

## Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*

Oscar Calderón, Carolina Padilla, Carolina Chaves, Laura Villalobos y María Laura Arias

Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET). Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

**RESUMEN.** Se evaluó el efecto de diferentes tipos de cultivos probióticos en yogurt sobre poblaciones conocidas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. Los tres tipos diferentes de yogurt comercial utilizados fueron: sin probióticos adicionados, con probióticos CHR HANSEN® (*Lactobacillus casei* CRL\_431 y *L. acidophilus* CRL\_730) y otro con los mismos probióticos mencionados anteriormente, adicionado con cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* (LR-35). Se inoculó aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/mL de cada bacteria potencialmente patógena en los diferentes tipos de yogurt, se mantuvo en refrigeración a 4°C durante la vida útil de cada uno de estos alimentos (aproximadamente 30 días) y se realizó un recuento bacteriano cada cuatro días incluyendo el mismo día de la inoculación. Los resultados obtenidos demuestran que, existe diferencia en cuanto a inhibición entre los yogures sin probióticos y el yogurt comercial con probióticos, observándose un efecto inhibitorio evidente, por parte del segundo sobre las poblaciones de *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*. Con respecto a los yogures comerciales con probióticos más *L. rhamnosus*, no se observó alguna diferencia con respecto al efecto inhibitorio que poseen los yogures con probióticos *L. casei* y *L. acidophilus*. En los yogures en que se evaluó *S. enteritidis* se obtuvo la muerte de ésta al cabo de cuatro días. El presente estudio confirma el efecto antagónico que poseen los cultivos probióticos sobre bacterias potencialmente patógenas para el ser humano y animales que pueden estar contenidas en los alimentos. No obstante, el uso del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* no ejerce un efecto inhibitorio adicional.

**Palabras clave:** Probióticos, yogurt, *L. rhamnosus*, bacterias patógenas.

### INTRODUCCION

Hoy en día los cultivos probióticos poseen gran relevancia a nivel mundial, debido a que mediante numerosos estudios se ha logrado demostrar diversos efectos benéficos para el ser humano, tales como el favorecimiento del equilibrio de la microflora intestinal, estimulación del sistema inmune, competencia contra patógenos, entre otros (1).

**SUMMARY.** Evaluation of the effect of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic culture added to yogurt over *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* populations. The effect of different types of probiotics present in yogurt over known populations of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* was evaluated. The three types of yogurt used were: without added probiotics, with added probiotics (*Lactobacillus casei* CRL\_431 and *L. acidophilus* CRL\_730 CHR HANSEN®) and another one with the same probiotics mentioned above and *Lactobacillus rhamnosus* (LR-35) culture. About 10<sup>9</sup> CFU/mL of each potentially pathogenic bacteria was added to each type of yogurt tested, and kept in refrigeration at 4°C during its shelf life, about 30 days. Bacterial count was done the initial day and every four days. Results obtained show that there is a difference in the inhibition between yogurts without added probiotics and the commercial yogurt with added probiotics; there is a clear inhibitory effect of the last one over *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. The yogurt with added probiotics and *L. rhamnosus* did not show any additional inhibitory effect over the bacteria tested when compared with the yogurt with added probiotics. *S. enteritidis* could not be evaluated because it was not detectable in any yogurt samples evaluated four days after its inoculation. This study confirms the antagonistic effect of probiotic cultures over potentially pathogenic bacteria for human beings and animals that may be present in food. Nevertheless, the use of *L. rhamnosus* did not produce any additional inhibitory effect.

**Key words:** Probiotics, yogurt, *L. rhamnosus*, pathogenic bacteria.

Con respecto a este último punto, la producción de ácidos orgánicos, compuestos carbanílicos y bacteriocinas podría explicar el mecanismo por el cual los probióticos ejercen su efecto antagónico sobre otras bacterias (2). Pero la hipótesis que tiene mayor vigencia establece que las bacterias probióticas se instalan en la mucosa intestinal y ahí producen las sustancias inhibitorias que combaten la acción de las bacterias toxigénicas (3).

*Lactobacillus rhamnosus* es un componente principal de la población de lactobacilos que habitan naturalmente el tracto gastrointestinal de humanos y animales (4). Este organismo ha sido estudiado extensamente y se ha encontrado que posee un número de propiedades que constituyen las bases para implementar su uso en salud y en investigación clínica (5).

Dentro de las características asociadas a esta bacteria, se encuentra que no posee actividad antimicrobiana contra otras bacterias ácido lácticas y posee una buena adhesión a las glicoproteínas del ileon humano y a los productos con fibra de la dieta (6). También, es tolerante al pH bajo y a los fluidos pancreáticos y biliares.

Por otro lado, diversos estudios han demostrado actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens in vitro*; así como una actividad antilisteria cuando es aplicada como cultivo iniciador bioprotector de carne en embutidos secos, en etapas iniciales del proceso de maduración (7).

Esta bacteria es aerotolerante, posee excelente viabilidad en yogurt durante cuatro semanas de almacenamiento a 4°C y es útil en su producción, ya que es capaz de crecer durante la fermentación y además proporciona buenas propiedades organolépticas (8).

Mediante la presente investigación, se pretende comparar los efectos del yogurt tradicional sin probióticos adicionados, yogurt tradicional con probióticos adicionados (*Lactobacillus acidophilus* y *L. casei*) y yogurt tradicional adicionado con probióticos y *Lactobacillus rhamnosus* sobre la multiplicación de cuatro bacterias potencialmente patógenas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*, en condiciones normales de almacenamiento del producto, con el fin de determinar si hay diferencias importantes entre ellos en lo que respecta a la reducción de poblaciones bacterianas patógenas.

## MATERIAL Y METODOS

### Localización del proyecto

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, durante los meses de Abril a Noviembre del 2005.

### Cepas utilizadas

Las cepas evaluadas fueron: *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Listeria monocytogenes* ATCC 19116, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* O157:H7 de origen clínico.

### Yogurt

Se utilizó yogurt sin cultivos probióticos (Yogurt A), yogurt

con cultivos probióticos adicionados (*Lactobacillus casei* CRL\_431 y *L. acidophilus* CRL\_730) Christian Hansen (CHR HANSEN®) (Yogurt B) y yogurt con probióticos CHR HANSEN® (idéntico al anterior) pero adicionado con la cepa *Lactobacillus rhamnosus* (Yogurt C). El probiótico *Lactobacillus rhamnosus* (LR-35) fue obtenido de la casa comercial Christian Hansen en forma de "pellets" y se agregó en una concentración de 10<sup>11</sup> UFC/g a cada yogurt. Los tres tipos de yogurt eran pasteurizados y poseían como cultivo tradicional iniciador el YC 180, el cual contiene una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*.

### Definición de los sistemas

Se conformaron doce sistemas para analizar que se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1  
Definición de los diferentes sistemas utilizados

Sistema	Yogurt	Bacteria patógena
1	A	<i>S. aureus</i>
2	A	<i>E. coli</i> O157:H7
3	A	<i>L. monocytogenes</i>
4	A	<i>S. enteritidis</i>
5	B	<i>S. aureus</i>
6	B	<i>E. coli</i> O157:H7
7	B	<i>L. monocytogenes</i>
8	B	<i>S. enteritidis</i>
9	C	<i>S. aureus</i>
10	C	<i>E. coli</i> O157:H7
11	C	<i>L. monocytogenes</i>
12	C	<i>S. enteritidis</i>

### Inoculación de bacterias patógenas en el yogurt

Durante tres ocasiones diferentes, se preparó una suspensión de aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/mL de cada bacteria patógena. De esta suspensión, se tomaron 25 mL para inocular 1L de yogurt de fresa para cada sistema. Cada uno de estos sistemas se almacenó en refrigeración a 4°C durante la vida útil del yogurt (30 días).

### Medición de las poblaciones de bacterias patógenas y bacterias lácticas

El recuento bacteriano se realizó en diversos medios selectivos: para *Listeria monocytogenes* se utilizó agar Oxford, para *Escherichia coli* agar MacConkey + Sorbitol, para *Salmonella enteritidis* agar XLD, para *Staphylococcus aureus* agar Baird Parker y para las bacterias lácticas se utilizó agar MRS (9).

De cada uno de los sistemas, se realizaron diluciones decimales seriadas hasta  $10^{-9}$  en agua peptonada estéril 0.1% (APE). Luego cada una de éstas se inoculó por esparcimiento en el respectivo medio selectivo. Las placas de MRS se incubaron en atmósfera incrementada de  $\text{CO}_2$  a  $25^\circ\text{C}$  por 4 días. Las placas de los otros medios se incubaron a  $37^\circ\text{C}$ , en atmósfera normal durante 4 días. Luego de la incubación, las poblaciones se monitorearon durante 24-28 días, cada 4 días. (10).

### Medición del pH

Se determinó a todos los sistemas, utilizando un pHmetro Cole-Parmer, durante cada día de determinación de las poblaciones bacterianas.

Todos los procedimientos descritos anteriormente se realizaron por duplicado y se utilizó el promedio de las mediciones como valor final para interpretar los resultados.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En los últimos años en diversas investigaciones se ha demostrado el efecto antagónico que poseen varias especies de probióticos sobre microorganismos de deterioro de alimentos y de patógenos intestinales (11). Este efecto se pudo comprobar en este trabajo al evaluar los diferentes sistemas de yogurt con cultivos probióticos adicionados inoculados con bacterias patógenas a través del tiempo, tal y como se presenta en las Figuras 1 y 2.

En la Figura 1 se presenta el comportamiento de las bacterias Gram positivas evaluadas según el tiempo de almacenaje. Se evidencia la rápida disminución de la población de *Staphylococcus aureus* ante la presencia de lactobacterias, independientemente de si se trata del yogurt comercial original compuesto por *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* o del yogurt adicionado con *Lactobacillus rhamnosus*. En el yogurt sin probióticos adicionados, *S. aureus* tardó 16 días en llegar a niveles no detectables, en los yogurts con probióticos, tardó únicamente 12 días. No se observó un efecto adicional en esta inhibición debido a la presencia de *L. rhamnosus*.

De la misma manera, *Listeria monocytogenes* muestra un comportamiento similar. El sistema sin probióticos adicionados alcanza el conteo mínimo a los 20 días, mientras que en los sistemas con probióticos se alcanza el día 12.

En la Figura 2, se muestra el comportamiento de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella enteritidis*. Con respecto a *Escherichia coli*, la población disminuyó a niveles no detectables en 20 días para el sistema sin probióticos, y en ocho días en los sistemas con probióticos, sin haber diferencias entre ellos.

FIGURA 1

Comportamiento de bacterias gram positivas en yogurt

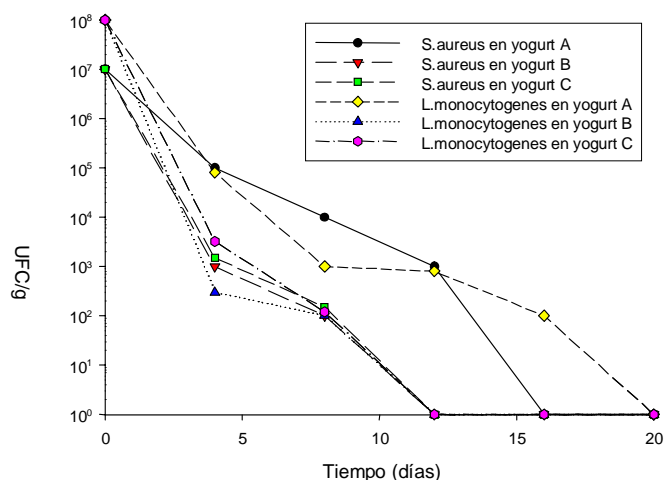
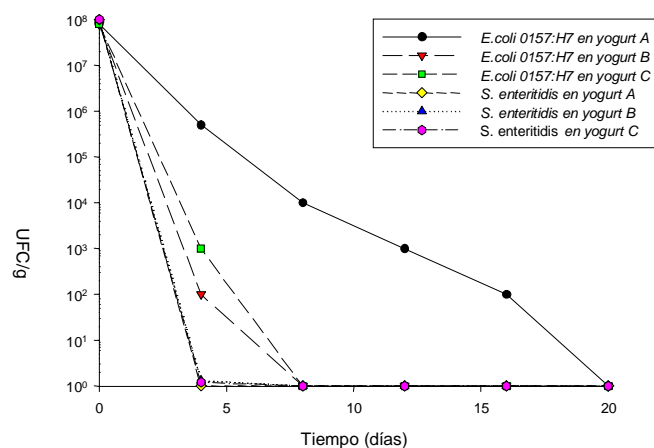


FIGURA 2

Comportamiento de bacterias gram positivas en yogurt



Cabe destacar que el pH de los sistemas evaluados fue de 4,5 constante, mas éste no es un factor inhibitorio para el crecimiento de *S. aureus* o *E. coli*, pues ambas bacterias son viables en ámbitos de pH amplios. También, este pH resulta despreciable para *L. monocytogenes*, pues diversos estudios documentan su supervivencia incluso a pH de 3.87, debido a su adaptación a condiciones ácidas, mediante el fenómeno de respuesta ácido tolerante (ATR) (12).

También, es importante destacar que el número de bacte-

rias lácticas presentes en los diferentes sistemas de yogurt fue constante a través del tiempo, ya que se mantienen en un rango de  $10^7$  -  $10^8$  UFC/g, siendo este el necesario para ejercer acción bactericida *in vitro*, además de ser el número recomendado por la OMS como la cantidad de bacterias necesaria para que ejerzan efectos benéficos sobre el organismo.

*Salmonella enteritidis* presentó un comportamiento totalmente diferente a los descritos anteriormente (Figura 2), ya que llegó a números no detectables durante los cuatro primeros días de ensayo.

Lo anterior resulta contradictorio al comportamiento normal de esta bacteria, ya que se considera que es sumamente resistente a condiciones extremas, tanto de pH como de temperatura una vez que se adapta a éstas (13). El anterior comportamiento se puede explicar con base a que esta bacteria fue adicionada a un medio considerablemente ácido sin darse una adaptación progresiva. Jacobsen *et al.* (1999) describen resultados similares, ellos detallan que algunas cepas de *Lactobacillus rhamnosus* (271, LGG, Lc 705, 19020-8, 19070-2, CHCC2100 y CHCC 2099) inhiben ampliamente a las bacterias *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y *Yersinia enterocolitica*, mientras que para *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri* la inhibición del crecimiento fue débil o prácticamente nula (14).

Al comparar bacterias Gram positivas con Gram negativas, se observa que la disminución del número de estas últimas es más rápida que la de Gram positivas. En varias investigaciones se afirma que las bacterias Gram negativas son poco sensibles a bacteriocinas, debido a la estructura de la membrana externa y a la constitución de su pared. Esta diferencia de comportamiento puede ser debida al efecto de las diversas sustancias producidas por las bacterias ácido lácticas además de las bacteriocinas, como ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético), peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono; así como la producción de otros compuestos antimicrobianos como el diacetilo, el ácido piroglutámico, etc. (6). Se ha comprobado que el diacetaldehído es más efectivo contra bacterias Gram negativas, levaduras y hongos que contra bacterias Gram positivas (15).

Es importante destacar que los sistemas libres de probióticos adicionados también presentaron una paulatina disminución en el número de bacterias inoculadas. Esta puede deberse al agotamiento de nutrientes en el medio, la acumulación de metabolitos o bien a la generación de sustancias bactericidas por parte del cultivo iniciador YC 180 por sí solo (*S. thermophilus* y *L. bulgaricus*). Diversos estudios han demostrado la presencia de proteasas extracelulares generadas en leche por *Lactobacillus bulgaricus*, así como la producción de proteasas intracelulares por parte de *S. thermophilus* (16).

Por otro lado, como se demuestra a través de los resultados obtenidos, aún cuando el probiótico *Lactobacillus*

*rhamnosus* posee efectos beneficiosos tanto en la producción de alimentos lácteos como en aspectos terapéuticos y nutricionales, su adición al yogurt comercial con probióticos, no ejerce un efecto adicional sobre los microorganismos patógenos que podrían encontrarse en estos productos.

Los resultados obtenidos con respecto a la actividad de los probióticos en general, demuestran nuevamente la capacidad que tienen los cultivos probióticos de eliminar y competir contra ciertos patógenos intestinales, de ahí el gran potencial que representan para la industria alimenticia (17),

## REFERENCIAS

1. Saavedra JM. Clinical applications of probiotic agents, Am J Clin Nut. 2001; 73:1147-1151.
2. Marteau P, Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeier J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. Am J Clin Nut. 2001; 73: 430-436.
3. Hansen C. Simposium de quesos y productos lácteos fermentados. Costa Rica. 1998; pp. 2-4
4. Mitsuoka T. 1992. The human gastrointestinal tract. Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. vol 1. Wood BJB. Elsevier Applied Science.
5. Casas I, Edens FW, Dobrogosz WJ. 1998. *Lactobacillus rhamnosus*: An effective probiotic for poultry and other animals. *Lactic Acid Bacteria*. 2nd ed. Salminen S and von Wright A. Marcel Dekker Inc. New York.
6. Ouwehand AC, Tuomola EM, Tolkko S & Salminen S. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. Int J Food Microbiol. 2001; 64: 119-126.
7. Työppönen S, Markkula A, Petäjä E, Suihko ML, Mattila-Sandholm T. Survival of *Listeria monocytogenes* in North European type dry sausages fermented by bioprotective meat starter cultures. Food Control 2003; 14: 181-185.
8. Kontula P. *In vitro* and *in vivo* characterization of potential probiotic lactic acid bacteria and prebiotic carbohydrates. Fin J Dairy Sci. 1999; 54. Thesis.
9. Forbes B, Sahn D, Weissfeld AS. 2002. Diagnostic Microbiology. 11th ed. Mosby Inc, USA.
10. FDA. Bacteriological Analytical Manual. 8 ed. APHA. Washington, 1995.
11. Berrocal D, Arias ML, Henderson M, Wong E. Evaluación de la actividad de cultivos probióticos sobre *Listeria monocytogenes* durante la producción y almacenamiento de yogurt. ALAN. 2002; 52(4), 375-380.
12. Gahan C, O'Driscoll B & Hill C. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. Food Tech. 1996; 62: 3128-3132.
13. Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. 2001. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. 1<sup>st</sup> Edition. Ed ASM Press, Washington, D C.
14. Jacobsen CN, Rosenfeldt V, Hayford AE, Møller PL, Michaelsen KF, Pærregaard A, Sandström B, Tvede M, Jakobsen M. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evalu-

- ation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65:4949-4956.
15. Naidu A. Probiotics spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). *Critical Rev. Food Science Nut.* 1999; 38: 13-126.
  16. Gallardo N, Flores V, Hernández S. Estudio de la cinética de crecimiento de las bacterias del yogurt y caracterización parcial de una proteasa de *Streptococcus thermophilus*. *Procesamiento y conservación de Alimentos de América Latina e Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y Tecnología.* 1997, 2: 178-193.
  17. Campos JA. Cultivos Probióticos y Protectores, Propiedades Funcionales (Nutraceúticas) de Valor Agregado en los Derivados Lácteos. *Lácteos y Cárnicos Mexicanos.* 2002; Jun/Jul 26-37.

Recibido: 17-11-2006

Aceptado: 14-02-2007