

Actividad antibacteriana DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Por: Daniela Arrijoja-Bretón · Emma Mani-López · Enrique Palou · Aurelio López-Malo

Actualmente existe una tendencia en la preferencia de los consumidores por elegir alimentos frescos y menos procesados, por lo que ha surgido el interés en buscar conservadores diferentes a los sintéticos y asegurar la inocuidad de los alimentos. Con este propósito se han estudiado algunos bioconservadores, entre los que destacan los aceites esenciales, enzimas y microorganismos (Beristain-Bauza et al., 2012, 2017; Mani-López et al., 2017). Entre estos últimos se encuentran las bacterias ácido-lácticas (BAL), las cuales, además de producir sabores, olores, texturas y cambios nutricionales en los alimentos,

también son conocidas por su capacidad de producir metabolitos secundarios tales como ácidos orgánicos, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, reuterina, diacetilo y alcohol etílico, entre otros. Varios estudios han demostrado que la aplicación directa de las BAL o de sus metabolitos inhiben bacterias indeseables en alimentos (Mani-López et al., 2018).

El objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad como antimicrobianos de diferentes cepas de BAL (sobrenadantes libres de células) contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* y *Listeria monocytogenes*. Se evaluó la actividad antimicrobiana mediante una prueba de difusión en pozos de los sobrenadantes de doce cepas de BAL.

METODOLOGÍA

Las cepas de las BAL (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NRRL B-633, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NRRL B-634, *Pediococcus acidilactici* NRRL B-1116, *Pediococcus pentosaceus* NRRL B-14009, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NRRL B-1118, *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917, *Lactobacillus fermentum* NRRL B-1932, *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171, *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496, *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495, *Lactobacillus casei* NRRL B-1922 y *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442), así como las cepas de las bacterias indicadoras (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29413, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 y *Listeria monocytogenes* Scott A) fueron obtenidas de la colección de cepas del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad de las Américas Puebla, y se mantuvieron a 5°C en agar MRS y en agar soya tripticaseína, respectivamente.

Los cultivos fueron preparados inoculando las cepas de las BAL en 30 mL de caldo MRS y las bacterias indicadoras en 10 mL de caldo soya tripticaseína, se incubaron a 35°C durante 24 h. Para la obtención del sobrenadante de las BAL, los cultivos fueron centrifugados durante diez minutos a 10,000 rpm. Posteriormente se filtraron al vacío a través de una membrana HVLP de 0.45 µm, para después concentrar hasta reducir el volumen a la décima parte del original, en un rotavapor a una temperatura de 70°C.

La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las BAL se evaluó a través de una prueba de difusión en pozos sobre placas de agar, la cual consiste en realizar una siembra por extensión de los microorganismos indicadores (10⁵ UFC/g) en cajas Petri con agar soya tripticaseína.

LAS CEPAS DE LAS BAL Y LAS CEPAS DE LAS BACTERIAS INDICADORAS

fueron obtenidas de la colección de cepas del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad de las Américas Puebla, y se mantuvieron a



EN AGAR MRS Y EN AGAR SOYA TRIPTICASEÍNA

los cultivos fueron preparados inoculando las cepas de las BAL en



DE CALDO MRS Y LAS BACTERIAS INDICADORAS EN



EN DE CALDO SOYA TRIPTICASEÍNA

SE INCUBARON A 35°C DURANTE 24 HORAS



	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29413	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	15.96 ± 2.27	12.96 ± 1.33	13.77 ± 1.67	15.55 ± 1.52
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	13.30 ± 1.43	13.78 ± 1.96	12.24 ± 3.28	14.91 ± 0.90
<i>Lb. acidophilus</i>	17.56 ± 0.89	14.06 ± 1.24	13.54 ± 2.51	15.74 ± 2.31
<i>Lb. casei</i>	16.43 ± 0.95	16.52 ± 1.84	17.17 ± 1.07	20.03 ± 4.00
<i>Lb. fermentum</i>	16.74 ± 3.93	13.71 ± 1.63	15.34 ± 3.11	16.62 ± 1.23
<i>Lb. plantarum</i>	20.53 ± 2.32	20.23 ± 2.03	24.89 ± 2.82	20.39 ± 3.57
<i>Lb. reuteri</i>	15.49 ± 3.08	16.42 ± 3.02	16.03 ± 3.24	18.77 ± 1.41
<i>Lb. rhamnosus</i>	21.83 ± 4.11	17.15 ± 3.58	18.89 ± 1.37	19.51 ± 1.47
<i>Lb. sakei</i>	22.77 ± 5.58	20.82 ± 2.95	20.91 ± 2.68	22.90 ± 2.93
<i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	-	-	-	12.49 ± 3.05
<i>Pediococcus acidilactici</i>	-	-	7.90 ± 0.10	7.80 ± 0.26
<i>Pediococcus</i> <i>pentosaceus</i>	16.66 ± 1.67	12.08 ± 1.18	13.04 ± 1.96	17.13 ± 4.47

-No se observaron halos de inhibición.

Tabla 1. Diámetro (mm) de los halos de inhibición generados por los sobrenadantes de diversas bacterias ácido lácticas contra algunos microorganismos indicadores.

ticaseína solidificado, posteriormente se realizaron cuatro perforaciones. En tres de los pozos se colocó el sobrenadante; en el cuarto se colocó caldo MRS concentrado, como control negativo. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y, posteriormente, se midió el diámetro de los halos de inhibición con un calibrador Vernier digital; se realizaron tres mediciones a cada uno de los halos de inhibición. Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

RESULTADOS

El efecto de los sobrenadantes de las doce BAL producto del crecimiento en un medio líquido, contra las diferentes bacterias indicadoras, se muestra en la tabla 1. Se puede observar que los sobrenadantes producidos por *Lb. plantarum* NRRL B-4496, *Lb. sakei* NRRL B-1917 y *Lb. rhamnosus* NRRL B-442 son los que presentaron halos de inhibición más grandes contra las bacterias indicadoras, siendo el sobrenadante de *Lb. plantarum* NRRL B-4496 el que presenta mayor inhibición contra *S. Typhimurium* ATCC 14028, mientras que para *S. aureus* ATCC 29413, *E. coli* ATCC 25922 y *L. monocytogenes* Scott A se

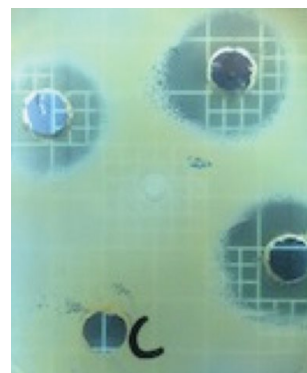


Figura 1. Prueba de difusión en pozos del sobrenadante de *Lb. sakei* NRRL B-1917 contra *L. monocytogenes* Scott A.

observó una mayor inhibición con los sobrenadantes producidos por *Lb. sakei* NRRL B-1917, esto puede ser debido a la presencia de metabolitos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, el diacetilo, entre otros (Anas et al., 2008). También se observó que, de las cuatro bacterias indicadoras, la más sensible a los sobrenadantes de las BAL estudiadas fue *L. monocytogenes* Scott A (figura 1).

De acuerdo con otros estudios semejantes, Anas et al. (2008) observaron que los sobrenadantes de *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* y *Lb. rhamnosus* son capaces de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, siendo los sobrenadantes de *Lb. plantarum* los que destacaron en la reducción de la población patógena. Beristain-Bauza et al. (2016, 2017) reportan que los sobrenadantes de *Lb. sakei* y *Lb. rhamnosus* tienen un efecto inhibitorio en la población de microorganismos patógenos Gram positivos y Gram negativos (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29413, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 y *Listeria monocytogenes* Scott A). Por otro lado, observaron que al

umentar la concentración de los sobrenadantes, la reducción logarítmica de los microorganismos patógenos es mayor.

Se puede concluir que los sobrenadantes obtenidos del crecimiento en un medio líquido de la mayoría de las bacterias ácido lácticas evaluadas, presentan inhibición contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los sobrenadantes que presentan mayor inhibición son los de las cepas de *Lb. sakei* NRRL B-1917 y *Lb. plantarum* NRRL B-4496, seguido de los sobrenadantes de *Lb. rhamnosus* NRRL B-442. Los sobrenadantes, producto del crecimiento de las bacterias ácido lácticas, podrían ser una alternativa de bio-conservadores, por lo que se requiere mayor investigación sobre su aplicación y comportamiento al ser añadidos en alimentos, así como su capacidad de inhibir o reducir la proliferación de diversos microorganismos patógenos, no sólo los estudiados en el presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Daniela Arrijoja-Bretón agradece a la Universidad de las Américas Puebla (UDLAP) por el financiamiento para sus estudios de Doctorado en Ciencia de Alimentos.

REFERENCIAS

- Anas, M., Eddine, H.J. y Mebrouk, K. (2008). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Dairy and Food Sciences*, 3(2), 39-49
- Beristain-Bauza, S.C. Palou, E., y López-Malo, A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), 64-78.
- Beristain-Bauza, S.C., Mani-López, E., Palou, E. y López-Malo, A. (2016). Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Control*, 62, 44-51.
- Beristain-Bauza, S.C., Mani-López, E., Palou, E. y López-Malo, A. (2017). Antimicrobial activity of whey protein films supplemented with *Lactobacillus sakei* cell-free supernatant on fresh beef. *Food Microbiology*, 62, 207-211.
- Mani-López, E., Palou, E. y López-Malo, A. (2018). Chapter 8: Biopreservatives as agents to prevent food spoilage. *Microbial Contamination and Food Degradation. Handbook of Food Bioengineering*. Volume 10. A.M. Grumezescu, A.M. Holban (Editors). Academic Press. pp. 235-270.



Daniela Arrijoja-Bretón
Estudió la Licenciatura en Nutrición y Ciencia de los Alimentos en la Universidad Iberoamericana (2011), actualmente es estudiante del Doctorado en Ciencia de Alimentos en la UDLAP. Su área de investigación es la microbiología de alimentos y estudia la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas como posible fuente de bioconservadores. daniela.arrijoabn@udlap.mx



Emma Mani-López
Doctora en Ciencia de los Alimentos por el Instituto Tecnológico de Veracruz, ingeniera de Alimentos y maestra en Ciencia de Alimentos por la UDLAP. Actualmente es investigadora en diversos proyectos financiados por la industria en vinculación con el Departamento de Ingeniería Química y Alimentos de la UDLAP. Es investigador nacional (CONACYT) actualmente SNI nivel 1, y sus intereses de investigación son los agentes antimicrobianos, bacteriocinas y su posible aplicación en alimentos. emma.mani@udlap.mx



Enrique Palou
Doctor en Ingeniería por la Universidad Estatal del Estado de Washington (EE.UU.) y catedrático del Departamento de Ingeniería Química y Alimentos en la UDLAP desde 1992. Tiene más de 170 publicaciones científicas en el área de ciencia, tecnología e ingeniería de alimentos. Es investigador nacional (SNI) nivel 3, *Fellow* del Institute of Food Technologists, miembro de la Academia Mexicana de Ciencias y de la Academia de Ingeniería. enrique.palou@udlap.mx



Aurelio López-Malo
Doctor en Química (Alimentos) por la Universidad de Buenos Aires (Argentina) y profesor del Departamento de Ingeniería Química y Alimentos de la UDLAP desde 1987. Ha publicado más de doscientos artículos científicos en revistas indizadas de prestigio internacional en el área de ciencia, tecnología e ingeniería de alimentos. Desde 1998 es investigador nacional (CONACYT) actualmente SNI nivel 3, y es miembro de la Academia Mexicana de Ciencias. aurelio.lopezm@udlap.mx