 10 °C, para los grupos contaminados con SM S5 y tratados con LP F1B cultivo fresco (F1B CF/S) y liofilizado (F1B CL/S). Letras distintas indican diferencias significativas en el tiempo (ANOVA+Tukey; $p < 0,05$).

Para evaluar el comportamiento de los recuentos de BAL entre los distintos grupos, se compararon los recuentos para cada día de muestreo (Figura 4.39).

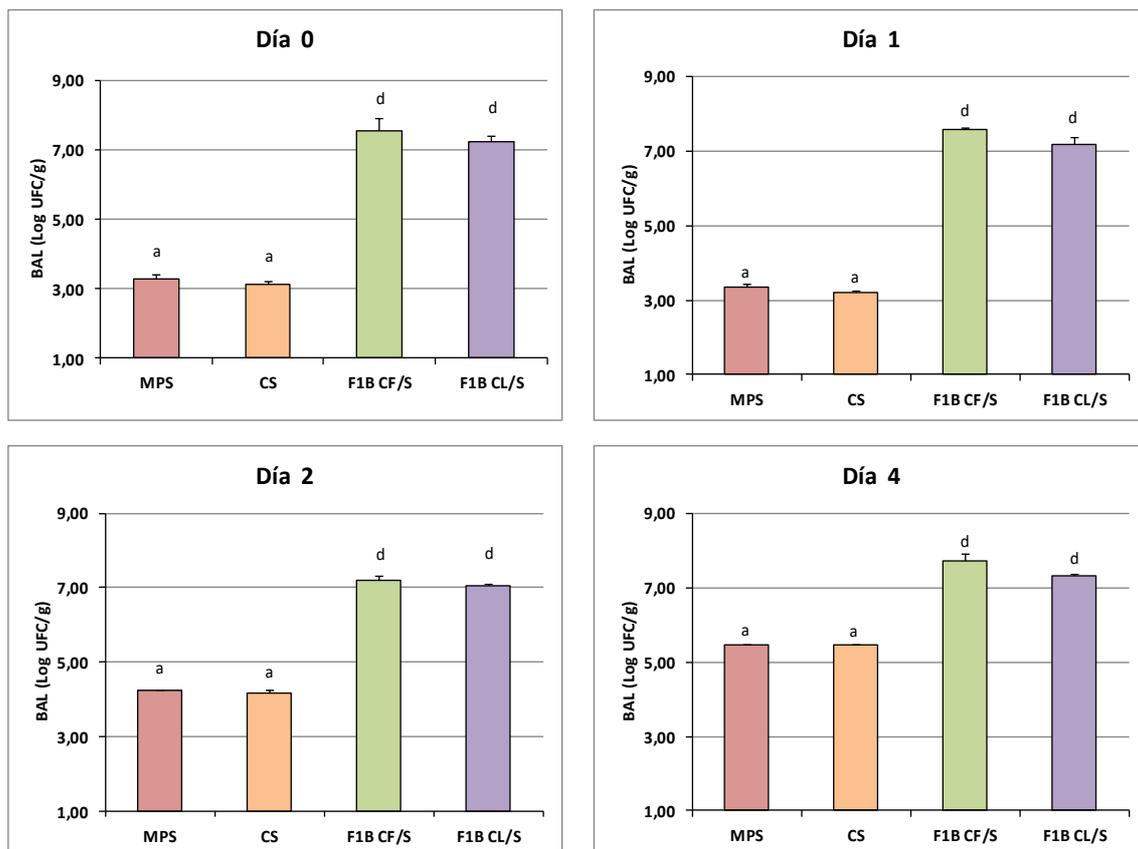


Figura 4.39. Recuentos de BAL en pollo fresco almacenado a 10 °C, por día de muestreo en los distintos grupos contaminados con SM S5: MPS= materia prima; CS = control; F1B CF/S y F1B CL/S = LP F1B cultivo fresco y liofilizado. Letras distintas indican diferencias significativas en el tiempo (ANOVA+Tukey; $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,005$; $p < 0,001$).

Cada día de muestreo, los recuentos de las BAL nativas presuntivas en los grupos MPS y CS no presentaron diferencias significativas entre sí, indicando que la maltodextrina con la que se trató al grupo control no influyó en la población láctica de la microbiota nativa. Por otro lado, los recuentos de BAL en los grupos tratados con las suspensiones de aspersión de LP F1B en sus dos formatos tecnológicos (F1B CF/S y F1B CL/S) no presentaron diferencias significativas entre sí, y como era esperable, ambos recuentos fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) que los recuentos en los grupos MPS y CS. Esto demuestra que la liofilización no afectó la capacidad de LP F1B de mantenerse viable en el pollo durante la duración del ensayo.

Efecto de LP F1B sobre *Salmonella* Montevideo ITA S5

Los recuentos de *S. Montevideo* ITA S5 en cada grupo de muestras durante el almacenamiento a 10 °C se muestran en la Tabla 4.15. Cuando se analizó el comportamiento de cada grupo de muestras por separado a través del tiempo, se observó que los recuentos de *Salmonella* spp. en el grupo sin tratamiento (MPS) se mantuvieron estables entre el día 0 y el día 2, para finalmente aumentar significativamente en el último día de almacenamiento. De modo diferente, en el grupo control (CS) los recuentos de *Salmonella* spp. presentaron una disminución significativa entre el día 0 y 1, para luego volver hasta niveles similares a los iniciales en el día 2. Finalmente, al día 4 se observó un aumento significativo de los recuentos (Fig. 4.40).

Tabla 4.15. Recuentos de SM ITA S5 en las distintas muestras de pollo fresco a los 0, 1, 2 y 4 d de almacenamiento a 10 °C.

MUESTRA	tiempo	SM ITA S5
	días	Log UFC/g pollo
MPS	0	5,46±0,02 ab
	1	4,32±0,18 a
	2	4,97±0,68 ab
	4	6,77±0,24 c
CS	0	5,20±0,10 d
	1	3,83±0,11 a
	2	5,01±0,15 cd
	4	7,34±0,06 g
F1B CF/S	0	5,37±0,08 c
	1	4,28±0,11 a
	2	4,40±0,08 a
	4	6,84±0,18 f
F1B CL/S	0	5,45±0,04 c
	1	3,85±0,04 a
	2	4,32±0,11 ab
	4	6,45±0,34 d

Letras distintas dentro de un mismo grupo indican diferencias significativas entre los distintos días (ANOVA+Tukey; $p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,005$; $p<0,001$).

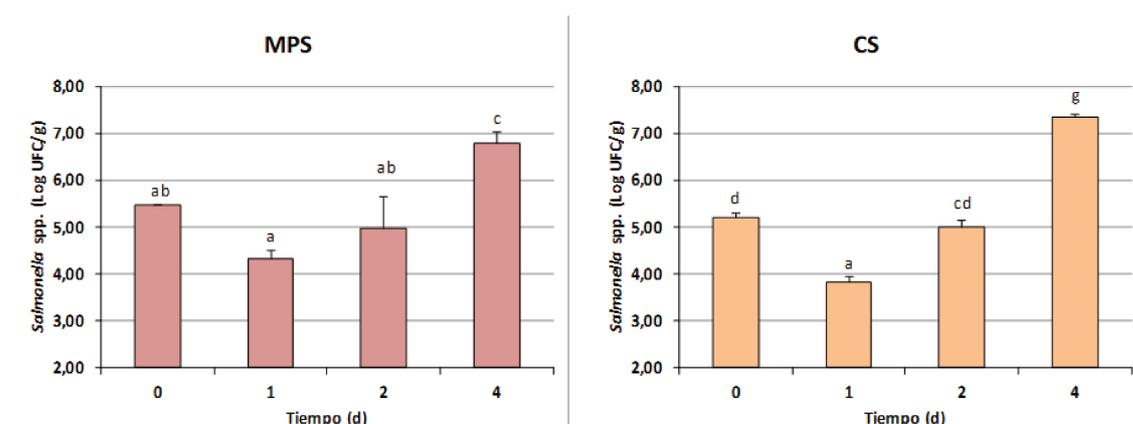


Figura 4.40. Recuentos de *Salmonella* spp. en pollo fresco almacenado a 10 °C para los grupos MPS=materia prima+SM S5 y CS= control+SM S5; a través del tiempo. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA+Tukey; $p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,005$; $p<0,001$).

Finalmente, los recuentos de *Salmonella* spp. en los grupos de muestras tratadas con las suspensiones de aspersión de LP F1B en sus dos formatos tecnológicos (F1B CF/S y F1B CL/S) se muestran en la Fig 4.41.

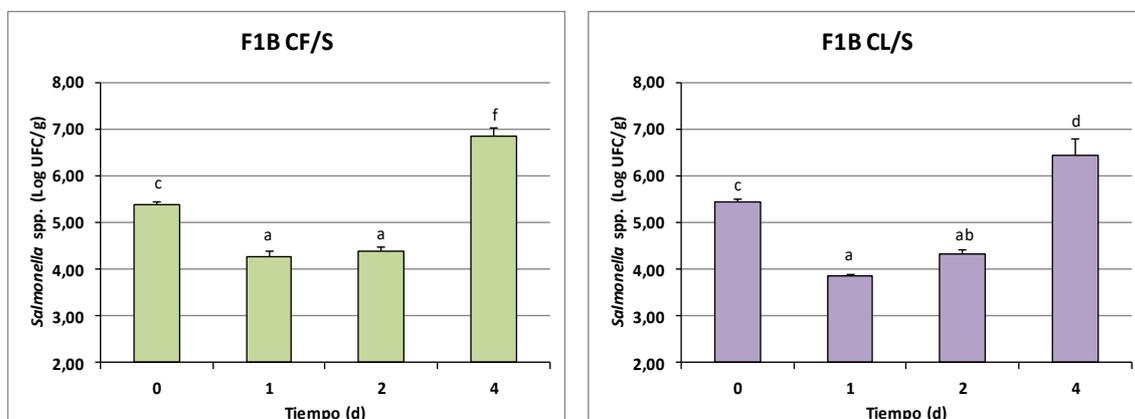


Figura 4.41. Recuentos de *Salmonella* spp. en pollo fresco contaminado con SM S5 + aspersión con susp. LP F1B cultivo fresco (F1B CF/S) y liofilizado (F1B CL/S), almacenado a 10 °C. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA+Tukey; $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,005$; $p < 0,001$).

Los recuentos de *Salmonella* spp. mostraron el mismo comportamiento ante la aplicación de LP F1B tanto en forma de cultivo fresco como liofilizado. Se observó que a los días 1 y 2 de almacenamiento a 10°C los niveles disminuyeron significativamente respecto a los inoculados inicialmente ($p < 0,05$) y, hacia el final del almacenamiento (t=4), se produjo un aumento significativo en los recuentos. Estos resultados indicarían el efecto protector del cultivo de LP F1B. Sin embargo, para dilucidar si los menores recuentos de *Salmonella* spp., podrían deberse a la acción de la BAL u otros factores, se decidió evaluar el comportamiento de SM S5 entre los distintos grupos, para cada día de muestreo (Fig. 4.42).

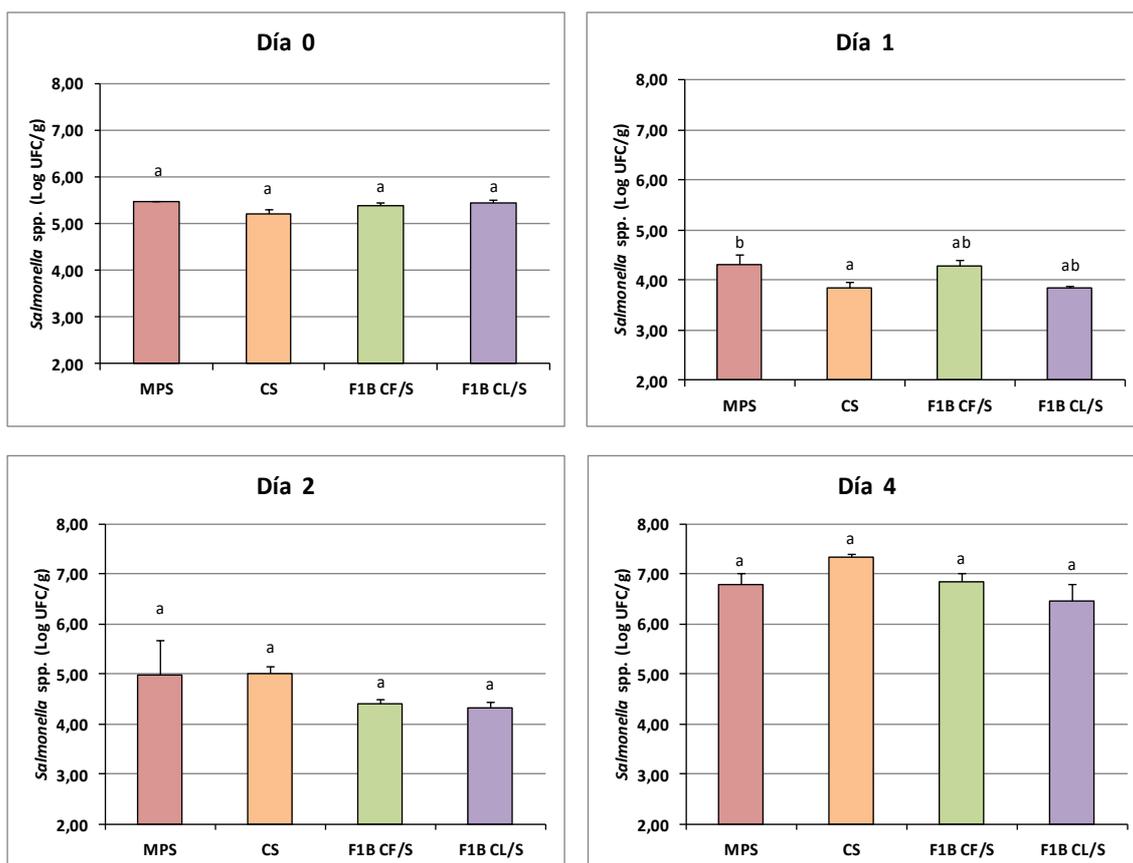


Figura 4.42. Recuentos de *Salmonella* spp. en pollo fresco contaminado con SM S5 y almacenado a 10 °C, según día de muestreo. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA+Tukey; $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,005$; $p < 0,001$).

El día de la contaminación controlada con SM S5, se observaron niveles similares en los recuentos de los cuatro grupos de muestras, es decir que todos los grupos comenzaron el ensayo con la misma concentración de la cepa indicadora. Al día 1 de almacenamiento a 10 °C se observaron niveles menores de recuento en todos los grupos tratados por aspersión respecto a la materia prima (MPS), si bien esta disminución fue solamente significativa para el grupo control (CS). Esto podría indicar un “efecto” del procedimiento de aspersión con las suspensiones. En los días 2 y 4, los grupos tratados con F1B (F1B CF/S y F1B CL/S) mantuvieron la tendencia a mostrar menores concentraciones de salmonela, si bien no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los formatos tecnológicos evaluados de F1B y los

grupos MPS y CS. Para evaluar si existió efectivamente un “efecto” del procedimiento de aspersión ocasionado por la pulverización de las alitas de pollo, se comparó estadísticamente a cada tiempo, las muestras tratadas con solución de maltodextrina (CS) con las muestras tratadas con las suspensiones de LP F1B en sus dos formatos tecnológicos (test t). En el primer día de almacenamiento, el análisis estadístico mostró que el efecto inhibitorio pudo deberse a un efecto de la pulverización con las suspensiones tratantes, ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos CS, F1B CF/S y F1B CL/S. Sin embargo, el efecto inhibitorio se perpetuó en el 2º día sólo para los grupos tratados con la LP F1B (Fig. 4.43) respecto al grupo control (CS), detectándose diferencias significativas entre los recuentos de salmonela en el grupo CS y los tratados con F1B CF ($p=0,0377$) y F1B CL ($p=0,0332$).

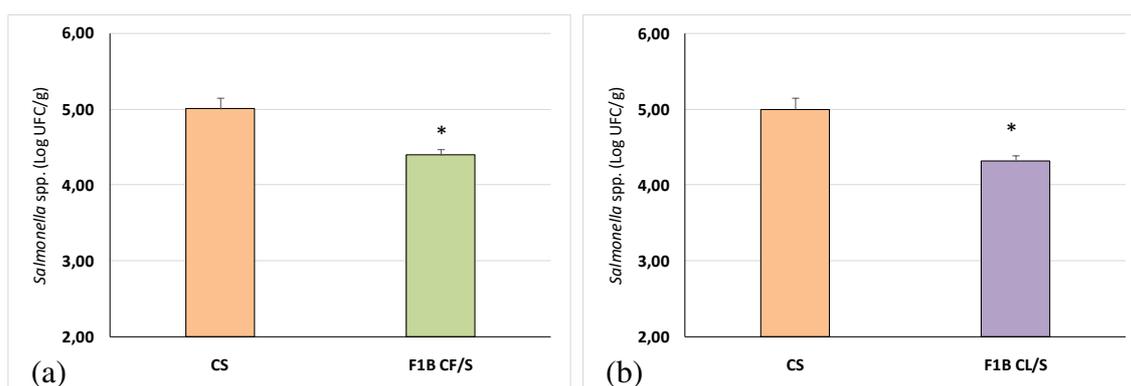


Figura 4.43. Comparación de los recuentos de *Salmonella* spp. al día 2 a 10°C entre el grupo CS y (a) el grupo F1B CF, o (b) el grupo F1B CL.*diferencias significativas (test t; $p<0,05$).

En el día 4 también se observaron disminuciones en los recuentos de salmonela cuando se comparó el grupo CS con ambos grupos tratados con LP F1B. Las disminuciones en el recuento de salmonela alcanzaron valores de 0,5 y 0,9 log UFC/g para F1B CF y F1B CL respectivamente ($p=0,054$ y $p=0,0691$). Este análisis permitió distinguir entre el efecto o estrés ocasionado por la aspersión sobre la población de *Salmonella* spp., del posible efecto inhibitorio de LP F1B. Los resultados podrían indicar que existió un efecto antagonista de LP F1B en sus dos formatos tecnológicos frente a

SM S5 durante el almacenamiento a 10°C, independientemente de un posible efecto por la aspersión.

El efecto protector de un cultivo de BAL también fue estudiado por Maragoudakis y col. (2009), cuando inocularon carne de pollo fresca con *L. fermentum* ACA-DC179 y *S. Enteritidis* PT4. En este caso, una reducción significativa de más de 1 log UFC/g de la cepa de salmonela se observó a los 7 d de almacenamiento a 10 °C. En nuestro ensayo, la disminución en los recuentos de SM S5 en presencia de LP F1B (en ambos formatos tecnológicos), fue de $1,35 \pm 0,36$ log UFC/g y $1,05 \pm 0,12$ log UFC/g en los días 1 y 2 de almacenamiento respectivamente, lo que señalaría el potencial efecto protector de la BAL en estudio. La capacidad inhibitoria de LP F1B sobre SM S5 también se observó en los resultados del ensayo de evaluación *in situ* en carne de pollo descontaminada (sección 4.6.2.) y en los resultados obtenidos en el ensayo de cocultivos líquidos a la misma temperatura de almacenamiento en caldo MRS y TS (sección 4.5.1.2). En el ensayo en carne de pollo descontaminada, el efecto protector de LP F1B se observó solamente en el día 1 de almacenamiento (y para LP F1B inoculado directamente como cultivo fresco), mientras que en este ensayo en carne de pollo fresca la disminución de los recuentos de *Salmonella* spp. se mantuvo hasta el día 2 inclusive. Diferencias en el potencial bioprotector entre un modelo de pollo fresco y un modelo de pollo descontaminado también fueron observadas por Morales y col. (2020). Cuando ensayaron la capacidad antagonista de *L. sakei* 63 sobre *Pseudomonas fragi* en carne de pollo a 8 °C, previamente esterilizada por radiación gamma (25 kGy durante 12 horas) o no, un mayor potencial bioprotector se observó en pollo fresco sin descontaminar previamente. Esto podría deberse a que, en la microbiota de la carne fresca conviven microorganismos que interactúan entre sí; la competencia por nutrientes esenciales, cambios en el pH por la producción de ácidos orgánicos o la producción de sustancias

antimicrobianas, por parte de algunas cepas, afectan negativamente la supervivencia o la multiplicación de los otros microorganismos (Nychas ycol., 2008). Debido a que en la carne descontaminada no existe inicialmente este factor de “stress”, en ese modelo SM S5 no tuvo competencia que limite su multiplicación, aparte del efecto del tratamiento con LP F1B aplicado externamente. En cambio, en el pollo fresco, el efecto de la microbiota acompañante y el efecto del tratamiento con LP F1B podrían haber actuado de forma sinérgica para inhibir el crecimiento de salmonela.

Efecto de la liofilización sobre la capacidad inhibitoria de LP F1B frente a SM S5

Finalmente, se evaluó el efecto de la liofilización sobre la actividad antagonista de LP F1B frente a SM S5 (Fig. 4.44). Cada día del almacenamiento a 10 °C se observaron niveles similares de la cepa indicadora para ambos formatos de LP F1B, excepto en el día 1 ($p < 0,05$, test t), con menores recuentos de SM S5 para las alitas tratadas con el cultivo liofilizado. Esto indicaría que la liofilización no afectó la capacidad antagonista de LP F1B sobre la cepa indicadora en las condiciones del ensayo. Este hecho, sumado a la estabilidad en los recuentos de BAL de ambos formatos tecnológicos durante el almacenamiento, apoya el potencial de LP F1B para ser producida y comercializada como cultivo liofilizado para su uso como cultivo protector.

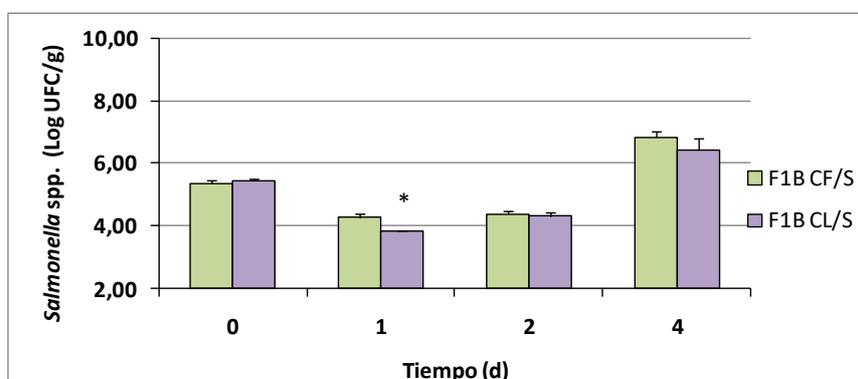


Figura 4.44. Comparación de recuentos de *Salmonella* spp. a tiempo 0, 1, 2 y 4 d para los grupos de muestras F1B CF/S y F1B CL/S a 10 °C. *Diferencias significativas (test t; $p < 0,05$).

5. CONCLUSIONES

El presente trabajo de Tesis tuvo como principal objetivo evaluar la capacidad de dos cepas de BAL como cultivos protectores, dentro de un enfoque tecnológico de barreras para contribuir a la inocuidad alimentaria y prolongar la vida útil de carne de pollo fresca. Se utilizaron las cepas *L. plantarum* F1B-GW (LP F1B, cepa nativa aislada de frutillas) y *L. plantarum* 299v (LP 299v, probiótico comercial). En primer lugar se estudió la actividad antagonista *in vitro* de las BAL frente a siete cepas de salmonela (indicadoras) aisladas del ambiente avícola de la zona, mediante el método de la doble capa y el de difusión en agar con sobrenadantes libres de células (SLC). Las BAL fueron capaces de inhibir el desarrollo de todas las cepas indicadoras y los resultados indicaron que la actividad antagonista fue mediada principalmente por la producción de ácidos orgánicos. En una segunda etapa, se caracterizaron las propiedades superficiales de todas las cepas y su capacidad de formar BP bajo diferentes condiciones (PBS/TS/MRS; 4 y 37 °C). En general, a 4 °C la mayoría de las cepas no formaron BP, demostrando la importancia de la temperatura sobre el desarrollo de la misma. La condición TS / 37 °C permitió clasificar a las cepas según su capacidad de formación de BP. Se seleccionaron las cepas indicadoras *S. Glostrup* ITA S2 (SG S2, fuerte formadora de BP) y *S. Montevideo* ITA S5 (SM S5, débil formadora de BP) y se evaluó la capacidad de ambas BAL de inhibir o reducir la formación de BP de salmonela mediante ensayos de competencia y desplazamiento. En el ensayo de desplazamiento, ambas BAL fueron capaces de remover totalmente las BP de SG S2 y SM S5. La interacción entre las BAL y las bacterias indicadoras fue también estudiada en su estado planctónico mediante cocultivos. A 10 y 37 °C, ambas BAL inhibieron a SG S2 y SM S5 hasta niveles no detectables en caldo MRS. Esto es relevante ya que la temperatura de 10 °C es la temperatura usual de las salas de trozado en las plantas frigoríficas y

además se considera temperatura de abuso de almacenamiento refrigerado para productos frescos.

Finalmente, se evaluó *in situ* en carne de pollo almacenada a 10 °C durante 4 días, la capacidad antagonista de LP F1B frente a las cepas indicadoras. Se realizó un ensayo en carne de pollo descontaminada donde LP F1B fue capaz de mantenerse estable durante el almacenamiento a 10 °C, tal como lo hizo en cocultivo. Sólo SM S5 fue afectada por la acción antagonista de LP F1B, con una reducción significativa en el primer día de almacenamiento. A continuación, se evaluó la actividad antagonista de LP F1B en carne de pollo fresca frente a SM S5 y la microbiota nativa de la carne de pollo. Para simular condiciones operativas de planta, el cultivo de la BAL se aplicó mediante aspersión bajo dos formatos tecnológicos diferentes: cultivo fresco y liofilizado. No se observó un efecto antagonista significativo de LP F1B sobre los grupos indicadores analizados, salvo sobre los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales, en su formato fresco. Sin embargo, LP F1B fue capaz de reducir los niveles de SM S5 en los días 1 y 2 de almacenamiento a 10°C, en ambos formatos tecnológicos. Esto indicaría que la liofilización no afectó la capacidad antagonista de LP F1B sobre la cepa indicadora en las condiciones del ensayo. Este hecho, sumado a que LP F1B se mantuvo estable en ambos formatos tecnológicos en carne de pollo durante el almacenamiento a 10 °C, apoya el potencial de LP F1B para ser producida y comercializada como cultivo liofilizado.

Desde el punto de vista de la inocuidad son deseables mayores reducciones del patógeno frente a un cultivo protector que las observadas en esta Tesis. Sin embargo, debe considerarse que cuando existe contaminación con salmonela al final del procesamiento en la planta de faena, su concentración en la carne de pollo generalmente es mucho menor que la inoculada en los ensayos *in situ* (5 log UFC/g). Por lo tanto, los

efectos de inhibición observados en esta Tesis, combinado con la aplicación de los sistemas de gestión de la inocuidad como las Buenas Prácticas de Manufactura, los Procedimientos Operativos Estandarizados de Sanitización (POES) y el Análisis de Peligros y Control de Puntos Críticos (HACCP en inglés), podrían contribuir a la inocuidad del alimento.

L. plantarum F1B exhibe potencial como cultivo protector. Los resultados del antagonismo *in vitro* e *in situ* sobre serotipos de salmonela aislados del ambiente aviar obtenidos en esta Tesis, son alentadores y permiten avanzar en el estudio de su aplicación como cultivo protector en carne de pollo y/o superficies de procesamiento en la industria de alimentos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alakomi H. L., Skyttä E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K., Helander I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2001-2005.
- Anriany Y., Sahu S. N., Wessels K. R., Mccann L. M., Joseph S. W. (2006). Alteration of the rugose phenotype in *waaG* and *ddhC* mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 is associated with inverse production of curli and cellulose. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 5002-5012.
- Arena M., Silvain A., Normanno G., Grieco F., Drider D., Spano G., Fiocco D. (2016). Use of *Lactobacillus plantarum* as a biocontrol strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, Art 464. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00464>
- Arrijoa-Bretón D., Mani-López E., Palou E., López-Malo A. (2020). Actividad antimicrobiana y estabilidad de almacenamiento de sobrenadantes libres de células de bacterias del ácido láctico y sus aplicaciones en carne fresca. *Food Control*, 115. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107286>
- Ayala D.I., Cook P.W., Franco J.G., Bugarel M., Kottapalli K.R., Loneragan G.H., Brashears M.M and Nightingale K.K. (2019). A systematic approach to identify and characterize the effectiveness and safety of novel probiotic strains to control foodborne pathogens. *Frontiers in Microbiology* 10:1108. doi: 10.3389/fmicb.2019.01108.
- Baranyi J., Roberts T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23 277-294.

- Baranyi J., Tamplin M.L. (2004) ComBase: A common database on microbial responses to food environments. *Journal of Food Protection*, 67 (9), 1967-1971. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.9.1967>
- Barreto M., Castillo-Ruiz M., Retamal P. (2016). *Salmonella enterica*: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Revista chilena de infectología*, 33(5), 547-557. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000500010>
- Bazaka K., Jacob M.V., Crawford R.J., Ivanova E.P. (2012). Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 95(2):299-311. doi: 10.1007/s00253-012-4144-7.
- BCR, Bolsa de Comercio de Rosario. Informativo semanal Mercados ISSN 2796-7824. AÑO XLII - Edición N° 2153 - Especial ganadería - 05 de Julio de 2024. <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/boletin-informativo-semanal/ano-xlii-3> último acceso 26/02/2025.
- Beloin C., Roux A., Ghigo J.M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, 322:249-89. doi: 10.1007/978-3-540-75418-3_12.
- Ben Said L., Gaudreau H., Dallaire L., Tessier M., Fliss I. (2019). Bioprotective culture: a new generation of food additives for the preservation of food quality and safety. *Industrial Biotechnology*, 15(3), 138-147. DOI: 10.1089/ind.2019.29175.lbs
- Beshiru A., Igbinosa E. O. (2018). Characterization of extracellular virulence properties and biofilm-formation capacity of *Vibrio* species recovered from ready-to-eat(RTE) shrimps. *Microbial pathogenesis*, 119, 93-102.

- Borges K.A., Furian T.Q., de Souza S.N., Menezes R., de Lima D.A., Fortes F.B.B., Salle C.T.P., Moraes H.L.S., Nascimento V.P. (2018). Biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium isolated from avian sources is partially related with their in vivo pathogenicity. *Microb Pathog.*, May;118:238-241. doi: 10.1016/j.micpath.2018.03.039.
- Buchanan R. L., Gorris L. G. M., 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. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.12.016
- Cáceres M.E. (2019) Formación de biofilms por cepas *Escherichia coli* verocitotoxigénica (VTEC) y *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) sobre distintas superficies, sometidas a distintas condiciones de estrés [Tesis Doctoral]. Buenos Aires: Facultad de Cs. Veterinarias: Universidad Nacional del Centro de la Pcia. De Bs. As.
- Cases I., de Lorenzo V., Ouzounis C.A. (2003). Transcription regulation and environmental adaptation in bacteria. *Trends Microbiol.* 11(6):248-253.
- Castelijm G. A., van der Veen S., Zwietering M. H., Moezelaar R., Abee T. (2012). Diversity in biofilm formation and production of curli fimbriae and cellulose of *Salmonella* Typhimurium strains of different origin in high and low nutrient medium. *Biofouling*, 28(1), 51-63.
- Castellano P., González C., Carduza F., Vignolo G. 2010. Protective action of *Lactobacillus curvatus* CRL705 on vacuum-packaged raw beef. Effect on sensory and structural characteristics. *Meat Sci.*, 85:394-401.

- CDC Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2017, Annual Report. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2019.
- Chai S.J., Cole D., Nisler A., Mahon B.E. (2017). Poultry: the most common food in outbreaks with known pathogens, United States, 1998-2012. *Epidemiol Infect*, 145(2):316-325. doi: 10.1017/S0950268816002375.
- Chang Y. W., Fragkopoulos A. A., Marquez S. M., Kim H. D., Angelini T. E., Fernández-Nieves A. (2015). Biofilm formation in geometries with different surface curvature and oxygen availability. *New Journal of Physics*, 17(3), 033017. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/17/3/033017>
- Chen L., Wen-Jiao X., Hao D., Chao A., Sai-Jian M. Y Yao L. (2022). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented vegetables in Shaanxi, China. *Frontiers in Microbiology*. Volume 12, Article 774903. doi: 10.3389/fmicb.2021.774903
- Cho Gs., Hanak A., Huch M. (2010) Investigation into the potential of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* BFE 5092 for biopreservation of raw turkey meat. *Probiotics & Antimicro, Prot.* 2, 241–249. <https://doi.org/10.1007/s12602-010-9053-4>
- Cisneros L., Cattelan N., Villalba M.I., Rodríguez C., Serra D.O., Antorno O., Fadda S. (2021). Biopelícula de bacterias del ácido láctico y su capacidad para mitigar la colonización superficial de *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 73, 247–256.

- Collado M.C., Meriluoto J., Salminen S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur Food Res Technol* 226, 1065–1073. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0632-x>
- Colonnella M.A. (2020). Influencia de la topografía del sustrato en la formación de biofilms bacterianos. [Tesis de Doctorado – Universidad de Buenos Aires - Argentina]. Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n6818_Colonnella.pdf último acceso 26/02/2025
- D’Aoust J.Y. (1994). *Salmonella* and the international food trade. *Int J Food Microbiol*, 24(1-2), 11-31. doi: 10.1016/0168-1605(94)90103-1
- Das J., Mishra D., Ray P., Tripathy P., Beuria T., Singh N., Suar M. (2013). In vitro evaluation of anti-infective activity of a *Lactobacillus plantarum* strain against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Gut Pathogens*, 5(1), 11.
- Di Bonaventura G., Piccolomini R., Paludi D., D’orio V., Vergara A., Conter M., Ianieri A. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: Relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6), 1552–1561. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03688.x>.
- Dillon J. K., John A., Fuerst A. C., Hayward G. H. (1986). “A comparison of five methods for assaying bacterial hydrophobicity.” *Journal of Microbiological Methods*, 6(1): 13–19.
- Dinev T., Beev G., Tzanova M., Denev S., Dermendzhieva D. Y Stoyanova A. (2017). Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic and food

spoilage microorganisms: a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 2017. ISSN 1311-1477; DOI: 10.15547/bjvm.1084.

Dokka A., Reddy Y., Spoorthy G.S., Sankara Reddy I. (2018). Protective cultures - A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7(6), 228-238. ISSN: 2319-7706. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.706.028>.

Donlan R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 8(9):881-90. doi: 10.3201/eid0809.020063.

Duguid J. P., Anderson E. S., Campbell I. (1966). Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 92, 107–138.

EFSA and ECDC - European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>.

Emanuel V., Adrian V., Diana P. (2010). Microbial biofilm formation under the influence of various physical-chemical factors. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(3), 1993–96. <https://doi.org/10.2478/V10133-010-0056-9>.

Favaro L., Todorov S.D. (2017). Bacteriocinogenic lab strains for fermented meat preservation: perspectives, challenges, and limitations. *Prob. Antimicrob. Prot.* 9(4):444-458.

Flemming H.C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A., Kjelleberg S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 14(9):563-75. doi: 10.1038/nrmicro.2016.94.

Flemming H.C., Wingender J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 8(9):623-33. doi: 10.1038/nrmicro2415.

- Galvez A., Abriouel H, Omar N., Lucas R. (2010). Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. Elsevier Ltd. 21:142–148. DOI 10.1016/j.copbio.2010.01.005.
- Gálvez A., Pérez Pulido R., Hikmate A., Benomar N., Grande Burgos M. J. (2012). Section 3: Biological decontamination strategies. Chapter 17: Protective cultures. En decontamination of fresh and minimally processed produce. Editado por Vicente M. Gómez-López. ISBN 978-0-8138-2384-3.
- Hancock V., Witsø I. L., Klemm P. (2011). Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(7), 570-576.
- Hossain M. I., Mizan M. F. R., Ashrafudoulla M., Nahar S., Joo H.-J., Jahid I. K., Park S. H., Kim K. S., Ha S.D. (2020). Inhibitory effects of probiotic potential lactic acid bacteria isolated from kimchi against *Listeria monocytogenes* biofilm on lettuce, stainless-steel surfaces, and MBEC™ biofilm device. *LWT- Food Science and Technology*, 118, 108864.
- Ibrahim S.A., Ayivi R.D., Zimmerman T., Siddiqui S.A., Altemimi A.B., Fidan H., Esatbeyoglu T., Bakhshayesh R.V. (2021) Lactic Acid Bacteria as Antimicrobial Agents: Food Safety and Microbial Food Spoilage Prevention. *Foods*, 10, 3131. <https://doi.org/10.3390/foods10123131>.
- ICMSF (2001) Microorganismos de los alimentos 6. Ecología microbiana de los productos alimentarios. Editorial Acribia S.A.
- Jara J., Pérez-Ramos A., del Soar G., Rodríguez J.M., Fernández L., Orgaz B. (2020). Papel de las biopelículas de *Lactobacillus* en la adhesión de *Listeria monocytogenes* a superficies de vidrio. *Int. J. Microbiol.* 334, 108804.

- Jiménez S. M., Destefanis P., Salsi M. S., Tiburzi M. C., Pirovani M. E. (2005). Predictive model for reduction of *Escherichia coli* during acetic acid decontamination of chicken skin. *Journal of Applied Bacteriology*, 99, 829-835.
- Jonas K., Tomenius H., Kader A., Normark S., Roëmling U., Belova L.M. (2007). Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiology*, 7:70.
- Kapperud G., Gustavsen S., Hellesnes I., Hansen A.H., Lassen J., Hirn J., Jahkola M., Montenegro M.A., Helmuth R. (1990). Outbreak of *Salmonella* Typhimurium infection traced to contaminated chocolate and caused by a strain lacking the 60-megadalton virulence plasmid. *J Clin Microbiol.* 28(12):2597-601. doi: 10.1128/jcm.28.12.2597-2601.1990.
- Kim S. J., Cho A. R., Han J. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. *Food Control*, 29, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.060>.
- Knowles J. R., Roller S., Murray D. B., Naidu A. S. (2005). Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied Environmental Microbiology*, 71(2), 797-803.
- Kos B. V. Z. E., Šušković J., Vuković S., Šimpraga M., Frece J., Matošić S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of applied microbiology*, 94(6), 981-987.
- Kragh K.N., Hutchison J.B., Melaugh G., Rodesney C., Roberts A.E., Irie Y., Jensen P.O., Diggle S.P., Allen R.J., Gordon V., Bjarnsholt T. (2016). Role of

Multicellular Aggregates in Biofilm Formation. *mBio*; 7(2): e00237. doi: 10.1128/mBio.00237-16.

Kumar A., Mendiratta S. K., Sen A. R., Kandeepan G., Talukder S., Sharma H. (2015). Preparation and storage stability of meat spread developed from spent hens. *Vet. World* 8, 651–655. doi: 10.14202/vetworld.2015.651-655.

Kure C. F., Axelsson L., Carlehög M., Måge I., Jensen M. R., Holck Askild. (2020). The effects of a pilot-scale steam decontamination system on the hygiene and sensory quality of chicken carcasses. *Journal Elsevier. Food control* 109. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106948>.

Leccese Terraf M. C., Mendoza L. M., Juárez T. M. S., Silva C., Nader-Macías M. E. F. (2014). Phenotypic surface properties (aggregation, adhesion and biofilm formation) and presence of related genes in beneficial vaginal lactobacilli. *Journal of applied microbiology*, 117(6), 1761-1772.

Li Q., Liu X., Zhou J. (2015). Aggregation and adhesion abilities of 18 lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented food, 84–92.

Limoli D.H., Jones C.J., Wozniak D.J. (2015). Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiol Spectr.*; 3(3):10.1128/microbiolspec. MB-0011-2014.

Lindsay D., Von Holy A. (1997). Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. *Food Microbiology*, 14(4), 383–390. <https://doi.org/10.1006/FMIC.1997.0102>.

Lücke F.K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci*;56(2):105-15. doi: 10.1016/s0309-1740(00)00029-2.

- Maragkoudakis P., Mountzouris K., Psyrras D., Cremonese S., Fischer J., Cantor M., Tsakalidou E. (2009). Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*, 130(3), 219-226, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.027>.
- Martin-Visscher L., Yoganathan S., Sit C., Lohans C., Vederas J. (2011). The activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against *g*-negative bacteria in combination with EDTA treatment. *Federation of European Microbiological Society (FEMS) Microbiology Letters*. 317(2): 152-159.
- McDougald D., Rice S. A., Barraud N., Steinberg P. D., Kjelleberg S. (2012). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 39.
- Menconi A., Shivaramaiah S., Huff G.R., Prado O., Morales J.E., Pumford N.R., Morgan M., Wolfenden A., Bielke L.R., Hargis B.M., Tellez G. (2013). Effect of different concentrations of acetic, citric, and propionic acid dipping solutions on bacterial contamination of raw chicken skin. *Poult Sci.*; 92(8):2216-20. doi: 10.3382/ps.2013-03172.
- Merino L.E., Procura F., Trejo F.M., Bueno D.J., Golowczyc M.A. (2019). Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. *Food Res Int.*,119: 530-540. doi: 10.1016/j.foodres.2017.11.024.
- Merino, L.E. (2019). Empleo de bacterias lácticas y sus metabolitos como estrategia de biocontrol para disminuir la incidencia de cepas de *Salmonella* spp. formadoras de biopelículas en granjas avícolas. [Tesis de Doctorado – Universidad Nacional

de La Plata - Argentina]. Repositorio Institucional de la UNLP.
<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/85495> último acceso 26/02/2025.

Montgomery D. C. (2004). Diseño y análisis de experimentos. Segunda edición, Editorial Limusa S.A., México D.F.

Morales P., Aguirre J., Troncosa M., Figueroa G. (2020). Comparison of in vitro and in situ antagonism assays as tools for the selection of bio-preservative lactic acid bacteria (LAB) in poultry meat. *LWT*, 118, 108846.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108846>.

Nocelli N., Bogino P., Banchio E., Giordano W. (2016). Roles of extracellular polysaccharides and biofilm formation in heavy metal resistance of *Rhizobia*. *Materials*. 9: E418.

Noha K., Nassra D., El-Ziney M., Kheadr E. (2021). Food Bio-Preservation: An Overview with Particular Attention to *Lactobacillus plantarum*. *Alex. J. Fd. Sci. & Technol.*, 18(1), 33-50.

Nordström E.A., Teixeira C., Montelius C., Jeppsson B., Larsson N. (2021). *Lactiplantibacillus plantarum* 299v (LP299V®): three decades of research. *Benef Microbes*;12(5):441-465. doi: 10.3920/BM2020.0191.

Nychas G.J.E., Skandamis P.N., Tassou C.C., Koutsoumanis K.P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Sci*, 78:77-89.

O'Toole G..A, Kolter R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*; 28(3):449-61. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x.

- Parlindungan E., Dekiwadia C., O. Jones A. H. (2021). Factors that influence growth and bacteriocin production in *Lactiplantibacillus plantarum* B21. *Process Biochemistry* 107 (4):18–26. doi: 10.1016/j.procbio.2021.05.009.
- Paytubi S., Cansado C., Madrid C., Balsalobre C. (2017). Nutrient composition promotes switching between pellicle and bottom biofilm in *Salmonella*. *Frontiers in microbiology*, 8, 2160.
- Pehrson M. E. S. F., Mancilha I. M. Y., Pereira C. A. S. (2015). Antimicrobial activity of probiotic *Lactobacillus* strains towards gram-negative enteropathogens. *European International Journal of Science and Technology*, 4(3).
- Pembrey R. S., Marshall K. C., Schneider R. P. (1999). Cell surface analysis techniques: what do cell preparation protocols do to cell surface properties? *Appl. Environ. Microbiology*, 65(7), 2877-2894.
- Pérez-Ibarreche M., Castellano P., Leclercq A., Vignolo G. (2016). Control of *Listeria monocytogenes* biofilms on industrial surfaces by the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CRL1862. *FEMS microbiology letters*, 363(12), fnw118.
- Pisoschi A. M., Pop A., Georgescu C., Turcus V., Olah N. K., Mathe E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 922–35. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095>.
- Poimenidou S., Belessi C. A., Giaouris E. D., Gounadaki A. S., Nychas G. E., Skandamis N. (2009). *Listeria monocytogenes* attachment to and detachment from stainless steel surfaces in a simulated dairy processing environment. *Appl. Environ. Microbiology*, 75:7182–7188.
- Popoff M.Y., Le Minor L. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Volume II, Editorial Board, p. 786.

- Rasschaert G., Houf K., De Zutter L. (2007). Impact of the slaughter line contamination on the presence of *Salmonella* on broiler carcasses. *Journal of Applied Microbiology*, 103(2), 333–341.
- Rinaudi L., Sorroche F., Zorreguieta A., Giordano W. (2010). Analysis of mucR gene regulating biosynthesis of exopolysaccharides: implications for biofilm formation in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *FEMS Microbiol Letters*, 302:15-21.
- Ruiz M. J. (2019). Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con actividad inhibitoria de bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. [Tesis de Doctorado – Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires - Argentina]. Repositorio Institucional CONICET Digital. <http://hdl.handle.net/11336/103805>. último acceso 26/02/2025.
- Ruiz M. J., García M. D., Padola N. L., Etcheverría A. I. (2022). Capacidad de *Lactiplantibacillus plantarum* de reducir biofilms de bacterias patógenas transmitidas por alimentos. *Revista Veterinaria*, 33(1), 48–52. <https://doi.org/10.30972/vet.3315879>.
- Salsi M. S. (2022). Actividad antagonista de lactobacilos autóctonos potencialmente probióticos frente a bacterias causantes de ETA en manzanas mínimamente procesadas [Tesis de Maestría – Universidad Nacional del Litoral - Argentina]. Repositorio Institucional Universidad Nacional del Litoral. Biblioteca Digital UNL <https://hdl.handle.net/11185/7161>. último acceso 26/02/2025.

- Saltmarsh M., Insall L. (2013). Food additives and why they are used. En: Essential Guide to Food Additives, ed. M. Saltmarsh, The Royal Society of Chemistry, 4th edn, 2013, pp. 1-13.
- Samanje J. Y., Kiliç A. O. (2020). Antimicrobial action of isolated probiotic *Lactobacillus plantarum* from different fermented dairy products from Trabzon city. Research J. Pharm. and Tech 2020; 13(5):2445-2451. DOI: 10.5958/0974-360X.2020.00438.2.
- Sharma H., Fidan H., Özogul F., Rocha J. M. (2022). Recent development in the preservation effect of lactic acid bacteria and essential oils on chicken and seafood products. Front. Microbiol. 13:1092248. doi: 10.3389/fmicb.2022.1092248.
- Shelobolina E.S., Sullivan S.A., O'Neill K.R., Nevin K.P., Lovley D.R. (2004). "Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella* subterranea sp. nov." Appl. Environ. Microbiol. 70:2959-2965.
- Stepanovic S., Cirkovi I., Mija V., Svabi Vlahovi M. (2003). Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. Food Microbiology 20 (2003) 339–343.
- Stepanovic S., Irkovi I., Ranin L., Svabi-Vlahovi M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Lett Appl Microbiol 38(5):428-432.
- Talukder S., Sharma B. D., Mendiratta S. K., Malav, O. P., Sharma H., Gokulakrishnan P. (2013). Development and evaluation of extended restructured chicken meat

block incorporated with colocasia (*Colocasia esculenta*) flour. *J. Food Proc. Technol.* 4:207.

Tang X., Flint S. H., Bennett R. J., Brooks J. D., Morton R. H. (2009). Biofilm growth of individual and dual strains of *Klebsiella oxytoca* from the dairy industry on ultrafiltration membranes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(12), 1491–97. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0637-5>

Teles Santos T., Santos Ornellas R.M., Borges Arcucio L., Messias Oliveira M., Nicoli J.R., Villela Dias C., Trovatti Uetanabaro A.P., Vinderola G. (2016). Characterization of *lactobacilli* strains derived from cocoa fermentation in the south of Bahia for the development of probiotic cultures. *LWT*, 73:259–266.

Todorov S.D. (2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* - Production, genetic organization and mode of action. *Braz J Microbiol.*;40(2):209-21. DOI: 10.1590/S1517-83822009000200001.

Tomé A. R., Carvalho F. M., Teixeira-Santos R., Burmølle M., Mergulhão F. J., Gomes L. C. (2023). Use of probiotics to control biofilm formation in food industries. *Antibiotics*, 12(4), 754.

Toushik S.H., Kim, K.S., Ashrafudoulla M., Mizan M.F.R., Roy P.K., Nahar S., Kim Y. Ha S.D. (2021). Las bacterias del ácido láctico derivadas del kimchi coreano inhiben el crecimiento de biopelículas patógenas transmitidas por los alimentos en los materiales de la superficie de los mariscos y el procesamiento de alimentos. *Control Alimentario* 129, 108276.

Vinderola G., Capellini B., Villarreal F., Suárez V., Quiberoni A., Reinheimer J. (2008). Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and

identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LWT - FoodScience and Technology* 41 (2008) 1678-1688. DOI:10.1016/j.lwt.2007.10.008.

Walter J., Schwab C., Loach D.M., Ganzle M.G., Tannock G.W. (2008) Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Microbiology*,154(1):72–80.

Wang H., Ye K., Wei X., Cao J., Xu X., Zhou G. (2013). Occurrence, antimicrobial resistance and biofilm formation of *Salmonella* isolates from a chicken slaughter plant in China. *Food Control*, 33, 378–384.

Wang Y., Wu J., Lv M., Shao Z., Hungwe M., Wang J., Bai X., Xie J., Wang Y., Geng W. (2021) Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9:612285. doi: 10.3389/fbioe.2021.612285.

Wigley P. (2024). *Salmonella* and Salmonellosis in Wild Birds. *Animals (Basel)*;14(23):3533. doi: 10.3390/ani14233533.

Woo J., Ahn, J. (2013). Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 56(4), 307–313.

Zacarias M.F, Souza T.C, Zaburlin N., Carmona Cara D., Reinheimer J., Nicoli J., Vinderola G. (2017). Influence of Technological Treatments on the Functionality of *Bifidobacterium lactis* INL1, a Breast Milk-Derived Probiotic. *J Food Sci.*;82(10):2462-2470. doi: 10.1111/1750-3841.13852.

Zhang X., Esmail G. A, Alzeer A. F., Valan Arasu M., Vijayaraghavan P., Choon Choi K.Y Al-Dhabi N. A. (2020). Probiotic characteristics of *Lactobacillus* strains

isolated from cheese and their antibacterial properties against gastrointestinal tract pathogens. Saudi Journal of Biological Sciences, 27:3505–3513. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.022>.