

## Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7

Xinia Barrantes, Dylana Railey, María Laura Arias y Carolina Chaves

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

**RESUMEN.** Se estudió el efecto de cultivos probióticos sobre *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 inoculados en yogurt durante su almacenamiento. En tres ocasiones diferentes, dos distintas marcas comerciales de yogurt, una con probióticos adicionales (*Lactobacillus casei* y *L. acidophilus*) fueron inoculadas con una población conocida ( $10^6$  UFC/g) de *L. monocytogenes* o *E. coli* O157:H7 y almacenadas a 5°C por 32 días. Cada cuatro días se realizó un recuento de bacterias lácticas, de los patógenos agregados y se determinó el pH, de acuerdo a la metodología descrita en el Bacteriological Analytical Manual. El número de bacterias lácticas y el pH se mantuvieron constantes durante el período de evaluación. El yogurt con probióticos adicionales redujo la población de *L. monocytogenes* a niveles no detectables en 8 días de almacenamiento, la población de *E. coli* O157:H7 en 16 días; el yogurt sin probióticos adicionales tardó 20 días en reducir la población de *L. monocytogenes* a niveles no detectables y aún después de 28 días de almacenamiento, se pudo cultivar la *E. coli* O157:H7. En este trabajo, se confirma de nuevo los efectos beneficiosos de los cultivos probióticos adicionales en yogurt.

**Palabras clave:** Yogurt, probióticos, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7.

**SUMMARY.** Evaluation of the effect of probiotic cultures added to commercial yogurt over a known population of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. The effect of probiotic cultures over *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 during yogurt storage was evaluated. Two different yogurt brands, one with additional probiotic cultures (*Lactobacillus casei* and *L. acidophilus*) were inoculated with known populations ( $10^6$  UFC/g) of either *L. monocytogenes* or *E. coli* O157:H7 in three different times and stored for 32 days at 5°C. Every four days the count of lactic bacteria, the added pathogens and pH was evaluated, according to the methodology described in the Bacteriological Analytical Manual. The pH and lactic bacteria population were constant during the testing period. Yogurt with additional probiotic cultures reduced the population of *L. monocytogenes* in 8 days, the population of *E. coli* O157:H7 in 16; yogurt with no additional probiotics took 20 days to reduce *L. monocytogenes* to non-detectable levels and even after 28 days of storage, *E. coli* O157:H7 was cultured. In this work, the beneficial effects of additional probiotic cultures in yogurt is confirmed again.

**Key Words:** Yogurt, probiotics, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7.

### INTRODUCCION

Se define probiótico como todo microorganismo vivo, cuya ingestión en cierto número confiere beneficios a la salud más allá de sus beneficios nutricionales inherentes (1).

En los últimos tiempos estos productos han adquirido una gran relevancia como complemento alimentario dada la gran cantidad de cualidades que se les atribuyen. Se ha observado que los probióticos tienen efectos más allá del valor nutritivo del alimento, incluyendo la exclusión, antagonismo e interferencia con microorganismos patógenos, la inmunoestimulación e inmunomodulación, actividades anticarcinogénicas y antimutagénicas, alivio de los síntomas de intolerancia a la lactosa, reducción de colesterol sérico, reducción de la presión arterial, disminución en la incidencia y duración de diarrea (*Cl. difficile*, rotavirus y ETEC), prevención de vaginitis y mantenimiento de la integridad de las mucosas entre otras (1). Otros beneficios incluyen la

estimulación de la síntesis de vitaminas y producción de enzimas, estabilización de la microflora, y reducción del riesgo de cáncer de colon (2).

Son muchos los microorganismos utilizados como probióticos tanto en animales como en humanos, incluyendo los géneros *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y, el más utilizado de todos, *Lactobacillus* (3).

El interés por los cultivos probióticos y su uso en de los productos lácteos fermentados ha crecido en los últimos años (4). Tradicionalmente la producción de yogurt está basada en la adición de fermentos de *Streptococcus salivarius thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*. Hoy día, la introducción de microorganismos probióticos ha permitido no sólo mejorar la producción de éste (por ejemplo para disminuir la postacidificación), sino también el que actúe como agente terapéutico, causando efectos beneficiosos en las personas que los ingieren (5).

Por otra parte, de acuerdo con las últimas estadísticas presentadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades de transmisión alimentaria son actualmente, de 300 a 350 veces más frecuentes de lo indicado en reportes anteriores y entre los principales patógenos involucrados en estas enfermedades se encuentran *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* (6).

De acuerdo con estudios realizados en Canadá y Estados Unidos, la *Escherichia coli* O157:H7 ocupa el segundo lugar entre los enteropatógenos bacterianos asociados a diarrea no específica y es el agente más frecuente en casos de diarrea sanguinolenta (7). Por otro lado, *Listeria monocytogenes* es el agente bacteriano asociado a enfermedad alimentaria con un 20-30% de letalidad.

El efecto de cultivos probióticos sobre estos dos patógenos ha sido estudiado, no obstante, los resultados obtenidos han sido divergentes, dada la variación en los cultivos y sistemas utilizados (8-11).

El objetivo del presente estudio es el evaluar el posible efecto inhibitorio que puedan ejercer las bacterias lácticas presentes en dos marcas comerciales costarricenses de yogurt sobre los patógenos anteriormente mencionados y su conservación durante el tiempo de almacenaje.

## 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, Universidad de Costa Rica; durante los meses de mayo a setiembre del 2001.

### Materiales

Cultivo de *Listeria monocytogenes*, cepa WS 2247 (112 UCR), suministrada por el Laboratorio de Bacteriología, Facultad de Microbiología, UCR.

Cultivo de *Escherichia coli* O157:H7, cepa de origen clínico, Hospital Nacional de Niños.

Yogurt A. Yogurt de fresa, presentación de un litro, conteniendo *Lactobacillus acidophilus* (CRL 730) y *Lactobacillus casei* (CRL 431) como cultivos probióticos. Como cultivo tradicional se utilizó cultivos lácticos YC 180 (CHR HANSEN®), que contiene una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*.

Yogurt B. Yogurt de fresa, presentación de un litro. Como cultivo tradicional presenta cultivos lácticos YC 180 (CHR HANSEN®), que contiene una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. No contiene probióticos adicionales.

## Metodología

### Definición de los sistemas

Se conformaron cuatro sistemas: yogurt A + *E. coli*, yogurt B + *E. coli*, yogurt A + *L. monocytogenes*, yogurt B + *L. monocytogenes*.

Lo anterior se resume en la siguiente Tabla.

TABLA 1  
Diferentes tratamientos según el sistema empleado

Sistema	Yogurt	Bacteria patógena
1	A	<i>L. monocytogenes</i>
2	A	<i>E. coli</i> O157:H7
3	B	<i>L. monocytogenes</i>
4	B	<i>E. coli</i> O157:H7

### Inoculación de los sistemas

Durante tres ocasiones diferentes, se preparó una suspensión de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL de *Listeria monocytogenes* y otra de *Escherichia coli* O157:H7. Se utilizó 25 mL de esas suspensiones para inocular, respectivamente, 1 L de yogurt de fresa de cada una de las 2 distintas marcas a estudiar. Se almacenó cada sistema a 4°C por 32 días.

### Medición de las poblaciones

Las poblaciones iniciales de bacterias lácticas, *L. monocytogenes* y *E. coli* fueron medidas por recuento total (UFC/g) en cada uno de los sistemas mencionados y luego se monitorearon estas poblaciones durante 32 días o hasta la desaparición del patógeno agregado, haciendo mediciones cada 4 días. Se utilizó la técnica de recuento total (UFC/g) para las bacterias mencionadas, exceptuando el monitoreo de *E. coli* que se realizó por la técnica de Número Más Probable (NMP/g), utilizando series de tres tubos. Al mismo tiempo, durante esos 32 días se determinaron las variaciones de pH utilizando un pHmetro de la casa Cole-Parmer.

### Recuento total de Bacterias Lácticas

Se realizó tomando alícuotas de 25g del yogurt y se colocó en 225 mL de agua peptonada estéril (APE) ( $10^{-1}$ ). A partir de esta dilución se hicieron diluciones consecutivas decimales que se inocularon en agar MRS, según el procedimiento para la determinación de bacterias lácticas descrito por Vanderzant & Splittstoesser (12).

### Recuento total de *L. monocytogenes*

Se realizó utilizando las diluciones descritas anteriormente las cuales fueron inoculadas en agar Oxford, por esparcimiento, e incubadas a 35°C por 48 horas.

### NMP de *E. coli* O157:H7

Se realizó utilizando las diluciones descritas anteriormente las cuales fueron inoculadas en series de 3 tubos de caldo EC e incubadas a 35°C por 24 horas (fase de enriquecimiento). Los tubos positivos por turbidez y formación de gas fueron rayados en agar McConkey Sorbitol, el cual se incubó a 35°C por 24 horas (fase selectiva).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Diversas investigaciones han demostrado que varias especies de probióticos presentan una acción antagónica en contra de patógenos intestinales y de deterioro de alimentos (2,13). Esta acción es constatada al evaluar cada sistema de yogurt inoculado a través del tiempo, los cuales presentaron una disminución en la población de los microorganismos patógenos agregados. En la Figura 1 se describe el comportamiento de *L. monocytogenes* inoculada en los yogures A y B. Para el sistema 1, (yogurt A inoculado con *L. monocytogenes*), la desaparición de esta última se dio al octavo día. Para el sistema 3 (yogurt B inoculado con *L. monocytogenes*), la desaparición de esta bacteria se dio hasta el día 20 de almacenamiento. Por otro lado, la población de bacterias lácticas permaneció en  $10^8$  UFC/g durante las mediciones, mientras que el pH se mantuvo entre 3,6 y 4 (el pH original del producto es 4,1).

El descenso en el pH del medio es considerado como un factor importante para controlar el crecimiento de patógenos, pues muchos se ven inhibidos a pH bajos. La *L. monocytogenes* es una bacteria que ha demostrado, en diversos estudios, su resistencia tanto a pH ácido, así como su capacidad de multiplicación a bajas temperaturas. Estudios efectuados con *L. monocytogenes* revelan que ésta puede crecer en un ámbito de pH entre 5,0 y 9,6, siendo su pH óptimo de crecimiento alrededor de 7,0, aunque le favorece una ligera alcalinidad (14). Por su parte, Brackett (9) establece que el ámbito de pH en el cual *L. monocytogenes* puede crecer es de 5,6 a 9,8. Es importante destacar que Sorrels et al (13) reportaron que la bacteria puede crecer a pH 4,4, un valor considerablemente inferior de lo anteriormente reportado. Por otro lado, Gahan et al (15) reporta la adaptación de esta bacteria a condiciones ácidas, mediante el fenómeno de respuesta ácido tolerante (ATR), logrando sobrevivir a pH de 3,87 inclusive.

Dadas las anteriores aseveraciones, es muy probable que la disminución en número sufrida por esta bacteria en los yogures A y B sea por un efecto independiente del grado de pH alcanzado pero asociado a las bacterias lácticas presentes o a sus productos metabólicos.

Datos similares fueron obtenidos por Zúñiga y colaboradores (16), donde una concentración de  $10^3$  UFC/mL de *L. monocytogenes* fue inoculada en leche fermentada

con cultivo iniciador para yogurt (*L. bulgaricus* y *S. thermophilus*), disminuyendo en pocas horas y para una concentración de  $10^7$  UFC/mL desapareció al cabo de 32 días.

En la Figura 2 se describe el comportamiento de *E. coli* O157:H7 inoculada en los yogures A y B. Para el sistema 2, (yogurt A inoculado con *E. coli* O157:H7), la desaparición de esta última se dio al décimo sexto día de almacenamiento. Para el sistema 4 (yogurt B inoculado con *E. coli* O157:H7), hubo detección de esta bacteria aún luego del día vigésimo octavo de almacenamiento. Por otro lado, al igual que en los sistemas anteriores, la población de bacterias lácticas permaneció en  $10^8$  UFC/g durante las mediciones, mientras que el pH se mantuvo entre 3,6 y 4.

FIGURA 1

Comportamiento de *Listeria monocytogenes* en yogurt con y sin prebióticos adicionados a través del tiempo

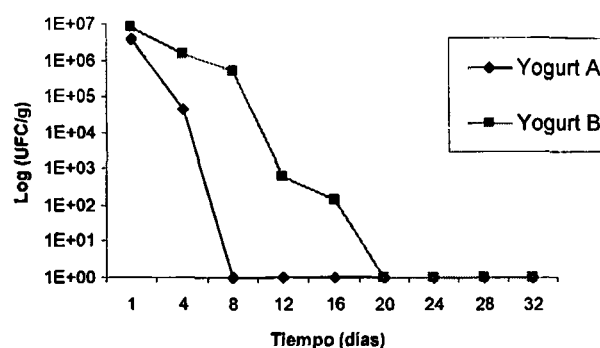
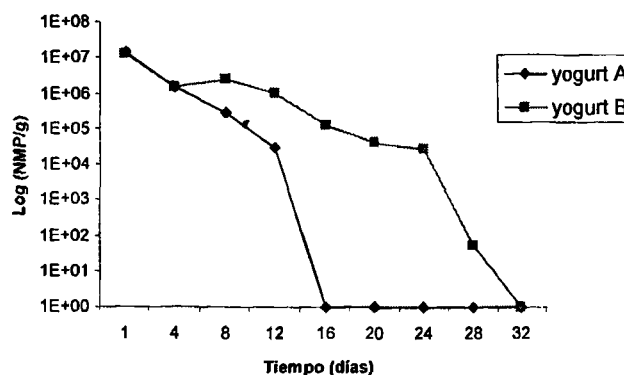


FIGURA 2

Comportamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en yogurt con y sin prebióticos adicionados a través del tiempo



Los estudios realizados por Arias et al. (17) en leche pasteurizada inoculada con este patógeno demuestran que éste posee una importante resistencia a bajas temperaturas y es capaz de reproducirse a pH ácido.

Según los datos obtenidos y dadas las condiciones de almacenamiento y acidez del producto, se puede aducir a los cultivos probióticos adicionados en el yogurt A una importante acción en la disminución de la *E. coli* O157:H7. En el sistema 4, la leve y tardía disminución de *E. coli* O157:H7 puede deberse al efecto de sus propios desechos o al agotamiento de nutrientes dado que no hay probióticos adicionales.

A partir de los datos obtenidos, se podría concluir que el yogurt A es más eficiente en la inhibición in vitro de las bacterias patógenas adicionadas que el yogurt B; ya que inhibe a *L. monocytogenes* en un período de 8 días y a *E. coli* en 16 días; mientras que el yogurt B lo logra en 20 y más de 28 días, respectivamente. La efectividad del yogurt A se puede explicar basado en el hecho de que éste tiene, además del cultivo iniciador tradicional (*S. thermophilus* y *L. bulgaricus*), las cepas probióticas mejoradas (*Lactobacillus acidophilus* (CRL 730) y *Lactobacillus casei* (CRL 431)). La producción de ácidos orgánicos, compuestos carboxílicos y bacteriocinas como la acidofilina, acidolina, lactocidina y bactericina son algunas de las posibilidades planteadas para explicar la acción de los probióticos.

Sin embargo, el cultivo iniciador por sí sólo (*S. thermophilus* y *L. bulgaricus*) también genera sustancias que pueden actuar como bactericidas, lo cual explicaría la disminución de las bacterias patógenas que también ocurre en el caso del yogurt B. En estudios realizados por Gallardo et al, 1988, se aislaron proteasas extracelulares que presentan acción en leche a partir de *Lactobacillus bulgaricus*, y se purificaron proteasas intracelulares de *Streptococcus thermophilus*, lo cual explicaría la acción del yogurt B (18).

La eficiencia de los probióticos en inactivar *L. monocytogenes* más rápido que *E. coli* O157:H7 puede explicarse con base a la acción de bacteriocinas producidas por algunas especies de probióticos. Las bacteriocinas producidas especialmente por lactococos y lactobacilos demuestran una actividad bactericida dirigida hacia bacterias Gram positivas (19-21). En condiciones normales, las bacterias Gram negativas son poco sensibles a bacteriocinas (21-24), debido a la membrana externa y constitución de su pared.

Los niveles necesarios para que las bacterias probióticas ejerzan su acción contra bacterias patógenas in vivo dependen de una dosis mínima por porción de  $2 \times 10^6$  bacterias/g. En este trabajo se midieron poblaciones in vitro de  $10^8$  UFC/g, las cuales al llegar al sistema digestivo se verán afectadas por una acidez estomacal de rango menores a los que estas bacterias toleran, sin embargo, se ha encontrado que pueden liberar sustancias al medio logrando un efecto "bufferizante" de los alrededores, aumentando el pH y manteniendo su sobrevivencia (25).

En este trabajo se comprobó el beneficio de los probióticos, especialmente el proveniente de cepas especializadas que en los últimos tiempos se añaden a los alimentos con el fin de

conferir mayores beneficios. No obstante, se comprueba también que las bacterias patógenas pueden sobrevivir al bajo pH y a las temperaturas de refrigeración por un tiempo significativo, existiendo la posibilidad de que si contaminaran productos lácteos después de la pasteurización, podrían sobrevivir el tiempo necesario para infectar a alguna persona. Esto resalta la importancia de un buen manejo durante la producción y almacenamiento del yogurt.

## REFERENCIAS

1. Klaenhammer T. Probiotic bacteria: today and tomorrow. *J Nutr.* 2000;130: 415S-416S.
2. Naidu A, W Bidlack & A Clemens. Probiotic spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). *Crit Rev Food Sci Nut.* 1999;38(1): 13-126.
3. Reid G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65: 3763-3766.
4. Tecnología Láctea Latinoamericana. Oportunidades para los probióticos en productos lácteos. *Tecnología Láctea Latinoamericana.* 1999;17: 60-65.
5. CHR Hansen. Simposium de quesos y productos lácteos fermentados. San José, Costa Rica, pp 2-4, 1998.
6. World Health Organization. Foodborne disease-possibly 350 times more frequent than reported. WHO, Geneva, 1997.
7. Karmali M. Salud Pública y Aspectos Preventivos de la Invección por *Escherichia coli* productora de Verotoxina. <http://www.hospitalitaliano.org>, 2001.
8. Berrocal D, Arias ML, Wong E, Henderson M. Evaluación del efecto de cultivos probióticos sobre *Listeria monocytogenes* durante la producción y almacenamiento de yogurt. *Arch Latinoamer Nutric.* 52, 2002.
9. Bracket, R. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food Tech.* 1988;42: 162-164.
10. Charlton, B. Environmental survey of *Listeria* species in California milk processing plants. *J. Food Prot.* 1990;53: 198-201.
11. Hoover, D. Bifidobacteria: activity and potential benefits. *Food Tech.* 1993;47:120-124.
12. Vanderzant C & Splittstoesser D. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. APHA. Washington DC. 1995;553-590.
13. Sorrells, K, D Enigl & J Hatfield. Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot.* 1989;52: 571-573.
14. Donnelly C. & Briggs, E. Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. *J Food Prot.* 1986;49: 994-998.
15. Gahan C, B O'Driscoll & C Hill. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Food Tech.* 1996;62: 3128-3132.
16. Zúñiga A, A López-Merino & L Mota de la Garza. Sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en leche fermentada con un cultivo iniciador para elaborar yogur. *Rev Lat Microbiol.* 1995;37: 257-265.
17. Arias, M.L, Monge R, Antillón F & Chaves C. Effect of stor-

- age temperatura on growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated in foods from a neotropical environment. *Rev Biol Trop.* 2001;42: 517-524.
18. 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.
  19. Blackburn P, Polar J, Gusik A & Rubing D. Nisin composition for the use as enhanced broad range bactericides. International Patent Application publication WO 89112399, 1989.
  20. Kalchayananel N, Itanilin M & Ray B. Sublethal injury makes Gram negative and resistant Gram positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcTI and nisin. *Lett Appl Microbiol.* 1992;15: 239-243.
  21. Stevens K, Sheldon B, Klapes N & Klaenhammer T. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram negative bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1991;57: 3613-3615.
  22. Sahl H.G. Influence of the staphylococcin-like peptide Pep5 on membrane potential of bacterial cells and cytoplasmic membrane vesicles. *J Bacteriol.* 1985;162: 833-836.
  23. Hurts, A. Nisin. *Adv. Appl Microbiol.* 1981;27: 85-123.
  24. Ray B & Daeschel, M. Food biopreservatives of microbiological origin. CRC press, Ing., Boca Ratón, Fla, 1992.
  25. Jack R, Tagg J & Ray B. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microb. Rev.* 1995;59:171-200.

Recibido: 17-09-2002

Aceptado: 28-06-2004