

EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO BACTERICIDA DE CEPAS NATIVAS DE *Lactobacillus* sp. CONTRA *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*

Ana Cristina Estrada Maldonado¹; Luz Adriana Gutiérrez Ramírez² y Olga Inés Montoya Campuzano³

RESUMEN

*En esta investigación se trabajó con dos cepas nativas de **Lactobacillus plantarum** y **Lactobacillus brevis**, aisladas de productos fermentados; estas crecen en medios de cultivo y producen un extracto complejo de ácidos orgánicos y péptidos con actividad bactericida. Los extractos de estas cepas mostraron capacidad bactericida frente a **Salmonella** sp. y **Escherichia coli**. Los ensayos para determinar su acción se realizaron con el extracto crudo y centrifugado provenientes de cada una de las cepas, a diferentes tiempos de almacenamiento, temperatura y pH. Se observó una mejor actividad antibacteriana y estabilidad de la actividad, en el extracto crudo almacenado a temperatura de 0°C y 4°C. A pH 5.5 se presentó la mejor actividad en los dos extractos frente a las cepas de estudio. Se concluyó que los extractos sintetizados por ambas cepas tienen un alto potencial bactericida contra estas dos patógenos que son responsables de toxi-infecciones alimentarias.*

Palabras claves: *Actividad antagónica, bacterias ácido lácticas, organismos indicadores, alimentos fermentados, cepas nativas, actividad bactericida.*

¹ Bacterióloga y Laboratorista Clínico. Calle 32 E No. 78-42. Edificio Torreón Real. Medellín, Colombia. <estradama@epm.net.co>

² Profesora Cátedra. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Escuela de Biociencias. Facultad de Ciencias. A.A. 3840, Medellín, Colombia. <magutier@edatel.net.co>

³ Profesora Asociada. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Escuela de Biociencias. Facultad de Ciencias. A.A. 3840, Medellín, Colombia. <oimontoy@unalmed.edu.co>

ABSTRACT

***In vitro* EVALUATION OF THE BACTERICIDAL EFFECT OF NATIVE STOCKS OF *Lactobacillus* sp. AGAINST *Salmonella* sp. AND *Echerichia coli*.**

*In this investigation, two native stocks of **Lactobacillus plantarum** and **Lactobacillus brevis** isolated from fermented products were studied; these grow in culture media and produce a complex extract of organic acids and peptides with bactericidal activity. The extracts of these stocks showed bactericidal capacity with **Salmonella** sp. and **Escherichia coli**. The tests to determine their action were made with crude and centrifuged extract originating of each one of the stocks, with different storage times, temperatures and pHs. A superior antibacterial activity and stability of the activity was observed in the crude extract stored in temperatures of 0°C and 4°C. With pH 5,5 the best activity of the two extracts against the study stocks was obtained. It is concluded that the extracts synthesized by both stocks have a high bactericidal potential against these two pathogens that are responsible for nutritional toxi-infections.*

Key words: *Antagonistic activity, lactic acid bacteria, indicator organisms, fermented foods, native stocks, bactericidal activity*

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL), han estado presentes en la alimentación desde hace siglos; se encuentran en productos fermentados como la leche y derivados, productos cárnicos y vegetales; las cuales proporcionan sabor y textura e incrementan el valor nutricional de los alimentos (Mateos, 2002). Estos microorganismos cuando fermentan carbohidratos producen una mezcla de sustancias con acción antimicrobiana como: ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y péptidos de bajo peso molecular llamados bacteriocinas, que generan cambios en la microbiota intestinal como la inhibición de patógenos; lo cual repercute positivamente en el estado de salud del consumidor (Casas y Dobrogosz, 2000).

Entre los géneros de bacterias ácido lácticas mas utilizadas para el consumo humano se encuentran los siguientes: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, entre otros (Farnworth, 2001). El género *Lactobacillus* son microorganismos reconocidos por su habilidad fermentativa e iniciadores en procesos industriales de productos fermentados; su presencia en el tubo digestivo es considerada benéfica, por tener un papel protector o terapéutico (Jiang; Mustapha y Savaiano, 1996). Ellos previenen la enfermedad de Crohn's (inflamación del colon), el cáncer de colon, disminuyen el colesterol (Guarner y Malagelada, 2002) previenen o reducen los efectos de la diarrea, constipación, las toxi - infecciones alimentarias, e infecciones urinarias. Por lo anterior, son considerados probióticos. (Walker y Duffy, 1998).

Debido a las características fisiológicas y bioquímicas de las BAL, su uso en la conservación de los alimentos, permitirá disminuir el empleo de preservativos químicos adicionados a estos. Estas ventajas han hecho que los *Lactobacillus* sean considerados como bacterias nutracéuticas, por su valor nutricional y farmacéutico (Cintas; Casaus y Hernández, 2000).

En la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín se han aislado cepas nativas de *Lactobacillus* con efecto probiótico (Salazar, 2003). Sin embargo, las propiedades y caracterización del extracto producido por estas bacterias, aun no ha sido analizado como sustancia bactericidas.

Este trabajo tuvo como objetivo determinar la capacidad bactericida de los extractos crudos y centrifugados obtenidos de cepas nativas de *Lactobacillus* para inhibir el crecimiento de bacterias como *Salmonella* sp y *Escherichia coli*.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas y cultivos. Se utilizaron 2 cepas nativas de *Lactobacillus*. *L. plantarum* y *L. brevis* aisladas de varios productos fermentados y cultivadas en agar MRS (Merck) bajo condiciones anaeróbicas a 30 °C por 72 h (Salazar, 2003), proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología Industrial de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Las cepas utilizadas como microorganismos indicadores fueron *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*, caracterizadas utilizando API 20E System (BioMérieux), éstas fueron donadas por el Laboratorio Departamental de Salud Pública, Medellín.

Producción del extracto. Las cepas de *Lactobacillus* fueron cultivadas en 20 ml de caldo MRS por 72 h a 30 °C anaeróticamente. El extracto se obtuvo del sobrenadante, y se dividió en dos porciones en tubos estériles; una de ellas se centrifugó a (10.000 rpm/4 °C/10 min) y la otra porción se utilizó como extracto crudo.

Detección de la actividad bactericida. La actividad bactericida, se midió por el método de difusión en pozos con algunas modificaciones (Montville *et al.*, 1999). Se tomaron cajas de petri con agar MRS se hicieron 4 pozos y se adicionaron 70 µl de extracto crudo y centrifugado en cada pozo.

Los cultivos de las bacterias indicadoras se diluyeron hasta alcanzar una concentración de $1,5 \times 10^{-12}$ bacterias, según el patrón de Mc Farland. Se adicionan 15 µl de la dilución de bacterias por cada tubo de 15 mL de Trypticase Soya semisólido (Merck) para formar una sobrecapa posteriormente se incubaron a 30 °C/ 48 h.

Se detectó la actividad bactericida por la presencia de una zona clara de inhibición alrededor del pozo y se consideró inhibición cuando la medida del halo era mayor a 2 mm.

Caracterización del extracto. El extracto crudo y centrifugado se evaluó de acuerdo a la actividad bactericida frente al almacenamiento, temperatura y pH.

Estabilidad del extracto a diferentes temperaturas de almacenamiento. Los extractos fueron almacenados a 25, 4 y 0°C durante 30 días, y semanalmente se evaluó la efectividad del extracto en

el tiempo y temperatura del almacenamiento.

Sensibilidad al pH. Se ajustó con ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH), 1,5 ml de extracto crudo y centrifugado (Ten Brink *et al.*, 1994).

RESULTADOS

Las pruebas realizadas a los extractos se evaluaron desde el tiempo 0; momento en el cual el extracto se sometió por primera vez a las temperaturas pro-puestas. Se observó una alta variabilidad, debido al choque térmico, que pudieron ocasionar las diferentes temperaturas sobre la actividad de los extractos, por esta razón se determinó hacer evaluaciones cada 10 días.

Aunque, el extracto crudo obtenido de *Lactobacillus plantarum* fue estable en el tiempo de estudio frente a *Salmonella*; a las diferentes temperaturas; se lograron observar pequeñas variabilidades así: a 4 °C, la actividad bactericida disminuyó desde el día 10 hasta el día 30. En cambio a 25 °C la actividad bactericida permaneció constante hasta el día 20 disminuyendo fuertemente al día 30, esta temperatura favoreció el crecimiento de células vegetativas, impidiendo una buena observación. El extracto del *Lactobacillus brevis* se comportó de manera diferente frente a la misma bacteria indicadora, a 0 °C la actividad fue estable durante todo el tiempo de estudio a 4 °C, disminuyó en el día 20 y permaneció estable hasta el día 30; sin embargo, a 25 °C se registró una inestabilidad caracterizada por un aumento hacia el día 20 y una disminución drástica en el día 30. (Figura 1).

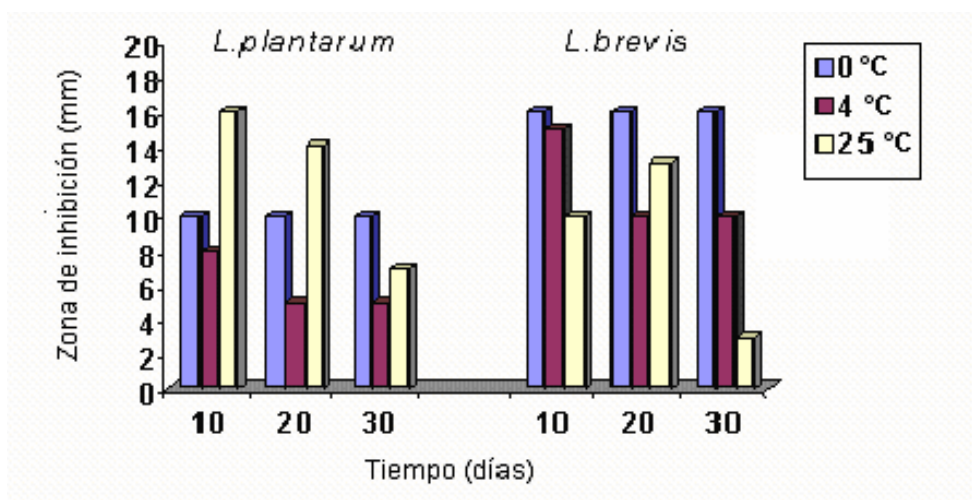


Figura 1. Efecto de la temperatura y almacenamiento del extracto crudo de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. sobre *Salmonella* sp.

En la Figura 2, se grafican los resultados obtenidos de los extractos centrifugados de *L. plantarum* y *L. brevis* vs *Salmonella* sp. Se observa que la actividad del extracto de *L. plantarum* a 0 °C fue mayor a los 10 días y disminuye con el tiempo de estudio. A 25 °C, se aprecia

actividad hasta el día 20 y un descenso al final del tiempo de estudio; a 4 °C la actividad fue estable. Con el extracto de *L. brevis* es evidente un aumento de la actividad durante el tiempo de estudio en las diferentes temperaturas de almacenamiento.

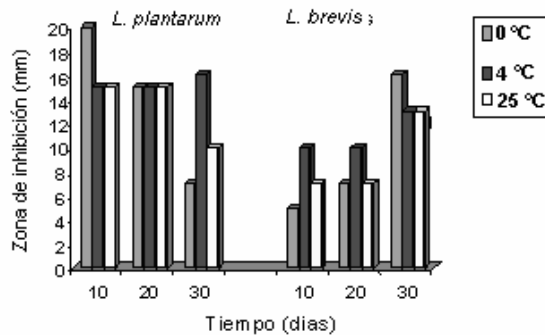


Figura 2. Efecto de la temperatura y almacenamiento de los extractos centrifugados de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. sobre *Salmonella* sp.

En la Figura 3 se encuentran los resultados obtenidos de los extractos crudos frente a *E. coli*. El comportamiento de la actividad es similar a temperaturas de 0 y 25 °C durante el tiempo de estudio, encontrándose una mejor actividad al día 10; lo contrario ocurre a 4 °C donde la

actividad inhibitoria es mucho menor y disminuye con el tiempo. El extracto *L. brevis* mostró un comportamiento muy parecido a las diferentes temperaturas durante el tiempo de estudio, en el cual a 0 °C, se observó la mejor actividad y la menor al día 30 a 4 °C.

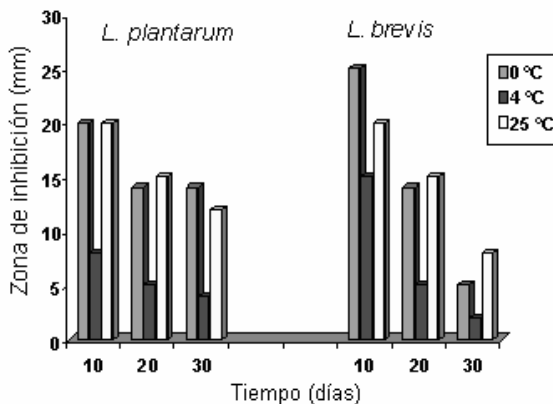


Figura 3. Efecto de la temperatura y almacenamiento de los extractos crudos de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. sobre *E. coli*.

Cuando se trabajó con los extractos centrifugados, de ambos microorganismos frente a *E. coli* se observó que las mejores actividades se dieron con el extracto de *L. plantarum* hasta el día 20 en las tres temperaturas, permaneciendo estable a 25 °C al final del estudio y decayendo fuertemente a 0 °C y 4 °C. El

comportamiento de los extractos obtenidos de *L. brevis* mostró inestabilidad de la actividad durante el tiempo de estudio, observándose la mejor actividad y estabilidad a los 25 °C en tanto que a los 0 °C no presentó ningún halo de inhibición al final de la evaluación. (Figura 4).

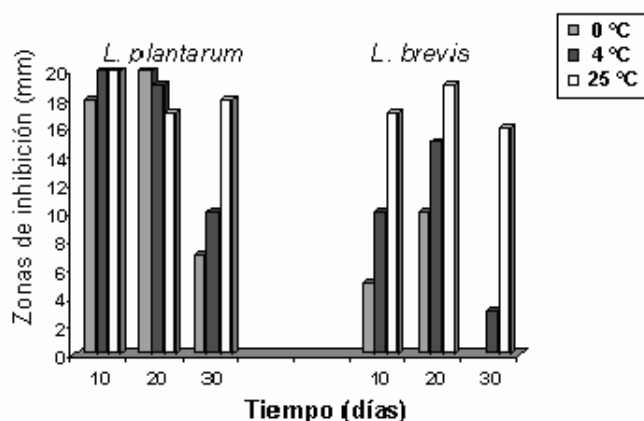


Figura 4. Efecto de la temperatura y almacenamiento de los extractos centrifugados de cepas de *Lactobacillus* sp. sobre *E. coli*.

Para determinar el efecto del pH del extracto sobre la actividad inhibitoria de las cepas de *Lactobacillus*, éstos fueron sometidos a 3 valores de pH: 3,5; 4,5 Y 5,5. El pH óptimo para la

actividad del sustrato en el control de *Salmonella* sp. y *E. coli* fue de 5,5; sin embargo, durante el estudio, la actividad no se vió afectada con los otros pHs (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Efecto del pH en la actividad bactericida sobre *Salmonella* sp. y *E. coli* del extracto de *Lactobacillus plantarum*.

pH	<i>Salmonella</i> sp		<i>E. coli</i>	
	Extracto crudo	Extracto centrifugado	Extracto crudo	Extracto centrifugado
3,5	10	2	17	12
4,5	10	5	8	5
5,5	12	14	10	9

Tabla 2. Efecto del pH en la actividad bactericida sobre *Salmonella* sp. y *E. coli* del extracto de *Lactobacillus brevis*.

pH	<i>Salmonella</i> sp		<i>E. coli</i>	
	Extracto crudo	Extracto centrifugado	Extracto crudo	Extracto centrifugado
3,5	5	5	22	8
4,5	13	8	10	4
5,5	20	16	8	16

DISCUSION

Al comparar la actividad bactericida de los extractos crudos y centrifugados obtenidos de las dos cepas, se puede afirmar que presentan actividad bactericida sobre las dos bacterias de estudio; sin embargo, las medidas fueron muy heterogéneas, con valores de 25 mm con el extracto crudo de *L. brevis* a 0 °C y sin ningún medida a 0 °C con el extracto centrifugado de *L. brevis*. Aunque las mejores actividades se observaron con los extractos crudos, los resultados de estos se vieron afectados por la presencia de células vegetativas, lo que dificultó medir exactamente los halos de inhibición.

En la evaluación con los extractos centrifugados de *L. plantarum* frente a *Salmonella* y *E. coli* se observó un comportamiento muy similar, presentándose una disminución de la actividad con el tiempo, concluyendo que 0 °C es una temperatura buena de almacenamiento, no solo para la estabilidad del extracto, sino también para la actividad frente a estos microorganismos. Ogunbanwo; Sanni y Onilude (2003 a) obtuvieron resultados similares, donde el extracto a temperaturas de congelación conserva mas

sus cualidades y estructura. Aunque a 25 °C hay una buena actividad y estabilidad a lo largo del estudio, se presentó crecimiento de células, (Klaenhammer y Todd, 1983), por esto a esta temperatura se observó un aumento en el número de colonias de *Lactobacillus* en el medio, generando serios problemas en la observación de los halos de inhibición.

Cuando se trabajó con el extracto de *L. brevis*, el nivel de estabilidad e inhibición a 0 °C se mantuvo alto en el tiempo frente a *Salmonella*, lo que corrobora trabajos realizados por Cintas; Casans y Hernández (2000), donde se describe la capacidad bactericida de estos extractos a temperaturas de congelación en alimentos, frente a bacterias gram negativas, especialmente *Salmonella* sp.

La evaluación de pH se realizó en escala ácida; por que trabajos previos (Reddy *et al.*, 1984; Abdel-Bar; Harris y Rill, 1987) demostraron que a un pH básico se pierde totalmente la actividad bactericida. El pH 5,5, presentó mejor nivel de inhibición, aunque a pHs de 3,5 y 4,5 también se encontró actividad lo que concuerda con Ogunbanwo; Sanni y Onilude (2003b).

Según Fricourt *et al.* (1994), las bacterias ácido lácticas sintetizan agentes antibacteriales, que varían en el espectro de actividad; en este trabajo, se corroboran los resultados anteriores. Esta investigación servirá de apoyo en la aplicación de bioconservantes alimentarios en la industria láctea y cárnica

En conclusión se pudo comprobar que los extractos obtenidos de los *L. plantarum* y *L. brevis* presentan una acción bactericida frente a *Salmonella* y *E. coli*; teniendo una mejor acción inhibitoria los extractos crudos producidos por la *L. plantarum* y mantenidos a temperatura de 0 °C y 4 °C.

BIBLIOGRAFÍA

ABDEL-BAR, N.; HARRIS, N. D and RILL, R. L. Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Err.* Journal of Food Science. Vol. 52 (1987); p. 411-415.

CASAS, I. A and DOBROGOSZ, W. J. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus casei* confers broad spectrum protection against disease in humans and animals *Err.* Microbial Ecology of Health Disease. Vol.12 (2000); p. 47-285.

CINTAS, L. M.; CASAUS, P. y HERNÁNDEZ, P. E. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas (I y II). *Err.* Alimentación, Equipos y Tecnología. Vol. 19, No.7 (Sep., 2000); p. 109-119.

FARNWORTH, E. R. Probiotics and prebiotics. *Err.* Handbook of nutraceutical and functional foods. Vol. 25 (2001); p. 407-422.

FRICOURT, B.V. *et al.* Detection and activity of Plantaricin F an antibacterial substance from *Lactobacillus plantarum* BFOO1 isolated from processed channel catfish. *Err.* Journal of Food Protection. Vol. 37, No.8 (1994); p. 698-708.

GUARNER, F. and MALAGELADA, J. R. Ecología intestinal: modulación mediante probióticos. *Err.* ORTEGA, R. M. *et al.* Alimentos funcionales probióticos. Madrid: Médica Panamericana., 2002. Cap. 4.

JIANG, T.; MUSTAPHA, A and SAVAIANO, D. A. Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *Err.* Journal of Dairy Science. Vol. 79, No.5 (1996); p. 750 -757.

KLAENHAMMER, Susan F. and TODD, R. Detection and activity of Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Err.* Applied Environmental Microbiology. Vol. 45, No. 6 (jun., 1983); p.1808-1815.

MATEOS, J. A. Aspectos básicos de la tecnología de las leches fermentadas. *Err.* ORTEGA, R. M. *et al.* Alimentos Funcionales Probióticos. Madrid: Médica Panamericana., 2002. Cap. 6.

MONTVILLE, T. J. and CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions En: Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 50 (1999); p.511-519.

OGUNBANWO, S. T.; SANNI, A. L. and ONILUDE, A. A Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis*

OG1. *En: Journal of Biotechnology*. Vol. 2, No. 8 (2003a); p. 219-227.

_____ ; _____ and _____
Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. *En: Journal of Biotechnology*. Vol. 2, No. 7 (2003b); p. 179-184.

REDDY, G. C. *et al.* Natural antibiotic activity of *Lactobacilli acidophilus* and *Bulgaricus*, production and partial of *Bulgaricus* cultured. *En: Journal of Dairy Products*. Vol. 8 (1984); p. 15-19.

SALAZAR, A. B. Aislamiento de cepas nativas de microorganismos probióticos.

Medellín. 2003. 77 p. Tesis (Magister en Biotecnología). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.

TEN BRINK, B. *et al.* Antimicrobial activity of *Lactobacilli*: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *L. acidophilus* M46. *En: Journal of Applied Bacteriology*. Vol. 77 (1994); p. 140-148.

WALKER, A.W. and DUFFY, L. C. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics: Review. *En: Journal of Nutritional Biochemistry*. Vol. 9 (1998); p. 668.675.