

EMPLEO DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS* COMO CULTIVO BIOPROTECTOR. PARTE I.

Tatiana Beldarraín*, Yamilé Moya, Soraya Piloto, Yamira Cerero, Áster Bruselas, Ramón Santos, María Aloida Guerra, Zobeida Frómata, Frank Rodríguez, Norma Vergara, Cecilia Carrillo y Carmen Casaña

Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia
Carretera al Guatao, km 3 ½, La Habana, Cuba, CP 19 200
E-mail: tatiana@iiaa.edu.cu

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar la competitividad de cepa de *Lactobacillus acidophilus* LA16 frente a *Salmonella typhimurium* *in vitro*. Para ello se empleó el método de la doble capa. Se realizó un diseño experimental con una variable, el efecto de la temperatura y para ello se incubaron los microorganismos a 2 temperaturas: $18\pm 2^\circ\text{C}$ y $30\pm 1^\circ\text{C}$ en aras de determinar si no existía diferencia significativa en el comportamiento de *Lactobacillus acidophilus* LA16 y para ello se midió el halo transparente formado cada 24 h durante dos semanas y se realizaron tres réplicas experimentales de esta prueba. Los resultados obtenidos en este trabajo señalan a *Lactobacillus acidophilus* LA16 como un cultivo bioprotector adecuado para el control de *Salmonella typhimurium* en chorizo elaborado en condiciones artesanales, pues garantiza una disminución paulatina del pH a valores inferiores a 5,5 y una actividad de agua de 0,85.

Palabras clave: cultivo bioprotector, competitividad, *Salmonella typhimurium*.

ABSTRACT

Use of *Lactobacillus Acidophilus* as bioprotective culture

The competitiveness of *Lactobacillus acidophilus* LA16 in front of *Salmonella typhimurium* *in vitro* was studied. It was carried out an experimental design with a variable, the effect of the temperature and for they were incubated it the microorganisms to 2 temperatures: $18\pm 2^\circ\text{C}$ and $30\pm 1^\circ\text{C}$ for the sake of determining if significant difference didn't exist in the behavior of *Lactobacillus acidophilus* LA16 and for it was measured it the formed transparent halo each 24 h during 2 weeks and they were carried out 3 experimental replicas of this test. The results obtained in this work point out *Lactobacillus acidophilus* LA16 like a cultivation appropriate bioprotector for the control of *Salmonella typhimurium* in sausage elaborated since under handmade conditions it guarantees a gradual decrease from the pH to inferior values to 5.5 and an activity of water of 0.85.

Key words: I cultivate bioprotector, competitiveness, *Salmonella typhimurium*.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se asocian con la carne y muestran su efecto antagónico contra organismos patógenos y del deterioro. Su empleo para este fin ha ido ganando adeptos en esta década. Las BAL se consideran microorganismos GRAS (generalmente conocidos como seguros) pero su uso sólo puede ir acompañado de buenas prácticas de manufactura pues no esconden malas prácticas o una higiene dudosa (1). El empleo de estos cultivos protectores o sus metabolitos (los ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, enzimas y bacteriocinas) se conoce como biopreservación (2).

***Tatiana Beldarraín Iznaga:** Licenciada en Microbiología (UH, 1996). Especialista en Carne y Productos Cárnicos (IIIA, 1999). Máster en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (IFAL, 2006). Investigador Agregado del grupo de Ciencias de la Vicedirección de Carne. Labora en la Calidad Microbiológica de Productos Cárnicos e Higiene de Plantas Procesadoras de Alimentos.

La mayoría de los estudios han demostrado la capacidad de las BAL de inhibir el crecimiento de un patógeno emergente, *Listeria monocytogenes* (3-7), sin embargo, en los estudios realizados se explica poco del efecto que pudieran tener estas BAL sobre microorganismos del deterioro como las enterobacterias y sobre un patógeno de gran importancia para la salud, *Salmonella sp.* El objetivo de este trabajo fue estudiar la competitividad de cepa de lactobacilo frente a *Salmonella sp.* en chorizo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplimentar este objetivo se eligió la cepa *Lactobacillus acidophilus* LA16, proveniente del banco del IIIA y de la que se conocen sus propiedades probióticas (8). Se eligió esta BAL porque se habían evaluado sus propiedades como cultivo iniciador para productos cárnicos y, al ser una cepa productora de alta acidez así como los efectos que tiene sobre el pH, podría ser empleada como cultivo iniciador en un chorizo (9).

El cultivo de *L. acidophilus* LA16 se recibió en medio Agar Leche y se reactivó mediante siembra en caldo APT (10) dos veces por semana. Luego se incubó a 30 °C durante 16-24 h y se conservó en refrigeración entre resiembras consecutivas. Además, para garantizar el control de la composición del cultivo se realizaron exámenes microscópicos mediante tinción simple en azul de metileno (11).

Para este trabajo se eligió *Salmonella typhimurium*, patógeno de importancia para la salud humana (8). Este se recibió en tubo de agar inclinado procedente del banco de cepas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Para su reactivación se sembró en medio caldo nutriente (10) y se incubó durante 18 a 24 h a 30 °C, para garantizar que el microorganismo alcanzara la fase logarítmica de crecimiento al ser inoculada.

Para evaluar la competitividad de la cepa de *Lactobacillus acidophilus* LA16 frente a *Salmonella typhimurium in vitro*, se empleó el método de la doble capa (1,12). Para ello se tomó una placa estéril con 10 mL de agar para conteo en placas (ACP) a la que se inoculó 1 mL de la cepa antagonista (*Lactococcus acidophilus* LA16) y se mantuvo en incubación du-

rante 24 h para garantizar que la cepa estuviera en fase de crecimiento exponencial. Al cabo de ese tiempo se inoculó 1mL de la cepa de *Salmonella typhimurium* previamente reactivada en caldo nutriente y con 24 h de incubación. Después se vertieron 10 mL del medio estéril ACP para cubrir la placa y se dejó incubar para medir el tamaño de la zona transparente (1,12-14).

Se realizó un diseño experimental con una variable, el efecto de la temperatura y para ello se incubaron los microorganismos a dos temperaturas: 18 ± 2 °C y 30 ± 1 °C en aras de determinar si no existía diferencia significativa en el comportamiento de *Lactobacillus acidophilus* LA16. Se eligieron ambos rangos de temperatura porque esta BAL es un microorganismo mesófilo y las condiciones reales de fermentación del chorizo eran de 18 ± 2 °C. El halo transparente se midió cada 24 h durante dos semanas y se realizaron tres réplicas experimentales de esta prueba.

Se realizaron, además, determinaciones de conteo de lactobacilos (Agar dextrosa triptona, 18 a 24 h, 30 °C) y de *Salmonella sp.*, en medio cromogénico Cromocen AGN siguiendo las indicaciones del productor (2).

Para conocer la influencia que tenía *L. acidophilus* LA16 sobre *Salmonella typhimurium* a ambos rangos de temperatura se tomó como variable respuesta el tamaño del halo (mm) y se evaluó mediante un análisis de varianza de clasificación simple y prueba de comparación de rangos múltiples de *Duncan*, ambos para $p\leq 0,05$. Con el objetivo de conocer si la temperatura tenía efecto sobre los conteos de lactobacilos y de *Salmonella sp.*, se realizó un análisis de varianza y prueba de comparación de rangos múltiples de *Duncan*, ambos para $p\leq 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Fig. 1 muestra los resultados medios de la evaluación de la capacidad de *L.acidophilus* de inhibir *Salmonella typhimurium in vitro*. No existe diferencia significativa ($p\leq 0,05$) en el tamaño del halo a ambas temperaturas, por lo que cabría esperar que en las condiciones de fermentación del chorizo las BAL tuvieran igual comportamiento.

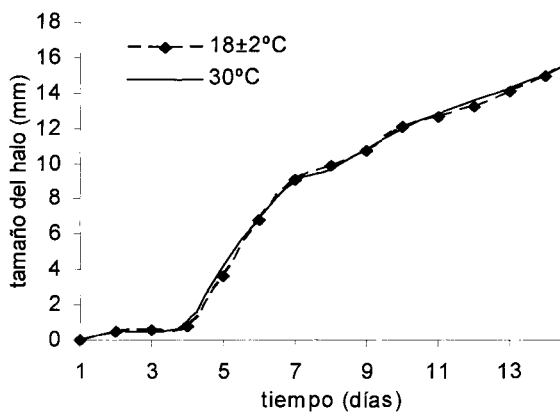


Fig 1.- Resultados medios de la capacidad de *L.acidophilus* de inhibir a *Salmonella ty phimurium* "in vitro"

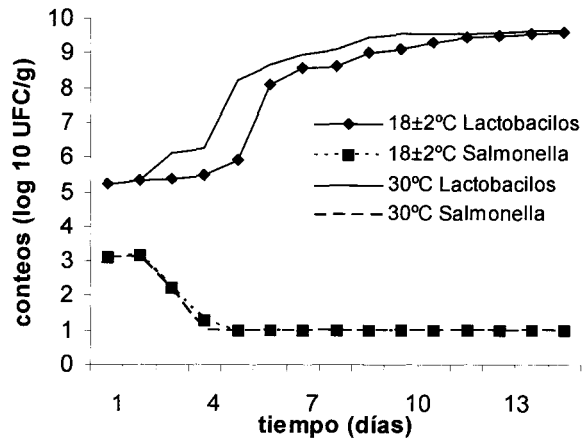


Fig 2.- Resultados medios de los conteos de lactobacilos y *Salmonella sp* "in Vitro" a ambas temperaturas.

Entre los días 4 y 7, para ambas temperaturas de incubación, hay un aumento de la capacidad inhibitoria de *Lactobacillus acidophilus* frente a *Salmonella typhimurium*. Este comportamiento podría deberse a la habilidad que poseen las BAL de producir ácido láctico y acético que es incompatible con la actividad y sobrevivencia de bacterias patógenas como *Salmonella sp* así como a su capacidad de producir otras sustancias antimicrobianas como peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono y bacteriocinas. Resultados similares obtuvieron otros autores al probar la actividad antagonica de bacterias lácticas contra cepas patógenas en leches fermentadas (8).

La Fig. 2 muestra los resultados medios de los conteos de lactobacilos y *Salmonella sp* a las temperaturas estudiadas y a diferentes tiempos. Conforme pasa el tiempo hay un aumento significativo a $p \leq 0,05$ de 4 unidades logarítmicas del conteo de *Lactobacillus acidophilus* LA16 respecto al inicio del estudio, que como es un microorganismo mesófilo y de lento crecimiento, alcanza conteos máximos a partir de los siete días para 30 °C y a partir de los nueve para 18 °C. Este aumento es independiente de la temperatura, pero si depende del tiempo de incubación. Al comparar el comportamiento de este microorganismo a ambas temperaturas, se observa que hay diferencias significativas para $p \leq 0,05$, pero esto se compensa con el hecho de que, aunque 18 °C no es su temperatura óptima de crecimiento y demora un tiempo más en fase de latencia, se obtiene un aumento de la masa celular.

Para ambas temperaturas hay una disminución de los conteos de *Salmonella typhimurium*, o sea, que existen diferencias significativas a $p \leq 0,05$ entre los conteos de *Salmonella sp* al inicio y al final del estudio. Para ambas temperaturas la disminución es de 2 unidades log. Sin embargo, existen también diferencias significativas en el tiempo en que *Lactobacillus acidophilus* inhibe al patógeno, pues a 30 °C esta disminución ocurre entre el tercer y el cuarto día mientras que a 18 °C ocurre entre el cuarto y el quinto. A los efectos del control del patógeno se observa que hay una marcada competitividad entre las BAL y el patógeno, que es independiente de la temperatura de incubación.

CONCLUSIONES

A escala de laboratorio se observa marcada competitividad de *Lactobacillus acidophilus* LA16 frente a *Salmonella typhimurium* a temperaturas de incubación de 18 ± 2 °C y 30 °C. El antagonismo existente entre ambas cepas es independiente de la temperatura pero depende del tiempo de incubación.

REFERENCIAS

1. Anón. Metodología para la determinación de bacteriocinas en carne y productos cárnicos. [hppt:// biblioteca.iiia.cu/2002](http://biblioteca.iiia.cu/2002).
2. Anón. Catálogo BioCen, La Habana, 2004.
3. Beldarraín, T.; Cepero, Y.; Bruselas, A.; Santos, R.; Ramos, M.; Moya, Y.; Núñez, M. y Vergara, N. Evaluación de cepas lácticas como cultivo iniciador en productos cárnicos. Monografía no publicada IIIA, La Habana, 2006.
4. Bredholt, S.; Nesbakken, T. y Holck, A. *Int J Food Microbiol* 66: 191-196, 2001.
5. Budde, B. ; Hornbæk, T. ; Jacobsen, T. ; Barkholt, V. y Koch, A. *Int J Food Microbiol* 83: 171-184, 2003.
6. Castellano, P. y Vignolo, G. Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins. *Letters in Applied Microbiology*. En impresión, 2006.
7. Fernández, M. y Fragoso, L. Actividad antagónica de bacterias lácticas contra cepas patógenas. *Tecnología láctea latinoamericana* 30: 51-54, 2003.
8. García, J. ; Romay, Z. ; Rojas, T. y Guerra, G. *Manual Práctico de Microbiología*. Ed Universidad de La Habana, 1981, 212 pp.
9. Guerra, N. y Pastrana, L. *Process Biochem* 37: 1005-1015, 2002.
10. Hugas, M.; Pages, F.; Garriga, M. y Monfort, J. *Food Microbiol* 15: 639-650, 1998.
11. Jacobsen, T. ; Budde, B. y Koch, A. *J Appl Microbiol* 95: 242-249, 2003.
12. Katikou, P. ; Ambrosiadis, I. ; Georgantelis, D. ; Koidis, P. y Georgakis, S.A. *J. Applied Microb* 99: 1303-1313, 2005.
13. Lücke, F. *Meat Sci* 56: 105-115, 2000.
14. Mataragas, M.; Drosinos, E. y Metaxopoulos, J. *Food Microbiol* 20: 259-265, 2003.
15. Miranda, A. Estudios de embutidos con cultivos iniciadores y ácidos orgánicos. (tesis entregada en opción al título de Ingeniera Pecuaria. Instituto de Ciencias Agropecuarias de La Habana) 1981, 25 pp.
16. NC 357 *Carne y productos cárnicos. Determinación del contenido de nitrito*, 2004.
17. NC ISO 2917 *Carne y productos cárnicos. Medición del pH. Método de referencia*, 2004.
18. NC-ISO 1442 *Carne y productos cárnicos. Determinación del contenido de humedad: método de referencia*, 2002.
19. NC-ISO 1841-1 *Carne y productos cárnicos. Determinación del contenido de cloruro - parte 1: método de Volhard*, 2004.
20. Simonsen, B. ; Bryan, F. ; Christin, J. ; Roberts, T.A. *Int J Food Microbiol* 67: 227-230, 1987.
21. Valladares, C. ; Roca, M. ; Ramos, M. ; Ramos, R. y González, E. Efecto del proceso tecnológico sobre la *Salmonella sp* en productos crudos fermentados tipo español. Monografía no publicada. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia, 1991.
22. Vermeiren, L. ; Devlieghere, F. y Debevere, J. *Int J Food Microbiol* 96: 149-164, 2004.