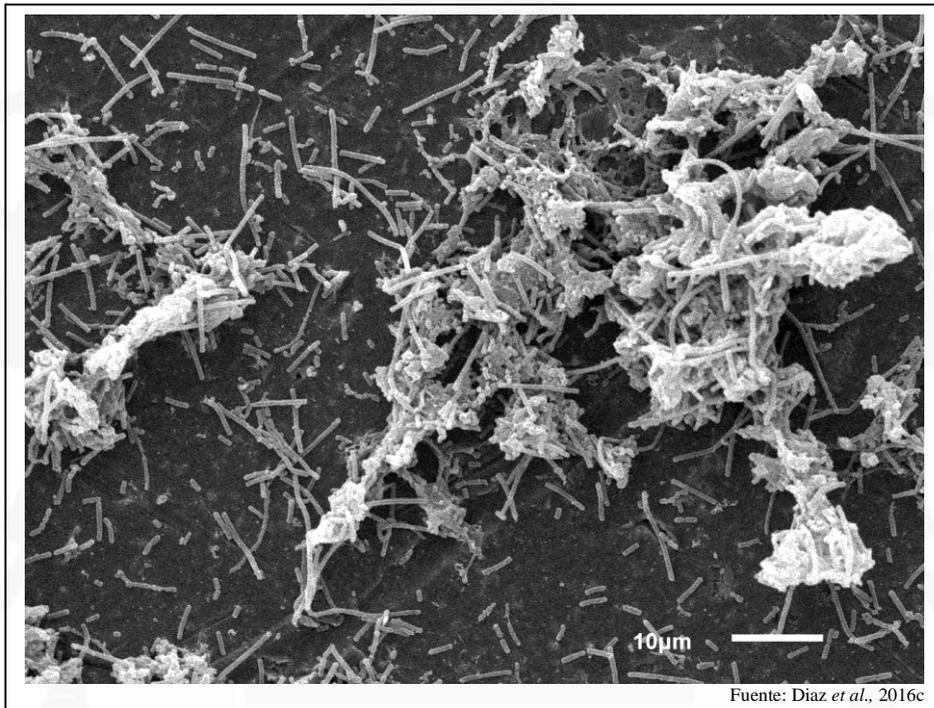


TRABAJO FIN DE GRADO

BIOLOGÍA

Aplicación de bacteriocinas para el biocontrol de
Lactobacillus parabuchneri productores de histamina: eficacia
en la eliminación de biofilms



Iris Barragán Martín

Instituto de Productos Lácteos de Asturias
(IPLA)

Junio 2020



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA



ÍNDICE

1. RESUMEN.....	2
2. ABSTRACT.....	2
3. OBJETIVO.....	3
4. INTRODUCCIÓN	3
4.1. Aminas biógenas	3
4.1.1. Definición.....	3
4.1.2. Clasificación.....	3
4.1.3. Histamina	3
4.2. Biofilms.....	8
4.3. Bacteriocinas	9
4.3.1. La nisina	10
4.3.2. La AS-48	11
5. MATERIAL Y MÉTODOS	12
5.1. Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y bacteriocinas	12
5.2. Análisis cualitativo de la producción de histamina por <i>L. parabuchneri</i>	12
5.3. Formación de biofilms de <i>L. parabuchneri</i>	13
5.4. Ensayo en placa de la actividad bactericida de las bacteriocinas AS-48 y nisina.....	13
5.5. Determinación de la capacidad de la nisina para prevenir la formación de biofilms... 14	
5.6. Determinación de la capacidad de la nisina para eliminar biofilms	14
5.7. Cuantificación de biofilms de <i>L. parabuchneri</i> en poliestireno: método de tinción con cristal violeta	15
5.8. Visualización de biofilms de <i>L. parabuchneri</i> mediante microscopía óptica de contraste de fases.....	15
5.9. Análisis estadísticos	16
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
6.1. Análisis cualitativo de la producción de histamina en cepas de <i>L. parabuchneri</i>	16
6.2. Capacidad formadora de biofilms de las cepas de <i>L. parabuchneri</i>	17
6.3. Actividad bactericida de las bacteriocinas AS-48 y nisina frente <i>L. parabuchneri</i>	18
6.4. Capacidad de la nisina para prevenir la formación de biofilms.....	20
6.5. Capacidad de la nisina para eliminar biofilms de <i>L. parabuchneri</i>	21
7. CONCLUSIONES	24
8. BIBLIOGRAFÍA.....	24

1. RESUMEN

La histamina es una amina biógena tóxica que puede acumularse en altas concentraciones en alimentos fermentados y causar problemas de salud. El principal productor de histamina en quesos es *Lactobacillus parabuchneri*. Este microorganismo supone un problema en la industria láctea, ya que forma biofilms que actúan como reservorios que contaminan los quesos procesados tras la maduración (rayado, loncheado, etc.), favoreciendo el acúmulo de histamina en el producto final. En este trabajo se analizó la capacidad de dos bacteriocinas, la AS-48 y la nisina, como estrategia para prevenir o eliminar biofilms de cepas de *L. parabuchneri* productoras de histamina. Primeramente, se confirmó que las cepas seleccionadas para el estudio eran capaces de formar biofilms en placas de poliestireno; las cepas que presentaron mayor capacidad de formar biofilms fueron *L. parabuchneri* IPLA11151, IPLA11150 e IPLA11129. Además, se determinó que la actividad bactericida de la nisina frente a las cepas de *L. parabuchneri* fue mayor que la de la AS-48. Debido a esto, los siguientes estudios de prevención y eliminación de biofilms se llevaron a cabo con nisina y con las cepas IPLA11150 e IPLA11129. Los resultados mostraron que en los pocillos pretratados con nisina la cantidad de biofilm formado fue significativamente menor que en los pocillos control sin nisina. Igualmente, se observó que la nisina reducía significativamente biofilms previamente formados de las cepas IPLA11150 e IPLA11129, en comparación con biofilms sin tratar con nisina. Estos resultados demuestran la eficacia de la nisina para prevenir y eliminar biofilms de *L. parabuchneri* productores de histamina y aportan una aplicación novedosa de este bioconservante en el campo de la seguridad alimentaria para prevenir la acumulación de histamina en los alimentos.

2. ABSTRACT

Histamine is a toxic biogenic amine that can accumulate in high concentrations in fermented foods and causes serious health problems. The main histamine-producing microorganism in cheeses is *L. parabuchneri*. This microorganism supposes a problem in the dairy industry, since it forms biofilms that act as reservoirs which contaminate processed cheeses after maturation (scratched, sliced, etc.) favouring the accumulation of histamine in the final product. In this work, the capacity of two bacteriocins, AS-48 and nisin, to prevent the formation or eliminate biofilms of histamine-producing *L. parabuchneri* strains was analysed. First, it was confirmed that the strains selected for the study were able to form biofilms on polystyrene plates; the strains *L. parabuchneri* IPLA11151, IPLA11150 and IPLA11129 were classified as strong biofilms producers. Furthermore, it was determined that the bactericidal activity of nisin against *L. parabuchneri* strains was higher than that of AS-48. Because of this, the subsequent studies were carried out with the bacteriocin nisin and the strains IPLA11150 and IPLA11129. The results showed that the amount of biofilm formed was significantly lower in the wells pretreated with nisin than in the untreated controls. Likewise, the treatment with nisin caused a significant reduction in the biomass of preformed biofilms of IPLA11150 and IPLA11129, compared to untreated biofilms. These results demonstrate the efficacy of nisin to prevent and eliminate biofilms of histamine-producing *L. parabuchneri* and provide a novel application of this biopreservative compound in the field of food safety in order to prevent the accumulation of toxic histamine in food.

3. OBJETIVO

El objetivo principal del presente trabajo es determinar la capacidad que presentan las bacteriocinas AS-48 y nisina para prevenir o eliminar biofilms de *Lactobacillus parabuchneri* productores de histamina.

4. INTRODUCCIÓN

4.1. Aminas biógenas

4.1.1. Definición

Las aminas biógenas (AB) son bases orgánicas nitrogenadas, no volátiles, de bajo peso molecular, que se producen por la descarboxilación enzimática de aminoácidos y poseen actividad biológica. Se sintetizan y degradan durante el metabolismo normal de casi todos los seres vivos (Alvarez & Moreno-Arribas, 2014). Desempeñan funciones importantes en la fisiología y desarrollo del ser humano, por ejemplo, en la regulación de la temperatura, del ciclo circadiano y actúan como neurotransmisores u hormonas. Las AB se pueden acumular en algunos alimentos en altas concentraciones debido a la presencia de microorganismos con la correspondiente actividad descarboxilasa. Esto puede representar un grave problema para los consumidores debido a la toxicidad que tienen estos compuestos. De hecho, la ingesta de alimentos con alto contenido en AB puede tener efectos perjudiciales para la salud, como náuseas, migrañas, vómitos, hipertensión, etc. (Ladero *et al.*, 2010).

4.1.2. Clasificación

Las AB se pueden clasificar según su estructura química en dos grupos: aminas alifáticas, que incluyen la putrescina, cadaverina, espermidina y espermina; y aminas cíclicas, que se subdividen en aminas aromáticas, como la tiramina y la β -feniletilamina; y en aminas heterocíclicas, como la histamina y triptamina (Figura 1) (Ladero *et al.*, 2017). Según otro criterio de clasificación que se basa en el número de grupos amino que contienen, se dividen en monoaminas (tiramina y β -feniletilamina), diaminas (putrescina, histamina, triptamina y cadaverina) y poliaminas (espermina y espermidina) (Figura 1) (Ladero *et al.*, 2017).

4.1.3. Histamina

4.1.3.1. Biosíntesis

La histamina se produce por descarboxilación enzimática de su aminoácido precursor, la histidina, en una reacción catalizada por la enzima histidina descarboxilasa (HdcA) (Diaz *et al.*, 2016a). En la reacción se consume un protón y se libera una molécula de CO₂. En la biosíntesis de la

histamina también participa un transportador de membrana tipo antiportador (HdcP) que intercambia una molécula de histidina del medio exterior por una molécula de histamina intracelular. Además, en bacterias Gram positivas, también es necesaria otra enzima, HdcB que facilita la maduración de HdcA (Martín *et al.*, 2005). Los genes que codifican estas proteínas forman parte de un operón denominado *cluster* HDC (*Histidine Decarboxylase Cluster*) en el que los genes que participan en la biosíntesis de histamina están organizados como sigue: *hdcC* (gen que codifica HdcC), *hdcA* (gen que codifica HdcA), *hdcB* (gen que codifica HdcB) e *hisS* (gen que codifica HisS, cuya función es desconocida pero que tiene una secuencia muy similar a histidil-ARNt sintetasas) (Martín *et al.*, 2005).

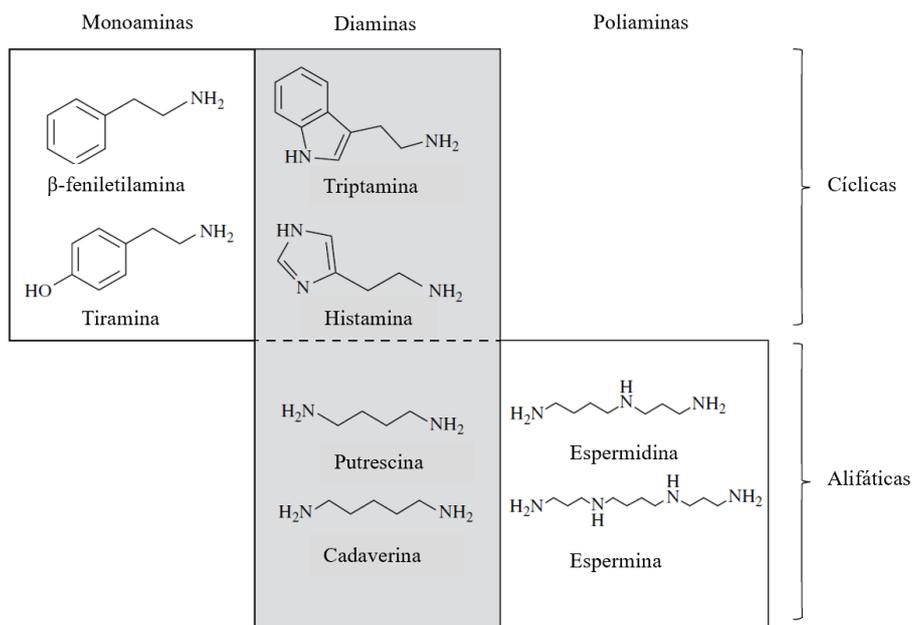


Figura 1. Clasificación de las aminas biógenas atendiendo tanto a su estructura química (cíclicas y alifáticas) como al número de grupos amino (monoaminas, diaminas o poliaminas). Fuente: modificado de Ladero *et al.*, 2017.

4.1.3.2. Funciones fisiológicas

En humanos la histamina actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso central y también como hormona. Esta AB está presente en tejidos de forma natural y participa en la regulación de algunos procesos fisiológicos importantes, llevando a cabo su acción a través de la interacción con receptores específicos (H1-H4) localizados en las células diana (Ladero *et al.*, 2010). Por ejemplo, su unión a receptores H1 de tejidos periféricos activa la respuesta vascular y bronquial en reacciones alérgicas. La histamina también participa en la respuesta inmunológica, en la regulación de la temperatura, secreción de ácido gástrico, crecimiento y diferenciación celular (Ladero *et al.*, 2010).

La biosíntesis de histamina en bacterias está involucrada en diferentes funciones, como en la resistencia frente al estrés ácido, osmótico u oxidativo, o como un mecanismo de producción indirecta de energía metabólica. Por ejemplo, se determinó que la biosíntesis de histamina de *Streptococcus thermophilus* podría proporcionar a las células una ventaja competitiva en ambientes ácidos (Ladero *et al.*, 2017). El beneficio que proporciona la producción de histamina en ambientes ácidos se debe al aumento del pH intracelular que produce su biosíntesis, lo que previene la desnaturalización de las proteínas citoplasmáticas (Ladero *et al.*, 2017). La biosíntesis de histamina también desempeña un papel importante en la respuesta al estrés osmótico. Por ejemplo, en *S. thermophilus* productores de histamina se observó que la expresión del gen *hdcA* se activa cuando el microorganismo se cultiva en presencia de altas concentraciones de sal (Ladero *et al.*, 2017). Los microorganismos también pueden utilizar la producción de histamina como una forma indirecta de obtención de energía metabólica a través del intercambio de aminoácidos/aminas. En diferentes estudios con *Lactobacillus buchneri* y *S. thermophilus* se ha analizado la generación de energía metabólica como consecuencia de la acción combinada de la descarboxilasa y el intercambio aminoácido/amina mediada por el antiportador, el cual funciona como un sistema de generación de fuerza protón-motriz (Ladero *et al.*, 2017).

4.1.3.3. Efectos tóxicos

La histamina ingerida con los alimentos se metaboliza rápidamente en la mucosa intestinal gracias a la acción de enzimas oxidativas, las diamino oxidasas, que la convierten en productos de degradación fisiológicamente menos activos (Ladero *et al.*, 2010). Sin embargo, los sistemas de detoxificación pueden funcionar de forma inadecuada debido a distintas causas, como la predisposición genética del individuo o la ingesta de compuestos que inhiben a las diamino oxidasas, como antidepresivos o el tabaco (Ladero *et al.*, 2010). Además, cuando se ingieren alimentos con altas concentraciones de histamina, los sistemas de detoxificación se pueden saturar. Si esto ocurre, la histamina ingerida no se metaboliza por completo en la mucosa intestinal, pasa al torrente sanguíneo, se distribuye por los tejidos y causa efectos tóxicos (Ladero *et al.*, 2010).

La histamina es una de las AB más peligrosas presentes en los alimentos (EFSA, 2011). El consumo de alimentos con altas concentraciones de histamina causa una afección que se denomina síndrome escombroido o escombroidosis. Este nombre se debe a que los primeros alimentos en los que se relacionó la presencia de concentraciones elevadas de histamina con sus efectos adversos fueron pescados de la familia *Scombridae*, también denominados escómbridos (atún, bonito, caballa, etc.). La histamina ingerida en altas concentraciones puede producir dolores de cabeza, sudoración, taquicardia, broncoespasmos, dificultad para tragar y respirar, alteraciones

de la presión arterial, etc. (Ladero *et al.*, 2010). Estudios recientes realizados *in vitro* con líneas celulares derivadas de epitelio intestinal humano han determinado que la histamina es citotóxica a concentraciones que se pueden encontrar en alimentos y que el mecanismo de su toxicidad se basa en la inducción de muerte celular programada o apoptosis (Linares *et al.*, 2016). Además, se ha comprobado que la histamina tiene toxicidad sinérgica con la tiramina (del Rio *et al.*, 2017), otra AB tóxica que también se puede acumular en altas concentraciones en productos fermentados como el queso (Ladero *et al.*, 2017). Esto tiene gran relevancia porque estas dos AB se pueden encontrar juntas y en concentraciones elevadas en dichos alimentos (Ladero *et al.*, 2017).

4.1.3.4. Acumulación en alimentos

La histamina puede estar presente en concentraciones bajas en alimentos frescos debido al propio metabolismo de los organismos. Sin embargo, se puede llegar a acumular a concentraciones muy altas en ciertos alimentos, tanto frescos como fermentados, debido a la acción de microorganismos con actividad histidina descarboxilasa. Algunos de los principales alimentos en los que se encuentran concentraciones altas de histamina son pescados, productos derivados del pescado como salsas (hasta 758 mg/kg), productos lácteos fermentados como el queso (hasta 1850 mg/kg), productos cárnicos fermentados como embutidos (hasta 400 mg/kg) y vegetales fermentados (hasta 92 mg/kg) (EFSA, 2011).

La histamina es la única AB cuya concentración máxima está limitada legalmente en alimentos tanto en la Unión Europea (Comisión Europea, 2005) como en Estados Unidos (FDA, 2001). Sin embargo, este límite solo está regulado para pescados y productos derivados del pescado. En la UE la concentración de histamina está limitada a 200 mg/kg en pescados y 400 mg/kg en productos derivados del pescado (Comisión Europea, 2005). La FDA (*Food and Drug Administration*) americana indica que concentraciones de histamina por encima de 500 mg/kg podrían suponer un peligro para la salud de los consumidores (FDA, 2001). En productos fermentados se recomienda que la concentración de histamina no supere los 100 mg/kg (Ladero *et al.*, 2008).

4.1.3.5. Microorganismos productores en alimentos: *Lactobacillus parabuchneri*

En alimentos no fermentados la histamina se acumula debido a la presencia de microorganismos contaminantes, generalmente Gram negativos. Estos microorganismos contaminan los alimentos debido a condiciones higiénicas deficientes, como la manipulación inadecuada o la mala conservación del producto crudo. Sin embargo, en alimentos fermentados su acumulación se asocia a la presencia de microorganismos Gram positivos con actividad histidina-descarboxilasa

pertenecientes al grupo de las bacterias del ácido láctico (BAL) (Ladero *et al.*, 2008). Algunas de las bacterias productoras de histamina en alimentos son:

- Pescados y productos derivados: *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas* spp., *Serratia liquefaciens*, *Aeromonas* spp., *Pleisomonas shigelloides*, *Photobacterium* spp., (Ladero *et al.*, 2010), *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus capitis* (Hernández-Herrero *et al.*, 1999).
- Carnes y derivados: enterobacterias, *S. capitis* (Ladero *et al.*, 2010), *Staphylococcus xylosus* (Landeta *et al.*, 2007).
- Bebidas fermentadas: *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus hilgardii*, *Pediococcus parvulus* (Ladero *et al.*, 2010), *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus diolivorans* (Garai *et al.*, 2007), *Lactobacillus mali*, *Leuconostoc mesenteroides* (Landete *et al.*, 2005) y *S. epidermidis* (Benavent-Gil *et al.*, 2016).
- Productos lácteos fermentados: *L. buchneri*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus helveticus*, *S. thermophilus* (Linares *et al.*, 2012), *Lactobacillus reuteri*, *L. hilgardii*, *Tetragenococcus halophilus* y *L. parabuchneri* (Diaz *et al.*, 2016b).

Estudios llevados a cabo por Diaz *et al.*, 2016b han puesto de manifiesto que *L. parabuchneri* es la principal especie de BAL responsable de la acumulación de histamina en quesos. *L. parabuchneri* es un microorganismo Gram positivo perteneciente al grupo de las BAL, de morfología bacilar, anaerobio facultativo, heterofermentativo y catalasa negativo (Figura 2). Gracias a la acción de la enzima arginina deiminasa es capaz de convertir la arginina en ornitina, CO₂ y amonio (Berthoud *et al.*, 2017).

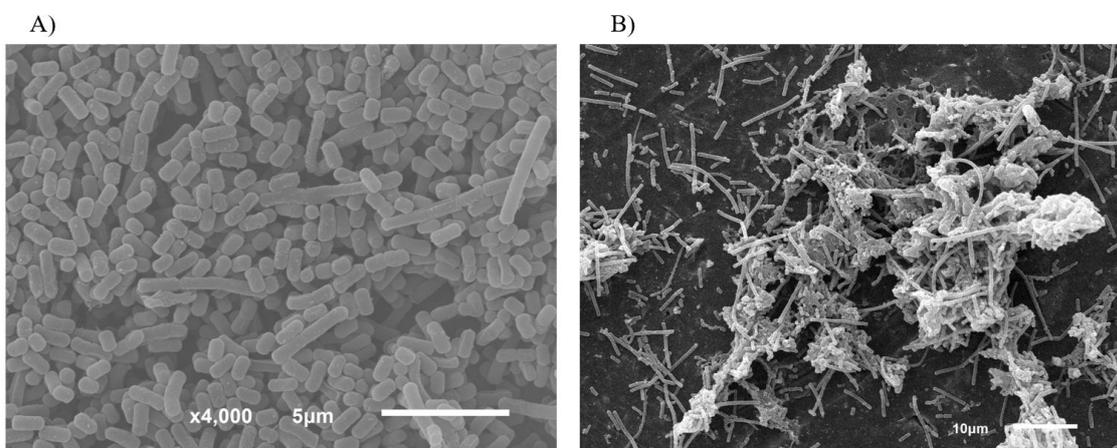


Figura 2. Micrográficas de microscopía electrónica de barrido de cepas de *L. parabuchneri* productoras de histamina formando biofilms en placas de acero inoxidable A) *L. parabuchneri* IPLA11129 (Diaz *et al.*, 2016a) y B) *L. parabuchneri* IPLA11150 (Diaz *et al.*, 2016c).

L. parabuchneri constituye una parte importante de las BAL que se encuentran en estadios tardíos de la maduración del queso, influyendo en su textura y sabor (Ascone *et al.*, 2017). Sin embargo, estas bacterias no se utilizan como cultivos iniciadores (*starter cultures*) en la elaboración del queso, sino que proceden de la leche cruda (Ascone *et al.*, 2017). Se estima que la contaminación de la leche con *L. parabuchneri* ocurre en las granjas, ya que esta especie se inoculara intencionadamente en los silos del forraje para el ganado con el fin de prevenir su deterioro por la acción de levaduras y mohos (Ascone *et al.*, 2017).

Una de las recomendaciones generales que se dan para prevenir la proliferación de microorganismos productores de AB y el aumento de la acumulación de estas toxinas en el producto final consiste en refrigerar los alimentos durante su almacenamiento. Sin embargo, *L. parabuchneri* es capaz de crecer y de producir histamina a temperaturas de refrigeración (Diaz *et al.*, 2018), de manera que las bajas temperaturas retrasan la producción de esta AB en quesos, pero no evitan su acumulación (Diaz *et al.*, 2018).

Otra característica tecnológicamente relevante de *L. parabuchneri* es su capacidad de formar biofilms en la maquinaria industrial destinada al procesado del queso, como por ejemplo los rayadores. Estos biofilms suponen un foco de contaminación importante en la industria láctea, favoreciendo la acumulación de histamina en el producto final (Diaz *et al.*, 2016a; Diaz *et al.*, 2016c).

4.2. Biofilms

Los biofilms bacterianos son agregados multicelulares englobados en una matriz extracelular, formada por proteínas, polisacáridos y ADN (Singh *et al.*, 2017) y producida por las propias bacterias (López *et al.*, 2010). La formación de biofilms supone una ventaja evolutiva para las bacterias ya que el microambiente que se crea dentro de la matriz extracelular las protege de agentes externos, como antibióticos o productos químicos utilizados en la limpieza rutinaria de instalaciones y equipos (Gutiérrez *et al.*, 2016).

Los mecanismos que regulan la formación de los biofilms dependen de la especie o incluso de las cepas (López *et al.*, 2010). Los biofilms bacterianos se pueden encontrar en todo tipo de ambientes (hospitalario, industria alimentaria, etc.) y superficies como el agua, tejidos, utensilios médicos y maquinaria industrial (Singh *et al.*, 2017). Es importante destacar que los biofilms suponen un problema en la industria alimentaria, ya que son una fuente de contaminación para los alimentos procesados, llegando hasta los consumidores y comprometiendo su salud (Gutiérrez *et al.*, 2019). El material más utilizado en los equipos de procesamiento de esta industria es el acero inoxidable. Este material es inerte, de fácil limpieza y resistente a la corrosión. Sin embargo, pueden presentar zonas inaccesibles y grietas difíciles de limpiar, donde los biofilms bacterianos pueden proliferar

y suponer un foco de contaminación para los alimentos procesados (Diaz *et al.*, 2016c). Actualmente los quesos procesados (en porciones, loncheados, rallados, etc.) son bastante populares. Sin embargo, están sujetos a una mayor manipulación y contacto con los equipos de procesamiento, lo que aumenta el riesgo de contaminación por bacterias indeseables como las productoras de AB (Diaz *et al.*, 2016a).

Se han realizado diferentes estudios para medir la capacidad de formar biofilms de distintas cepas de *L. parabuchneri* productoras de histamina aisladas de queso (Diaz *et al.*, 2016a; Diaz *et al.*, 2016c). En estos estudios se comprobó que algunas de estas cepas eran capaces de formar biofilms en acero inoxidable (Figura 2) (Diaz *et al.*, 2016a). Además, se demostró que estos microorganismos también podían formar biofilms en materiales plásticos como el poliestireno (Diaz *et al.*, 2016a; Diaz *et al.*, 2016c). Sin embargo, las cepas mostraron distinta capacidad para formar biofilms; unas cepas producían mucha biomasa (productoras fuertes de biofilms), mientras que otras producían poca biomasa (productoras débiles de biofilms). Por ejemplo, las cepas *L. parabuchneri* IPLA11151, IPLA11150, IPLA11129, IPLA11121 e IPLA11125 se clasificaron como productoras fuertes de biofilms (Diaz *et al.*, 2016a; Diaz *et al.*, 2016c), mientras que las cepas *L. parabuchneri* IPLA11117, IPLA11122, IPLA11126, IPLA11132, IPLA11131 e IPLA11138 se clasificaron como formadoras débiles de biofilms (Diaz *et al.*, 2016a; Diaz *et al.*, 2016c).

Según lo descrito, parece claro que los microorganismos productores de histamina de la especie *L. parabuchneri* representan una gran amenaza de contaminación para el queso procesado, ya que son capaces de adherirse al acero inoxidable y, además, pueden llegar a formar biofilms con una gran cantidad de biomasa. Estos biofilms actúan como reservorios bacterianos que contaminan los quesos durante su procesamiento, favoreciendo el acúmulo de histamina en el producto final (Diaz *et al.*, 2016c).

4.3. Bacteriocinas

El gran impacto que presentan los biofilms bacterianos en la industria alimentaria, tanto económico como sanitario, ha propiciado el desarrollo de distintas estrategias dirigidas a eliminar o prevenir su formación. Entre ellas se incluyen el uso de tratamientos de control microbiano, como la fotocatalisis, las altas presiones hidrostáticas, plasma atmosférico no térmico, disrupción enzimática, inhibidores del *quorum sensing*, o de nuevos antimicrobianos naturales, como los bacteriófagos líticos y las bacteriocinas (Gutiérrez *et al.*, 2019). Las bacteriocinas representan una buena elección para su uso como bioconservantes naturales en alimentos, ya que presentan propiedades físico-químicas muy interesantes desde el punto de vista tecnológico (son termoestables, resistentes a pH ácidos, etc.), inhiben el crecimiento de un gran número de

patógenos y, además, se degradan en tracto el gastrointestinal del consumidor gracias a la acción de enzimas gástricas e intestinales (López *et al.*, 2008).

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidos por bacterias Gram negativas y Gram positivas (como las BAL), que les ofrecen cierta ventaja competitiva en la lucha por la obtención de nutrientes en el medio. Estos péptidos de naturaleza catiónica están constituidos por unos 30-60 aminoácidos, pueden formar hélices anfipáticas y son estables durante pocos minutos a altas temperaturas. Aun así, cada bacteriocina tiene distinto espectro y modo de acción, peso molecular, origen y propiedades (Mokoena, 2017). En la industria alimentaria se están utilizando algunas bacteriocinas producidas por BAL como antimicrobianos naturales para la conservación de los alimentos, ya que evitan el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes, tanto Gram positivos como Gram negativos. Actualmente, la única bacteriocina aprobada en la UE para su uso alimentario como conservante es la nisina (E 234) (Comisión Europea, 2011) mientras que en Estados Unidos también se permite el uso de la pediocina PA-1 (Mokoena, 2017).

Las bacteriocinas se pueden clasificar en tres clases: la Clase I incluye péptidos que sufren modificaciones postranscripcionales durante su biosíntesis cuyo tamaño es menor de 10 kDa; la Clase II está formada por bacteriocinas no modificadas de menos de 10 kDa y la Clase III está constituida por bacteriocinas no modificadas mayores de 10 kDa (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016).

4.3.1. La nisina

La nisina es una bacteriocina termoestable producida por algunas cepas de *Lactococcus lactis*, perteneciente a la Clase Ia (también llamados lantibióticos), que se caracteriza por presentar anillos intramoleculares lantionina y β -metil-lantionina formados por enlaces disulfuro entre dos aminoácidos (Figura 3), ser lineal, catiónica y adoptar estructuras anfipáticas (López *et al.*, 2008). Esta bacteriocina lleva a cabo su acción bactericida mediante un mecanismo dual: abre poros en la membrana citoplasmática e interfiere en la biosíntesis de pared celular. La nisina, que tiene una carga neta positiva, interactúa con la pared celular con carga neta negativa mediante interacciones electrostáticas. Posteriormente, la nisina se une al lípido II, que es el principal transportador de subunidades de peptidoglicano en la biosíntesis de éste, e interfiere en su acción impidiendo la nueva síntesis de pared celular, lo que lleva a la muerte de la bacteria. Además, la unión al lípido II permite que la bacteriocina se ancle a la membrana y forme poros, por donde salen iones, solutos y componentes citoplasmáticos, que provocan la muerte celular (López *et al.*, 2008).

La nisina es activa contra un amplio espectro de bacterias Gram positivas como los estafilococos y enterococos (Wiedemann *et al.*, 2001). Se ha demostrado que es efectiva contra bacterias patógenas y alterantes de alimentos como *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Listeria monocytogenes* (Jozala *et al.*, 2015).

degradan, lo que disminuye su posible impacto sobre la microbiota intestinal (Grande Burgos *et al.*, 2014).

Su espectro inhibitorio es muy amplio, abarcando tanto a bacterias Gram negativas como Gram positivas. La AS-48 tiene un gran potencial como bioconservante natural de alimentos debido a su acción bactericida contra patógenos alimentarios como *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*. (Grande Burgos *et al.*, 2014). También es activa contra algunos géneros de BAL como *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. A pesar de que no existe información en la literatura sobre su posible acción bactericida contra *L. parabuchneri*, en el grupo de Microbiología Molecular del IPLA se han llevado a cabo estudios que demuestran que esta especie es sensible a la bacteriocina AS-48. Debido a estos resultados, se ha decidido seguir analizando el potencial de esta bacteriocina para prevenir o eliminar biofilms de *L. parabuchneri* productores de histamina.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y bacteriocinas

En este estudio se utilizaron seis cepas de *L. parabuchneri* productoras de histamina previamente aisladas de quesos: *L. parabuchneri* IPLA11151, *L. parabuchneri* IPLA11150, *L. parabuchneri* IPLA11117 (Díaz *et al.*, 2016c), *L. parabuchneri* IPLA11129, *L. parabuchneri* IPLA11125 y *L. parabuchneri* IPLA11122 (Díaz *et al.*, 2016a). De ahora en adelante estas cepas se denominarán IPLA11151, IPLA11150, IPLA11117, IPLA11129, IPLA11125 e IPLA11122, respectivamente. *L. parabuchneri* se cultivó en medio MRS líquido (De Man, Rogosa y Sharpe, Oxoid) a 37°C o en MRS sólido (suplementado con 1,2 o 2% de agar) a 37°C en anaerobiosis. *E. faecalis* CECT 481^T (Colección Española de Cultivos Tipo) se cultivó en medio líquido BHI (*Brain Heart Infusion*, Oxoid) a 37°C. La nisina utilizada en este estudio (Sigma-Aldrich) proviene del sobrenadante de un cultivo de *L. lactis* (solución al 2,5% en cloruro sódico); masa molecular: 3354,07 g/mol. La bacteriocina AS-48 purificada fue proporcionada por la Dra. Mercedes Maqueda (Universidad de Granada).

5.2. Análisis cualitativo de la producción de histamina por *L. parabuchneri*

La capacidad de producir histamina de las cepas de *L. parabuchneri* se determinó utilizando un medio de cultivo diferencial, denominado de descarboxilación, suplementado con el aminoácido histidina, que es el sustrato para la biosíntesis de histamina (Díaz *et al.*, 2016a). Este medio contiene púrpura de bromocresol como indicador de pH, de forma que a pH ácido tiene una coloración verde mientras que a pH básico vira a color purpúreo. Las cepas de *L. parabuchneri* con actividad histidina descarboxilasa y, por lo tanto, productoras de histamina, transforman la

histidina del medio en histamina, produciendo una alcalinización del medio por descarboxilación y, en consecuencia, un viraje de color del verde al púrpura. Para llevar a cabo este ensayo se inoculó 1,5 mL de medio de descarboxilación con cada una de las cepas de *L. parabuchneri*, utilizando una dilución 1:100 de los precultivos correspondientes (se denomina precultivo a un cultivo bacteriano crecido previamente en medio líquido al menos durante 16 h a 37°C). Se usaron dos controles negativos: uno consistió en medio de descarboxilación sin inocular y el otro en medio de descarboxilación inoculado con *E. faecalis* CECT 481^T, un microorganismo que no tiene actividad histidina-descarboxilasa y, por lo tanto, no produce histamina.

5.3. Formación de biofilms de *L. parabuchneri*

La formación de biofilms de *L. parabuchneri* en placas de poliestireno de 96 pocillos se llevó a cabo inoculando los pocillos con 200 µL de un cultivo de la cepa correspondiente a una concentración de 10⁶ ufc/mL (2×10⁵ células/pocillo). Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h, tiempo necesario para la formación de los biofilms. Como controles negativos se usaron pocillos a los que se les añadió el mismo volumen de medio MRS estéril.

Para formar biofilms de las cepas IPLA11150 e IPLA11129 en placas de cultivo de 8 pocillos especiales para visualización en microscopio invertido (IBIDI ibiTreat), los pocillos se inocularon con 300 µL de los precultivos de las cepas correspondientes a una concentración de 10⁶ ufc/mL (3×10⁵ células/pocillo) y se incubaron a 37°C durante 48 h. Estas placas presentan un recubrimiento de la superficie de los pocillos denominado ibiTreat que permite una mejor adherencia de las células.

5.4. Ensayo en placa de la actividad bactericida de las bacteriocinas AS-48 y nisina

La cuantificación de la capacidad bactericida de las bacteriocinas AS-48 y nisina se realizó en placas Petri con 25 mL de medio de cultivo MRS sólido (1,2% de agar) inoculadas con 250 µL de un precultivo de la cepa de *L. parabuchneri* correspondiente. Se usó una placa por cepa y por bacteriocina (total 12 placas). En el agar solidificado se hicieron 9 pocillos de unos 5 mm de diámetro con la ayuda de una pajita de plástico estéril. En los pocillos se añadieron 20 µL de bacteriocina a la concentración correspondiente de ensayo. Las placas se cultivaron durante 48 h a 37°C. Se analizó el efecto de 8 concentraciones distintas de bacteriocina (0,0391; 0,0783; 0,1565; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5 y 5 µM). Como control negativo del ensayo se añadió a uno de los pocillos 20 µL de agua ultrapura estéril (Sigma).

5.5. Determinación de la capacidad de la nisina para prevenir la formación de biofilms

La capacidad de la nisina para prevenir la formación de biofilms de IPLA11150 e IPLA11129 se determinó en placas de poliestireno de 96 pocillos, utilizando dos concentraciones de nisina: 0,15 μM y 0,6 μM . Para ello se añadieron 24 μL de nisina 0,15 μM o 0,6 μM (6 μL de nisina 5 μM y 18 μL de agua ultrapura estéril o 24 μL de nisina 5 μM) a los pocillos correspondientes. Como control negativo del ensayo se utilizaron pocillos a los que se añadieron 24 μL de agua ultrapura estéril sin bacteriocina. Las placas se dejaron abiertas dentro de una campana de flujo laminar durante 3-4 h, hasta que la solución con nisina añadida a los pocillos se evaporó y quedó adherida a la superficie interna del pocillo. Pasado este tiempo, se inocularon 2×10^5 células por pocillo de la cepa de *L. parabuchneri* correspondiente (200 μL de cultivo 10^6 ufc/mL). Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h. Pasado el tiempo de incubación, se cuantificó la formación de biofilms utilizando el método de tinción con cristal violeta (CV), que se describe en el apartado 5.7. En cada ensayo se llevaron a cabo 9 replicados biológicos, cada uno de ellos con 8 replicados técnicos.

5.6. Determinación de la capacidad de la nisina para eliminar biofilms

El análisis de la capacidad de la nisina para eliminar biofilms de IPLA11150 e IPLA11129 se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de poliestireno en las que previamente se habían formado biofilms de las cepas a ensayar, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.4. Se analizó la capacidad de eliminar biofilms de dos concentraciones de nisina: 0,15 μM y 0,6 μM . Para conseguir estas concentraciones se utilizaron 6 μL o 24 μL de nisina 5 μM , añadiendo posteriormente 194 μL y 176 μL de MRS, respectivamente. Como controles negativos del ensayo se usaron pocillos en los que se habían formado biofilms a los que se añadieron 200 μL de medio de cultivo MRS sin bacteriocina. Las placas se incubaron posteriormente a 37°C durante 24 h. Pasado ese tiempo, se cuantificó la formación de biofilms utilizando el método de tinción con CV que se describe en el apartado 5.7. En cada ensayo se llevaron a cabo 9 replicados biológicos, cada uno de ellos con 8 replicados técnicos.

La capacidad de la nisina de eliminar biofilms de IPLA11150 e IPLA11129 también se analizó mediante visualización utilizando microscopía óptica de contraste de fases. Para ello se prepararon placas de 8 pocillos IBIDI ibi'Treat en las que previamente se habían formado biofilms de las cepas a ensayar, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.4. Una vez formados los biofilms, se añadió nisina a los pocillos correspondientes de manera que las concentraciones finales de esta bacteriocina fueran de 0,15 μM o 0,6 μM (se añadieron 9 μL de nisina 5 μM o 36 μL de nisina 5 μM , respectivamente). Las placas se incubaron de nuevo durante 24 h a 37°C. Transcurrido este tiempo de incubación, los biofilms se visualizaron mediante un microscopio

óptico de contraste de fases invertido (ver apartado 5.8). En cada ensayo se llevaron a cabo duplicados biológicos.

5.7. Cuantificación de biofilms de *L. parabuchneri* en poliestireno: método de tinción con cristal violeta

El biofilm formado en placas de poliestireno (apartado 5.4) se cuantificó utilizando el método de tinción con cristal violeta (CV) descrito por Diaz *et al.*, 2016a. El CV es un colorante que se adhiere a las proteínas de los biofilms que se encuentran en las bacterias que lo forman y en la matriz extracelular, lo que permite su cuantificación. Para ello, en primer lugar se eliminó el material no adherido a los pocillos volcándolo sobre un contenedor de residuos biológicos. Posteriormente se lavó dos veces cada pocillo con 225 μ L de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) para eliminar totalmente las bacterias no adheridas al poliestireno de la placa. Las placas se dejaron secar durante 30 min dentro de una campana de flujo. Después se añadieron 200 μ L de CV (0,5% en agua) a cada pocillo y se incubó la placa durante 30 min. Pasado ese tiempo, cada pocillo se lavó 4 veces con 200 μ L de agua bidestilada con el fin de eliminar restos de CV no adheridos al biofilm. El CV adherido a los biofilms se extrajo añadiendo 200 μ L de una mezcla de acetona-etanol (80:20, vol:vol) a cada pocillo. Se hizo una dilución 1:10 del contenido de estos en los pocillos de una placa nueva, transfiriendo a cada uno de ellos 180 μ L de agua bidestilada y 20 μ L del material de cada pocillo de la placa anterior. Finalmente se midió la absorbancia en un lector de placas multipocillos (Benchmark Plus microplate spectrophotometer, BioRad) a una longitud de onda de 595 nm.

La capacidad de formación de biofilms de las distintas cepas de *L. parabuchneri* se determinó usando como referencia el punto de corte de densidad óptica (DOc), tal y como se detalla en Diaz *et al.*, 2016c. El punto DOc corresponde al valor de la media de los controles negativos más tres veces la desviación típica. Teniendo como referencia este punto de corte, se calculó el doble de este valor ($2 \times \text{DOc}$) y el cuádruple ($4 \times \text{DOc}$). Las cepas con una densidad óptica (DO) inferior a DOc se consideran no formadoras de biofilm y las que tienen una DO superior se consideran formadoras. Las cepas formadoras de biofilms se clasifican como formadoras débiles si $\text{DOc} < \text{DO} \leq 2 \times \text{DOc}$, formadoras moderadas si $2 \times \text{DOc} < \text{DO} \leq 4 \times \text{DOc}$ y formadoras fuertes de biofilms si $\text{DO} > 4 \times \text{DOc}$.

5.8. Visualización de biofilms de *L. parabuchneri* mediante microscopía óptica de contraste de fases

Las placas IDIBI ibiTreat que se utilizaron para visualizar la formación de biofilms de *L. parabuchneri* (sección 5.4) y la capacidad de la nisina para eliminar dichos biofilms (sección 5.6)

se lavaron cinco veces con 300 μL de PBS para eliminar las bacterias no adheridas. Posteriormente se añadieron 200 μL de PBS a cada pocillo y los biofilms se visualizaron mediante un microscopio óptico de contraste de fases invertido (Leica DMi8) montado con un objetivo 100X.

5.9. Análisis estadísticos

Los datos de los distintos experimentos se muestran como la media \pm la desviación estándar del conjunto de réplicas biológicas y técnicas. La existencia de diferencias estadísticamente significativas se determinó mediante la prueba *t* de Student (significación $p < 0,05$).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis cualitativo de la producción de histamina en cepas de *L. parabuchneri*

El grupo Microbiología Molecular del IPLA, en el que se ha realizado este trabajo, dispone de una amplia colección de cepas de *L. parabuchneri* productoras de histamina. Para realizar este estudio se seleccionaron 6 cepas productoras aisladas de queso: IPLA11151, IPLA11150, IPLA11129, IPLA11117, IPLA11125 e IPLA11122. La selección se realizó en función de su capacidad de producir biofilms: IPLA11151, IPLA11150, IPLA11129 e IPLA11125 son formadoras fuertes de biofilms (Diaz *et al.*, 2016c; Diaz *et al.*, 2016a), mientras que IPLA11122 e IPLA11117 son formadoras débiles (Diaz *et al.*, 2016a; Diaz *et al.*, 2016c). Una vez seleccionadas las cepas se comprobó que producían histamina utilizando medio de descarboxilación suplementado con histidina. Como se puede observar en la Figura 5, el medio en el que se cultivaron las cepas de *L. parabuchneri* se tornó de color púrpura debido a la alcalinización que produce la biosíntesis de histamina, lo que demuestra que todas las cepas son productoras de esta AB. Sin embargo, el medio del control negativo inoculado con *E. faecalis* CECT 481^T no viró de color, ya que este microorganismo no es capaz de convertir la histidina en histamina y, por tanto, no se produce aumento del pH del medio.



Figura 5. Determinación cualitativa de la producción de histamina por las cepas de *L. parabuchneri* seleccionadas para este estudio. Las cepas se cultivaron en medio de descarboxilación suplementado con histidina durante 48 h a 37°C.

6.2. Capacidad formadora de biofilms de las cepas de *L. parabuchneri*

Tras confirmar la producción de histamina por las cepas de *L. parabuchneri* seleccionadas, continuamos el trabajo comprobando la capacidad de formar biofilms de dichas cepas en placas de 96 pocillos de poliestireno. Los resultados obtenidos para cada cepa se muestran en la Figura 6.

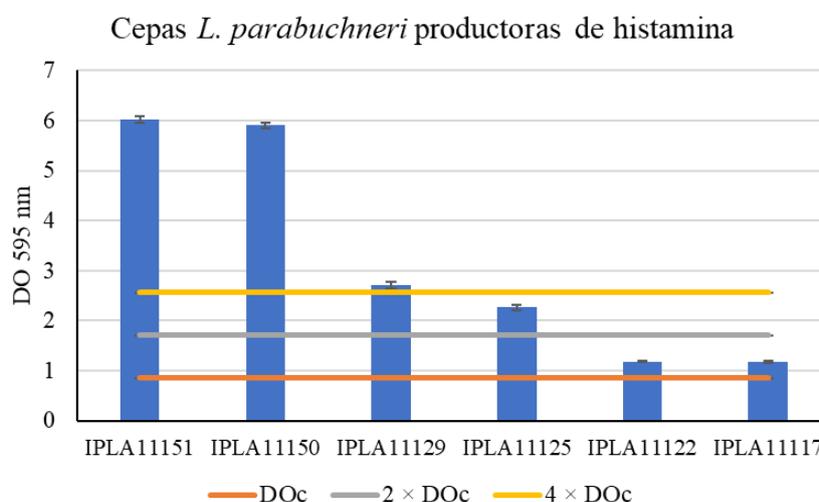


Figura 6. Capacidad de formación de biofilms en poliestireno por las cepas de *L. parabuchneri* productoras de histamina. Los datos muestran los valores medios \pm desviación estándar de los replicados biológicos y técnicos. Línea naranja = DOc; Línea gris = $2 \times$ DOc; línea amarilla = $4 \times$ DOc.

Como se observa en la gráfica, todas las cepas seleccionadas fueron capaces de formar biofilms, aunque no con igual intensidad. Las cepas IPLA11151 e IPLA11150 fueron las que más biofilm formaron, llegando a valores de DO próximos a 6 (DO=6,02 \pm 0,07 y DO=5,9 \pm 0,05, respectivamente). Sin embargo, las cepas IPLA11129 e IPLA11125 formaron aproximadamente la mitad de biofilm (DO=2,71 \pm 0,07 y DO=2,27 \pm 0,06, respectivamente) y en las cepas IPLA11122 e IPLA11117 formaron muy poco biofilm (DO=1,18 \pm 0,01 y DO=1,18 \pm 0,01, respectivamente). Como se mencionó anteriormente, las cepas se pueden clasificar en formadoras fuertes, formadoras moderadas o formadoras débiles de biofilms, utilizando para ello los puntos de corte DOc, $2 \times$ DOc y $4 \times$ DOc, según el criterio establecido por Diaz *et al.*, 2016c. En este trabajo, las cepas IPLA11151, IPLA11150 e IPLA11129 se consideraron formadoras de biofilm fuertes, la cepa IPLA11125 formadora moderada de biofilm y las cepas IPLA11122 e IPLA11117 formadoras débiles (Figura 6, barras horizontales naranja, gris y amarilla, respectivamente; Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las cepas de *L. parabuchneri* según su capacidad de formar biofilms en placas de poliestireno.

Capacidad formadora de biofilm	Cepas de <i>L. parabuchneri</i> productoras de histamina					
	IPLA11151	IPLA11150	IPLA11129	IPLA11125	IPLA11122	IPLA11117
Fuerte	+	+	+			
Moderada				+		
Débil					+	+

Se encontraron algunas diferencias en esta clasificación en comparación con la obtenida en estudios previos (Diaz *et al.*, 2016a; Diaz *et al.*, 2016c). Al igual que en el presente estudio, las cepas IPLA11151, IPLA11150 e IPLA11129 habían sido previamente clasificadas como formadoras fuertes de biofilms, mientras que IPLA11122 e IPLA11117 fueron clasificadas como formadoras débiles (Diaz *et al.*, 2016a; Diaz *et al.*, 2016c). Sin embargo, la cepa IPLA11125 también se consideró formadora fuerte (Diaz *et al.*, 2016a), mientras que en el presente trabajo se clasificó como formadora moderada. Esta diferencia podría ser debida a la variabilidad asociada a la realización de la técnica de tinción de los biofilms con CV (pequeñas diferencias en los periodos de incubación con CV, diferente forma de lavar los pocillos, pequeños errores en las diluciones del CV solubilizado, etc.).

6.3. Actividad bactericida de las bacteriocinas AS-48 y nisina frente *L. parabuchneri*

Tras determinar la capacidad de producir biofilms de las cepas de *L. parabuchneri*, se analizó la actividad bactericida contra estas cepas de dos bacteriocinas: la AS-48 y la nisina. La bacteriocina AS-48 se usó purificada, mientras que la nisina que se utilizó fue un extracto comercial de un cultivo de una cepa productora de *L. lactis*. La actividad bactericida de estas bacteriocinas se confirmó mediante ensayos en placa en los que se determinaron los diámetros de los halos de inhibición producidos por distintas concentraciones. Las concentraciones de bacteriocinas que se ensayaron fueron las siguientes: AS-48: 0,0391; 0,0783; 0,1565; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5 y 5 μM ; nisina: 0,0391; 0,0783; 0,1565; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5 y 5 μM . Como ejemplo se muestran las placas en las que se ensayó la actividad bactericida de la AS-48 y la nisina contra la cepa IPLA11129 (Figura 7).

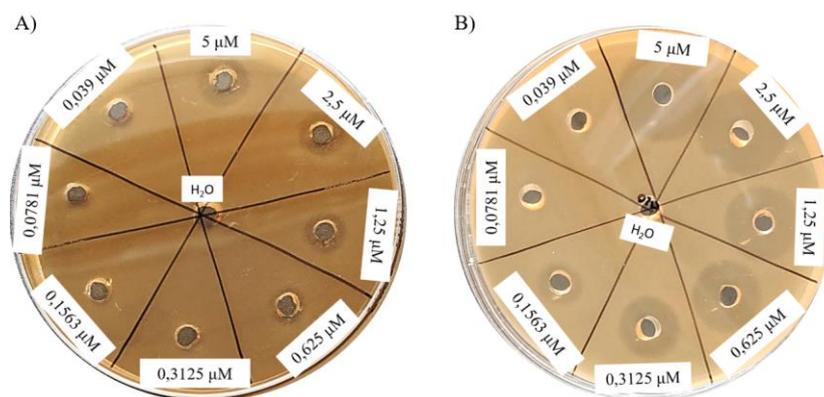


Figura 7. Ensayo en placa para determinar la capacidad bactericida de las bacteriocinas A) AS-48 y B) nisina, contra *L. parabuchneri* IPLA11129. Las placas se prepararon con MRS sólido inoculado con dicha cepa. Se realizaron pocillos de 5 mm de diámetro en los que se inocularon 20 μ L de bacteriocina a las siguientes concentraciones A) AS-48: 0,0391; 0,0783; 0,1565; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5 y 5 μ M y B) nisina: 0,0391; 0,0783; 0,1565; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5 y 5 μ M. Las placas se incubaron durante 48 h a 37°C en anaerobiosis.

Los diámetros de los halos de inhibición obtenidos para la AS-48 y la nisina se representaron gráficamente frente a las concentraciones de bacteriocina ensayadas (Figura 8). Como se puede observar en la gráfica, la nisina presentó una mayor capacidad bactericida contra todas las cepas que la AS-48, ya que se obtuvieron diámetros de halos de inhibición mayores a concentraciones de bacteriocina equivalentes.

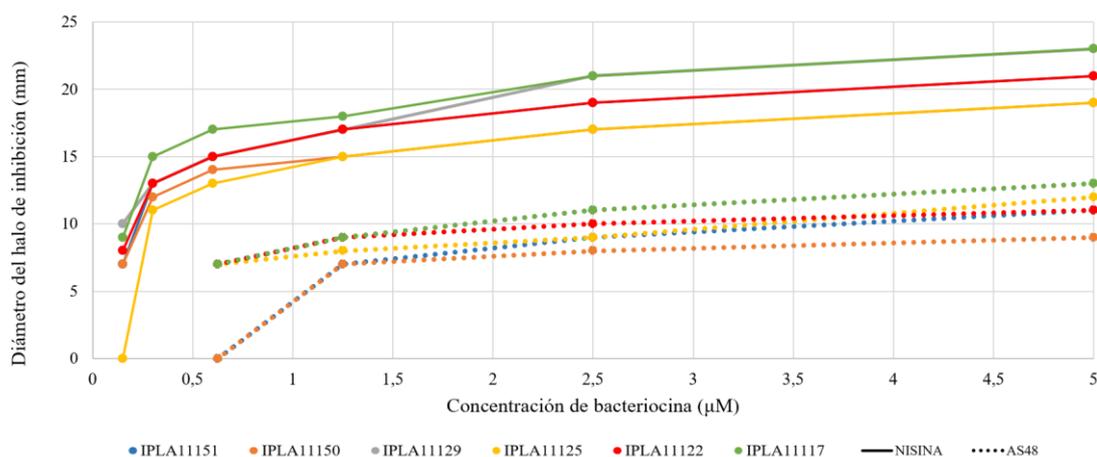


Figura 8. Acción bactericida de las bacteriocinas AS-48 y nisina frente a las cepas de *L. parabuchneri* productoras de histamina. Líneas discontinuas: tratamiento con AS-48; líneas continuas: tratamiento con nisina.

Ya que la actividad bactericida de la nisina frente a *L. parabuchneri* fue mayor que la observada con AS-48, se decidió continuar los estudios de prevención y eliminación de biofilms sólo con la nisina. Además, la nisina presenta una importante ventaja adicional con respecto a la AS-48 para su utilización en la industria alimentaria, ya que, como se ha mencionado anteriormente, la nisina está aceptada en la UE como conservante alimentario, incluyendo productos lácteos (Comisión Europea, 2005), mientras que la AS-48 aún no ha sido aprobada para su uso alimentario.

6.4. Capacidad de la nisina para prevenir la formación de biofilms

Cabría esperar que las cepas de *L. parabuchneri* productoras de histamina formadoras fuertes de biofilms fueran más difíciles de eliminar que las formadoras moderadas o débiles de biofilms una vez establecidas en la maquinaria industrial. Debido a esto, se decidió estudiar el efecto anti-biofilms de la nisina con las cepas IPLA11150 e IPLA11129, que son formadoras fuertes de biofilms. Se ensayaron dos concentraciones de nisina: 0,15 μM , que corresponde a una concentración baja de nisina con actividad bactericida sobre estas cepas y 0,6 μM , una concentración de nisina 4 veces mayor.

Para garantizar la ausencia de biofilms de *L. parabuchneri* se pueden seguir dos estrategias: utilizar tratamientos que eviten su formación o bien tratamientos dirigidos a eliminarlos una vez que ya se han formado. Comenzamos analizando la capacidad de la nisina (0,15 y 0,6 μM) para prevenir la formación de biofilms en placas de poliestireno, recubriendo la cara interna de los pocillos con la bacteriocina. Posteriormente, las placas se inocularon con cultivos de las cepas IPLA11150 e IPLA11129 y se incubaron a 37°C durante 48 h. Como controles se utilizaron pocillos en los que no se había añadido nisina. Una vez pasado el tiempo de incubación, la formación de los biofilms se cuantificó mediante el método de tinción con CV (Figura 9).

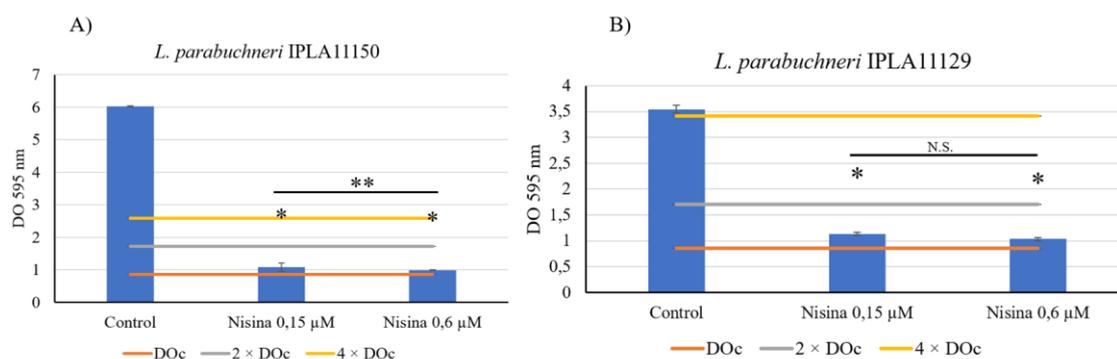


Figura 9. Capacidad de la nisina para prevenir la formación de biofilms en poliestireno de A) *L. parabuchneri* IPLA11150 y B) *L. parabuchneri* IPLA11129. Las placas se trataron con dos concentraciones de nisina, 0,15 μM y 0,6 μM durante 48 h a 37°C. Posteriormente, los biofilms se cuantificaron mediante el método de tinción con cristal violeta. El control negativo corresponde a pocillos sin tratar con bacteriocina inoculados con las mismas cepas. Los datos muestran la media \pm desviación estándar de las réplicas biológicas y técnicas. Línea naranja = DOc; Línea gris = 2xDOc; línea amarilla = 4xDOc. *Diferencia estadísticamente significativa comparado con el control negativo ($p < 0,05$). ** Diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos 0,15 μM y 0,6 μM de nisina ($p < 0,05$). N.S diferencia no significativa.

Como se puede observar, la nisina resultó eficaz para prevenir la formación de biofilms de las cepas IPLA11150 (Figura 9A) e IPLA11129 (Figura 9B), ya que la DO correspondiente a los biofilms formados en los pocillos con nisina fue significativamente menor ($p < 0,05$) que la obtenida en los pocillos control. En el caso de la cepa IPLA11150, la DO del biofilm formado en los pocillos sometidos al tratamiento preventivo con nisina 0,15 μM fue 6 veces menor que en los

pocillos control (Figura 9A), mientras que en la cepa IPLA11129 fue 3,5 veces menor (Figura 9B). El aumento de la concentración de nisina (0,6 μM) causó una reducción mayor del biofilm formado en la cepa IPLA11150 (Figura 9A), en comparación con el tratamiento con 0,15 μM de nisina. En el caso de IPLA11129 no se observaron diferencias significativas entre los dos tratamientos. Es importante resaltar la gran cantidad de biofilm formado en los pocillos control de la cepa IPLA11150 ($\text{DO} = 6,03 \pm 0,01$), ya que pone de manifiesto la alta capacidad de la nisina para controlar su formación en cepas de *L. parabuchneri* productoras de histamina. Hay otros estudios descritos en la literatura en los que se demuestra la capacidad de la nisina para prevenir la adhesión y la formación de biofilms de otros microorganismos, incluyendo ciertos patógenos alimentarios tales como *S. aureus* (Pimentel-Filho *et al.*, 2014) o *L. monocytogenes* (Minei *et al.*, 2008).

El tratamiento preventivo con la nisina no sólo disminuyó la formación de biofilms de IPLA11150 e IPLA11129, sino que la DO obtenida en los pocillos pre-tratados con nisina resultó cercana al punto de corte DOc (Figura 9A y 9B, respectivamente). Podría haber varias explicaciones para estos resultados. Si las superficies se recubren con nisina antes de que *L. parabuchneri* entre en contacto con ellas: i) la acción bactericida de la bacteriocina podría reducir el número de bacterias colonizadoras, lo que disminuiría la cantidad de biofilm formado, y/o ii) la nisina podría tener efectos en la regulación de las rutas de biosíntesis implicadas en la formación de biofilms en *L. parabuchneri*. También se podría considerar un posible efecto inhibitorio de la nisina sobre la ruta de biosíntesis de la histamina, con lo que además de reducir el número de bacterias formadoras de biofilm con capacidad de producir histamina, la nisina podría afectar a la síntesis de esta AB. Ya que en la literatura no existen estudios que apoyen esta última hipótesis, sería necesario llevarlos a cabo.

En conjunto, estos resultados indican que la nisina, a concentraciones tan bajas como 0,15 μM , podría ser eficaz para evitar la formación de biofilms en la maquinaria industrial. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis, sería necesario realizar ensayos de prevención similares a los descritos pero usando superficies de acero inoxidable como anclaje de los biofilms, ya que éste es el material que se utiliza rutinariamente en la maquinaria de procesado (Diaz *et al.*, 2016a).

6.5. Capacidad de la nisina para eliminar biofilms de *L. parabuchneri*

Posteriormente, se cuantificó la capacidad de la nisina para eliminar biofilms ya establecidos de las cepas IPLA11150 e IPLA11129. Para ello, se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos en las cuales se habían desarrollado biofilms de estas dos cepas. Los biofilms se trataron con nisina usando dos concentraciones diferentes, 0,15 y 0,6 μM , y se incubaron a 37°C durante 24 h. Al día siguiente, la biomasa de los biofilms formados se cuantificó mediante tinción con CV. Los

datos obtenidos se presentan en la Figura 10. Como se puede observar, la nisina, a las dos concentraciones ensayadas, redujo de forma significativa ($p < 0,05$) la cantidad de biofilm formado por las cepas IPLA11150 (Figura 10A) e IPLA11129 (Figura 10B) en relación a los biofilms que permanecían en los pocillos control no tratados.

El tratamiento con nisina 0,15 μM causó la eliminación de la mitad (50%) del biofilm formado por la cepa IPLA11150 (Figura 10A) en comparación con los controles; en la cepa IPLA11129 se observó una reducción mucho mayor (6 veces, 83%) (Figura 10B). Sin embargo, el aumento de la concentración de nisina a 0,6 μM no mejoró significativamente esta disminución en ninguna de las dos cepas.

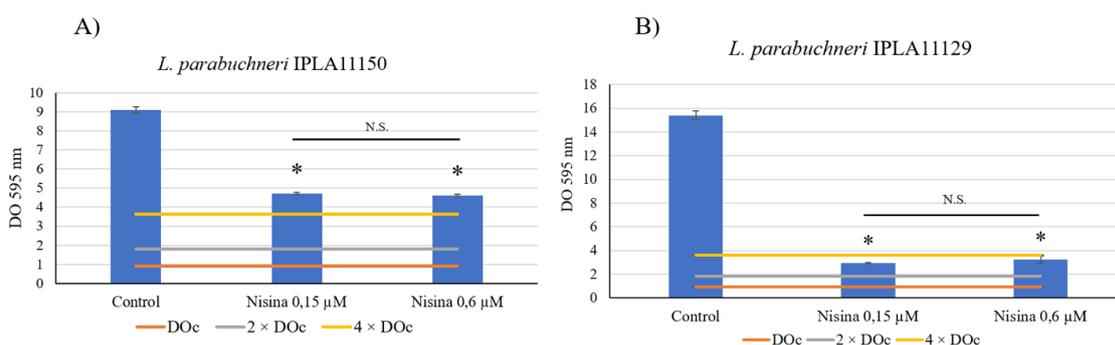


Figura 10. Capacidad de la nisina para eliminar biofilms de A) *L. parabuchneri* IPLA11150 y B) *L. parabuchneri* IPLA11129. Los biofilms formados en placas de poliestireno se trataron con dos concentraciones de nisina, 0,15 μM y 0,6 μM durante 24 h a 37°C. Posteriormente, los biofilms se cuantificaron mediante el método de tinción con cristal violeta. El control negativo corresponde a pocillos con biofilm no tratados. Los datos muestran la media \pm desviación estándar de las réplicas biológicas y técnicas. Línea naranja = DOc; Línea gris = 2 \times DOc; línea amarilla = 4 \times DOc. *Diferencia estadísticamente significativa comparado con el control negativo ($p < 0,05$). N.S. diferencias no significativas.

Resulta llamativo que la DO de los biofilms de IPLA11129 formados en los pocillos control fue aproximadamente 1,7 veces mayor que la obtenida para IPLA11150 (DO = $15,34 \pm 0,36$; DO = $9,09 \pm 0,16$, respectivamente). A pesar de esto, en presencia de nisina la cantidad de biofilms formados por la cepa IPLA11129 fue menor que la correspondiente a los biofilms de la cepa IPLA11150.

El efecto de la nisina (0,6 μM) sobre los biofilms de las cepas IPLA11150 e IPLA11129 se visualizó mediante microscopía óptica de contraste de fases utilizando placas de 8 pocillos IDIBI ibiTreat. Las imágenes de microscopía mostradas en la Figura 11 confirman la capacidad de esta bacteriocina para reducir la formación de biofilm por parte de las cepas IPLA11150 e IPLA11129 (Figura 11A y Figura 11B, respectivamente), ya que se observó una disminución notable de bacterias en los biofilms tratados con nisina en comparación con los biofilms control no tratados. Igualmente, se vio que esta reducción fue mayor en la cepa IPLA11129 que en la cepa

IPLA11150, lo que corrobora los resultados obtenidos anteriormente en placas de poliestireno. Aparentemente, la estructura de los biofilms formados por estas dos cepas es distinta, ya que los biofilms de la cepa IPLA11150 muestran una mayor complejidad que los formados por la cepa IPLA11129.

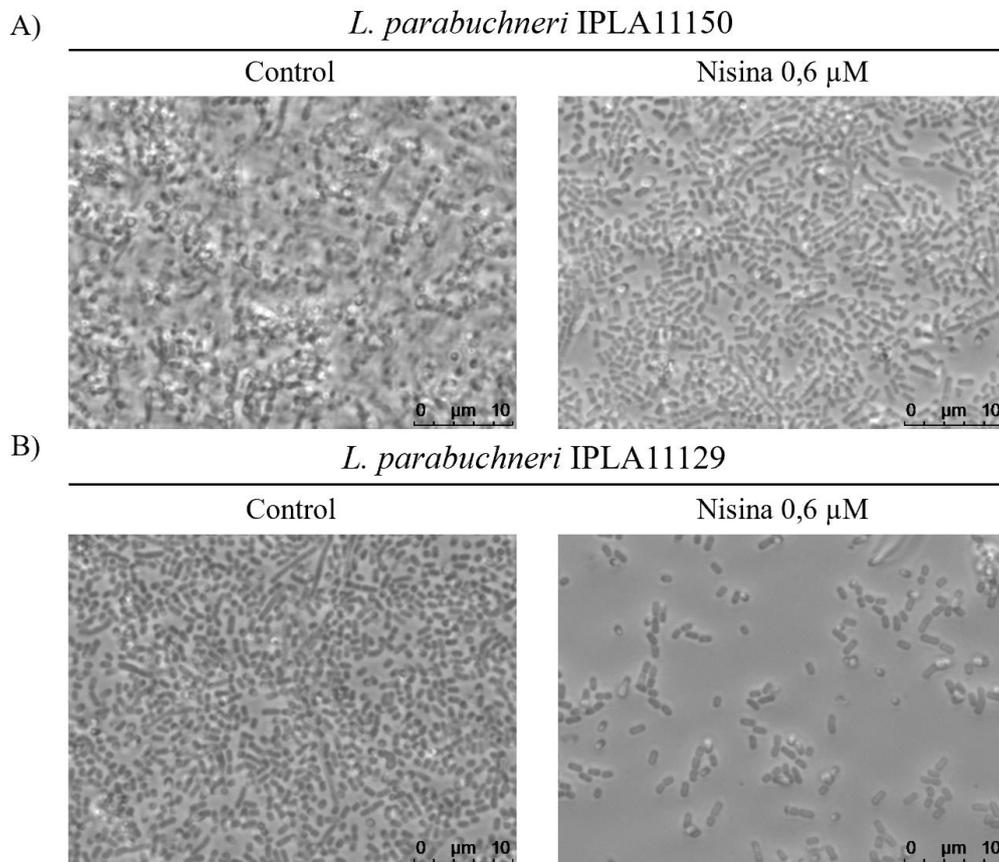


Figura 11. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases que muestran la capacidad de la nisina para eliminar biofilms de *L. parabuchneri* adheridos a la superficie de placas IBIDI ibiTreat. Los biofilms de las cepas A) IPLA11150 y B) IPLA11129 se formaron en placas IBIDI ibiTreat durante 48 h a 37°C. Posteriormente, los biofilms se trataron con MRS suplementado con nisina 0,6 μ M durante 24 h a 37°C o con MRS sin bacteriocina (control). Finalmente, los biofilms se visualizaron mediante un microscopio óptico de contraste de fases invertido (100X).

Estos resultados demuestran la eficacia de la nisina para eliminar biofilms de *L. parabuchneri* productores de histamina y sugieren que dicha eficiencia podría depender no solo de la cantidad inicial de biofilm, sino también de la estructura y composición de la matriz extracelular, que pudiera impedir en mayor o menor medida el acceso de la bacteriocina a las bacterias embebidas en ella, de forma similar al efecto descrito en biofilms de *S. aureus* y *S. epidermidis* (Andre *et al.*, 2019). Hay otros estudios en los que se describe la eficacia de la nisina para eliminar biofilms establecidos de patógenos alimentarios como *L. monocytogenes* (Ibusquiza *et al.*, 2011). También se ha observado que los biofilms de más días de desarrollo muestran una mayor resistencia al

tratamiento con nisina que las células plantónicas o biofilms de menos días, debido a estructuras complejas, en forma de nube, que se desarrollan durante la maduración de los biofilms (Ibusquiza *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta estos datos, sería necesario realizar más estudios dirigidos a comprobar la eficacia de la nisina en biofilms maduros de *L. parabuchneri* y su posible relación con cambios estructurales que puedan tener lugar durante su maduración.

7. CONCLUSIONES

1. Las cepas de *L. parabuchneri* productoras de histamina IPLA11151, IPLA11150, IPLA11129, IPLA11125, IPLA11122 e IPLA11117 formaron biofilms en placas de poliestireno.
2. Las cepas IPLA11151, IPLA11150 e IPLA11129 se clasificaron como formadoras fuertes de biofilms; la cepa IPLA11125 como formadora moderada; y las cepas IPLA11122 e IPLA11117 como formadoras débiles.
3. La nisina presentó una actividad bactericida mayor que la bacteriocina AS-48 sobre todas las cepas de *L. parabuchneri* ensayadas.
4. El tratamiento con nisina resultó eficaz para prevenir la formación de biofilms en poliestireno de las cepas IPLA11150 e IPLA11129 productoras fuertes de biofilms. La cantidad de biofilm de IPLA11150 en los pocillos con el tratamiento preventivo fue 6 veces menor que en los pocillos control; en IPLA11129 fue 3,5 veces menor.
5. El tratamiento con nisina resultó eficaz para eliminar biofilms de las cepas IPLA11150 e IPLA11129 establecidos en poliestireno, causando una reducción del 50% y 83% respectivamente, en relación con el biofilm formado en ausencia del tratamiento.
6. Los biofilms formados por la cepa IPLA11150 mostraron una mayor complejidad estructural que los biofilms formados por la cepa IPLA11129, lo que podría explicar la menor eficiencia de la nisina para eliminarlos, en comparación con los biofilms de IPLA11129.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, M. A., & Moreno-Arribas, M. V. (2014). The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science & Technology*, 39(2), 146-155.
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2939-2951.

- Andre, C., Pimentel-Filho, N. D. J., de Almeida Costa, P. M., & Venetti, M. C. D. (2019). Changes in the composition and architecture of staphylococcal biofilm by nisin. *Brazilian Journal of Microbiology* 50(4), 1083-1090.
- Ascone, P., Maurer, J., Haldemann, J., Irmeler, S., Berthoud, H., Portmann, R., . . . & Wechsler, D. (2017). Prevalence and diversity of histamine-forming *Lactobacillus parabuchneri* strains in raw milk and cheese—A case study. *International Dairy Journal*, 70, 26-33.
- Benavent-Gil, Y., Berbegal, C., Lucio, O., Pardo, I., & Ferrer, S. (2016). A new fear in wine: Isolation of *Staphylococcus epidermidis* histamine producer. *Food Control*, 62, 142-149.
- Berthoud, H., Wüthrich, D., Bruggmann, R., Wechsler, D., Fröhlich-Wyder, M.-T., & Irmeler, S. (2017). Development of new methods for the quantitative detection and typing of *Lactobacillus parabuchneri* in dairy products. *International Dairy Journal*, 70, 65-71.
- Comisión Europea (CE) (2005). Commission Regulation (EC) N° 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L338, 1–26.
- del Rio, B., Redruello, B., Linares, D. M., Ladero, V., Fernandez, M., Martín, M. C., . . . & Alvarez, M. A. (2017). The dietary biogenic amines tyramine and histamine show synergistic toxicity towards intestinal cells in culture. *Food Chemistry*, 218, 249-255.
- Diaz, M., del Rio, B., Sanchez-Llana, E., Ladero, V., Redruello, B., Fernández, M., . . . & Alvarez, M. A. (2016a). Histamine-producing *Lactobacillus parabuchneri* strains isolated from grated cheese can form biofilms on stainless steel. *Food Microbiology*, 59, 85-91.
- Diaz, M., del Rio, B., Sanchez-Llana, E., Ladero, V., Redruello, B., Fernández, M., . . . & Alvarez, M. A. (2018). *Lactobacillus parabuchneri* produces histamine in refrigerated cheese at a temperature-dependent rate. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(10), 2342-2348.
- Diaz, M., Ladero, V., del Rio, B., Redruello, B., Fernández, M., Martín, M. C., & Alvarez, M. A. (2016c). Biofilm-forming capacity in biogenic amine-producing bacteria isolated from dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 7, 591.
- Diaz, M., Ladero, V., Redruello, B., Sanchez-Llana, E., del Rio, B., Fernandez, M., . . . & Alvarez, M. A. (2016b). A PCR-DGGE method for the identification of histamine-producing bacteria in cheese. *Food Control*, 63, 216-223.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA Journal*, 9(10), 2393-2486.

- Food & Drug Administration (FDA) (2001). Scombro toxin (histamine) formation. In *Fish and fishery products hazards and controls guide*. Washington, DC: P. H. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood.
- Garai, G., Dueñas, M. T., Irastorza, A., & Moreno-Arribas, M. V. (2007). Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. *Letters in Applied Microbiology*, 45(5), 473-478.
- Grande Burgos, M. J., Pulido, R. P., Del Carmen López Aguayo, M., Gálvez, A., & Lucas, R. (2014). The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 22706-22727.
- Gutiérrez, D., Fernández, L., Rodríguez, A., & García, P. (2019). Role of bacteriophages in the implementation of a sustainable dairy chain. *Frontiers in Microbiology*, 10, 12.
- Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2016). Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in Microbiology*, 7, 825.
- Hernández-Herrero, M. M., Roig-Sagués, A. X., Rodríguez-Jerez, J. J., & Mora-Ventura, M. T. (1999). Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *Journal of Food Protection*, 62(5), 509-514.
- Ibusquiza, P. S., Herrera, J. R., & Cabo, M. L. (2011). Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 28(3), 418-425.
- Joosten, H. L., & Nuñez, M. (1996). Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1178-1181.
- Jozala, A. F., Novaes, L. C. L., & Pessoa, A., Jr. (2015). Nisin. In V. Bobbarala (Ed.), *Concepts, compounds and the alternatives of antibacterials* (pp.103-119). Croatia: InTech. ISBN 978-953-51-2232-6.
- Ladero, V., Calles-Enríquez, M., Fernández, M., & Alvarez, M. A. (2010). Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6(2), 145-156.

- Ladero, V., Linares, D. M., Fernández, M., & Alvarez, M. A. (2008). Real time quantitative PCR detection of histamine-producing lactic acid bacteria in cheese: relation with histamine content. *Food Research International*, 41(10), 1015-1019.
- Ladero, V., Linares, D. M., Perez, M., del Rio, B., Fernandez, M., & Alvarez, M. A. (2017). Biogenic amines in dairy products. In A. Y. Tamime (Ed.). *Microbial Toxins in Dairy Products* (pp. 94–131). Wiley-Blackwell Publishing. ISBN 978-111-88-2365-1
- Landeta, G., de las Rivas, B., Carrascosa, A. V., & Muñoz, R. (2007). Screening of biogenic amine production by coagulase-negative staphylococci isolated during industrial Spanish dry-cured ham processes. *Meat Science*, 77(4), 556-561.
- Landete, J. M., Ferrer, S., & Pardo, I. (2005). Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine? *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 580-586.
- Linares, D. M., del Rio, B., Ladero, V., Martínez, N., Fernández, M., Martín, M. C., & Álvarez, M. A. (2012). Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 3, 180.
- Linares, D. M., del Rio, B., Redruello, B., Ladero, V., Martín, M. C., Fernandez, M., . . . & Alvarez, M. A. (2016). Comparative analysis of the *in vitro* cytotoxicity of the dietary biogenic amines tyramine and histamine. *Food Chemistry*, 197, 658-663.
- López, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(7), a000398.
- López, J. E., Ochoa, A., Santoyo, G., Anaya, J. L., Medina, E., Martínez, M., & Loeza, P. D. (2008). Bacteriocins of Gram positive bacteria: A potential source of new biomedical treatments. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39(3), 49-57.
- Martín, M. C., Fernández, M., Linares, D. M., & Alvarez, M. A. (2005). Sequencing, characterization and transcriptional analysis of the histidine decarboxylase operon of *Lactobacillus buchneri*. *Microbiology*, 151(4), 1219-1228.
- Minei, C. C., Gomes, B. C., Ratti, R. P., D'Angelis, C. M., & De Martinis, E. P. (2008). Influence of peroxyacetic acid and nisin and coculture with *Enterococcus faecium* on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of Food Protection* 71(3), 634-638.
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules*, 22(8), 1255.
- Pimentel-Filho N. D. J., Martins M. C. D. F., Nogueira, G. B., Mantovani, H. C., & Vanetti, M. C. D. (2014). Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to

polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. *International Journal of Food Microbiology*, 190, 1-8.

Reglamento (UE) N° 1129/2011 de la Comisión de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión.

Samyn, B., Martínez-Bueno, M., Devreese, B., Maqueda, M., Gálvez, A., Valdivia, E., . . . & Van Beeumen, J. (1994). The cyclic structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *FEBS Letters*, 352(1), 87-90.

Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., & Singh, R. (2017). Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *The Open Microbiology Journal*, 11, 53.

Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Bierbaum, G., de Kruijff, B., & Sahl, H.-G. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 1772-1779.