

Evaluación del efecto de cultivos probióticos presentes en yogurt sobre *Staphylococcus aureus* y la producción de termonucleasa

Marlon Salvatierra, Andrea Molina, María del Mar Gamboa y María Laura Arias

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

RESUMEN. Se estudió el efecto de cultivos probióticos sobre poblaciones conocidas de *Staphylococcus aureus* inoculadas en yogurt, a lo largo de su vida útil normal (28 días); también se evaluó el efecto de éstos sobre la producción y estabilidad de su termonucleasa. En tres ocasiones distintas dos marcas comerciales de yogurt, una con probióticos adicionados (*Lactobacillus casei* y *L. acidophilus*), fueron inoculadas con una población conocida de *S. aureus* en alta y baja concentración (10^9 UFC/g y 10^7 UFC/g, respectivamente) y almacenadas a 5°C por 28 días. Cada cuatro días se realizó un recuento de bacterias lácticas, de *S. aureus* y se midió el pH de acuerdo a la metodología descrita en el Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods, Vanderzant & Splittstoesser; además se determinó la presencia de termonucleasa usando petrifilm *S. aureus* de la casa 3M®. El número de bacterias lácticas y el pH se mantuvo constante durante el período de evaluación en ambos tipos de yogurt. La población de *S. aureus* (en alta y baja concentración) se redujo a niveles indetectables en 8 días de almacenamiento en el yogurt con probióticos; mientras que a partir del yogurt sin probióticos se pudo aislar esta bacteria aún después de 24 días de almacenamiento. Se pudo detectar la termonucleasa a lo largo de todo el estudio, aún en el yogurt con probióticos. La presencia de termonucleasa se relaciona, con una alta probabilidad, con la producción de enterotoxina de *S. aureus*. Este trabajo confirma de nuevo los efectos beneficiosos de los cultivos probióticos en yogurt sobre bacterias, así como la necesidad de mantener las normas de higiene para evitar que *S. aureus* contamine alimentos y pueda producir enterotoxina, ya que ésta no es afectada por los probióticos. **Palabras clave:** Yogurt, probióticos, *Staphylococcus aureus*, termonucleasa.

SUMMARY. Evaluation of the effect of probiotic cultures on two different yogurt brands over a known population of *Staphylococcus aureus* and the production of thermonuclease. The effect of probiotic cultures over known populations of *Staphylococcus aureus* inoculated in yogurt was studied; also the production and stability of its thermonuclease during yogurt storage was evaluated. In three different occasions, two different yogurt brands, one with additional probiotic cultures (*Lactobacillus casei* and *L. acidophilus*), were inoculated with known populations of *S. aureus* in high and low concentration (10^9 CFU/g and 10^7 CFU/g), respectively. These samples were stored for 28 days at 5°C. Every four days the count of lactic bacteria, *S. aureus* and pH were evaluated, according to the methodology described in the Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Vanderzant & Splittstoesser. The presence of thermonuclease was determined using petrifilm for *S. aureus* from 3M company®. The pH and lactic bacteria population were constant during the testing period. Yogurt with additional probiotic cultures (high and low concentration) lowered the population of *S. aureus* to non detectable levels in 8 days; but, *S. aureus* could be cultured from yogurt without probiotics even after 24 days of incubation. Same time, the presence of thermonuclease was positive in all tests; it was not affected by probiotics. The presence of thermonuclease is related to the production of *S. aureus* enterotoxin. This work emphasizes again the beneficial effects of probiotic cultures in yogurt over bacteria and the importance of keeping hygienic practices in order to avoid the contamination of food with *S. aureus* and the eventual production of its enterotoxin, since it is not affected by probiotics.

Key words: Yogurt, probiotics, *Staphylococcus aureus*, thermonuclease.

INTRODUCCION

El yogurt es un gel de apariencia viscosa, resultante de la acidificación microbiana de la leche (1). Intervienen en su fermentación ácido láctica las bacterias *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, las cuales deben encontrarse en una relación 1:1 para una acción simbiótica efectiva. Los cocos son los responsables de la producción de ácido, los bacilos aportan el sabor y aroma debido a la

producción de acetaldehído (2).

La relevancia del yogurt y su asociación con la salud surgió en Europa, a partir de los estudios de Metchnikoff y su teoría de la longevidad de los pueblos balcánicos asociada al alto consumo de productos fermentados de leche (2,3). Actualmente, diversos investigadores han estudiado los microorganismos utilizados en la producción de leche fermentada y productos afines y sus efectos beneficiosos sobre el metabolismo humano y animal (2-4). Estos microorganismos

vivos, conocidos como probióticos, son considerados como suplementos alimenticios que afectan benéficamente la fisiología del huésped, mediante la modulación intestinal y del sistema inmunológico y que mejoran el balance nutricional y microbiano en el tracto gastrointestinal, entre otros (3-4).

El interés por los cultivos probióticos y su uso en la industria de productos lácteos fermentados ha florecido en el último lustro (5), no sólo desde el punto de vista terapéutico, causando efectos beneficiosos en las personas que los ingieren (6), sino también como agente antagónico de agentes patógenos entéricos (2-4). Diversos trabajos han demostrado que las bacterias probióticas son capaces de prevenir la adherencia, establecimiento, replicación y acción patogénica de enteropatógenos específicos en el intestino y en alimentos, ya sea provocando un descenso en el pH a través de la producción de ácidos orgánicos volátiles de cadena corta, interviniendo en la disponibilidad de nutrientes necesarios para los patógenos, disminuyendo el potencial de óxido reducción del medio o produciendo compuestos inhibitorios específicos, incluyendo bacteriocinas (2,4,6).

Staphylococcus aureus es una de las bacterias que con mayor frecuencia producen brotes alimentarios, dada su amplia distribución en la naturaleza así como su capacidad de producir diversas enzimas y toxinas (7). Se incluyen dentro de estas últimas, diversas enterotoxinas termoestables, destacándose la enterotoxina A, la cual es extremadamente potente, una cantidad tan pequeña como 100 ng es suficiente para causar síntomas de intoxicación (8).

La producción de enterotoxinas se da bajo una gran gama de condiciones ambientales y de almacenamiento, especialmente en aquellas donde haya aerobiosis, un aw superior a 0,85, un pH superior a 5,0 y baja competencia microbiana. Por otro lado, estas enterotoxinas son muy resistentes al calor y son capaces de soportar tratamientos de cocción y hasta de esterilización (9).

Diversos trabajos científicos han evaluado el efecto de cultivos probióticos sobre el crecimiento de bacterias patógenas entéricas (10-13), obteniéndose resultados diversos pero que identifican claramente la acción antagónica de especies de probióticos sobre microorganismos patógenos. Por otro lado, existe un creciente interés relacionado con las malas prácticas sanitarias en la preparación de alimentos y su relación con la producción de brotes alimentarios. Siendo *S. aureus* una de las principales causas de intoxicación alimentaria a nivel mundial (6), el objetivo del presente estudio es evaluar el efecto inhibitorio que puedan ejercer las bacterias probióticas presentes en yogurt costarricense en el crecimiento y producción de enterotoxinas de *S. aureus*.

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 octubre del 2002.

Materiales

Cultivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, productora de enterotoxina, suministrada por el Laboratorio de Bacteriología, Facultad de Microbiología, UCR.

Yogurt A. Yogurt de fresa, presentación de un litro. Como cultivo tradicional contiene cultivos lácticos YC 180 (CHRHANSEN®) el cual consiste en una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* y como cultivos probióticos adicionales *Lactobacillus acidophilus* (CRL 730) y *Lactobacillus casei* (CRL 431), añadidos después de la pasteurización.

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

Metodología

Definición de los sistemas

En tres ocasiones diferentes, se conformaron cuatro sistemas: yogurt A (con probióticos) +*S. aureus* en alta concentración; yogurt A (con probióticos) +*S. aureus* en baja concentración; yogurt B (sin probióticos) +*S. aureus* en alta concentración y yogurt B (sin probióticos) +*S. aureus* en baja concentración. Lo anterior se resume en la Tabla 1.

TABLA 1

Composición de los sistemas empleados para determinar la actividad de cultivos probióticos sobre una población conocida de *S. Aureus*

Sistema	Yogurt	Bacteria patogena
1	A (con probióticos)	<i>S. aureus</i> (en alta concentración)
2	A (con probióticos)	<i>S. aureus</i> (en baja concentración)
3	B (sin probióticos)	<i>S. aureus</i> (en alta concentración)
4	B (sin probióticos)	<i>S. aureus</i> (en baja concentración)

Inoculación de los sistemas

Para el análisis de *S. aureus* en alta concentración en los dos tipos de yogurt evaluados (A y B), se inoculó 25 mL de una suspensión inicial con una concentración aproximada de

$10^8 - 10^9$ UFC/mL (sistemas 1 y 3). Para la inoculación de *S. aureus* en baja concentración, se preparó una dilución 1:100 de la suspensión inicial, obteniéndose concentraciones de $10^6 - 10^7$ UFC/mL aproximadamente, a partir de la cual se inoculó 25 mL en cada uno de los dos tipos de yogurt evaluados (sistemas 2 y 4). Se almacenó cada sistema a 4°C por 28 días.

Medición de las poblaciones

Las poblaciones iniciales de bacterias lácticas y *S. aureus* fueron medidas por recuento total (UFC/g) en cada uno de los sistemas mencionados, utilizando agar MRS y agar Baird Parker, respectivamente. Las poblaciones fueron monitoreadas durante 28 días, cada 4 días. Al mismo tiempo, se determinaron las variaciones de pH utilizando un pHmetro (Cole-Parmer).

Recuento total de bacterias lácticas

Se realizó tomando alícuotas de 25 g del yogurt que se añadieron a 225 mL de agua peptonada estéril (APE) (10^{-1}). A partir de esta dilución se hicieron diluciones decimales seriadas que se inocularon en agar MRS, según el procedimiento para la determinación de bacterias lácticas descrito por Vanderzant & Splittstoesser (9).

Recuento total de *S. Aureus*

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

Detección de la termonucleasa

Durante la incubación de los sistemas de yogurt citados, se determinó también la presencia de termonucleasa, utilizando la placa de recuento rápido de *S. aureus* (Petrifilm) de la casa 3M®. Cada cuatro días se inocularon 1 mL de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} preparadas en placas de petrifilm, las cuales permiten confirmar la presencia de termonucleasa mediante el indicador de azul de ortotoluidina.

RESULTADOS Y DISCUSION

El interés por los cultivos probióticos y su uso en los productos lácteos fermentados ha florecido en los últimos años (5), sobre todo debido a diversas investigaciones que han demostrado el poder antagónico de éstos en contra de patógenos intestinales que se transmiten por alimentos, incluyendo *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* spp., entre otros, a nivel de hospedero y de alimento (2, 10, 14).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo también permiten constatar el efecto antagónico de probióticos sobre la multiplicación de *S. aureus*. En la figura 1, se muestra el comportamiento de *S. aureus* (población alta) en yogurt con

y sin probióticos adicionados. Una concentración inicial de *S. aureus* de $4,1 \times 10^7$ UFC/g es reducida a <10 UFC/g en término de ocho días en yogurt con probióticos adicionados; esta misma población disminuye únicamente 4 logaritmos en yogurt sin probióticos adicionados, a lo largo de 28 días.

La desaparición del *S. aureus* en el yogurt con probióticos adicionados puede deberse a varias razones, incluyendo la competencia por nutrientes y espacio, la producción de bacteriocinas, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, disminución del potencial de óxido reducción, entre otros (15).

Es necesario destacar que la acidez del medio es un factor importante en el control del crecimiento de patógenos, pues muchos se ven inhibidos en ambientes ácidos. No obstante, en el presente trabajo, el pH de los dos tipos de yogurt mostró muy leves modificaciones a través del tiempo de incubación (de 3,6 a 4), las cuales fueron independientes de la presencia de probióticos y probablemente no afectaron el crecimiento de la bacteria estudiada, ya que ésta es capaz de crecer en ambientes de pH aún más ácido (9).

También debe mencionarse que el número inicial de bacterias lácticas presentes en el yogurt con probióticos adicionados fue de $1,0 \times 10^8$ UFC/g y se mantuvo constante a través del período de incubación. Este número es el recomendado por la Organización Mundial de la Salud como la cantidad necesaria para que ejerzan sus efectos beneficiosos sobre el organismo, a pesar de la reducción que sufren al pasar por la barrera de la acidez estomacal (6,16).

En el caso de los yogures sin prebióticos (sistemas 3 y 4), la paulatina disminución en el número de bacterias inoculadas 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 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* (15).

La Figura 2 muestra el comportamiento de *S. aureus* (población baja) ante yogurt con y sin probióticos adicionados. Al igual que en el Figura 1, la población de esta bacteria desaparece al cabo de 8 días de incubación en el yogurt con probióticos adicionados, mientras que en el yogurt sin probióticos desaparece después de 24 días de incubación.

Al comparar los resultados obtenidos con un trabajo anterior realizado con la misma metodología, pero evaluando el efecto de probióticos sobre *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 (14), se encontró que la primera bacteria desaparece luego de 8 días de incubación en el sistema con probióticos adicionales, pero en el sistema sin prebióticos se necesitó de 16 días para desaparecer. Por otra parte, *E. coli* O157:H7 desapareció luego de 16 días en el sistema con probióticos adicionales y fue recuperada aún después de 28 días de incubación en el sistema sin probióticos adicionados.

La diferencia de actividad de los probióticos, específicamente de sus bacteriocinas sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, ya se ha descrito en la literatura (15,16); su efecto está dirigido principalmente hacia bacterias Gram positivas, mientras que las Gram negativas demuestran una menor sensibilidad dada la presencia de membrana externa y la constitución de su pared celular (17).

FIGURA 1

Comportamiento de *Staphylococcus aureus* en yogurt con y sin probióticos adicionados a través del tiempo (población alta)

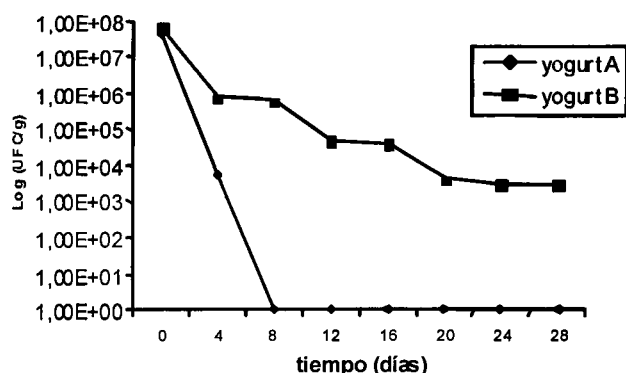
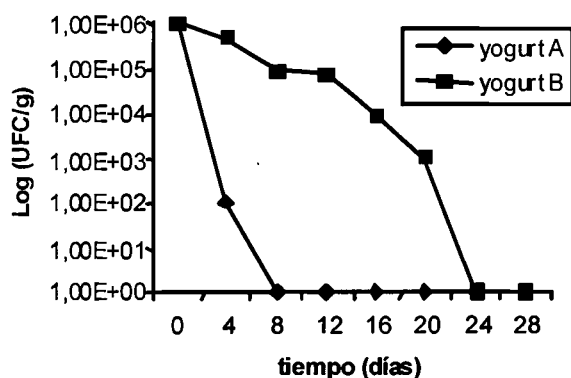


FIGURA 2

Comportamiento de *Staphylococcus aureus* en yogurt con y sin probióticos adicionados a través del tiempo (población baja)



La producción de termonucleasa por parte de *S. aureus* ha sido comúnmente asociada con su capacidad de producir enterotoxina; su mayor utilidad está dirigida a su detección en alimentos donde no se puede recobrar organismos viables luego de algún tipo de procesamiento. Cada día se describen más especies de *S. aureus* coagulasa negativas que son capaces de producir termonucleasa y por ende, enterotoxina (6). Consecuentemente, el énfasis puesto en el aislamiento de *S.*

aureus coagulasa positivo a partir de alimentos puede llevar a una sub-estimación del potencial enterotoxigénico de las cepas de *Staphylococcus* presentes (15). Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran el nulo efecto de probióticos sobre la producción de la termonucleasa ya que su presencia fue detectada cualitativamente en todos los sistemas evaluados, a pesar de la presencia de bacterias competidoras e independientemente de la concentración de *S. aureus* inoculada. También, se encontró que los probióticos no son capaces de desestabilizar esta enzima una vez que ha sido producida; su detección fue continua a través de los 28 días de incubación. Dada la estrecha vinculación entre la producción de enterotoxina y termonucleasa, estos resultados nos permiten inferir que la enterotoxina tampoco sería modificada por los probióticos evaluados.

Concluyendo, este trabajo demuestra que el yogurt adicionado con probióticos (*L. acidophilus* y *L. casei*) es capaz de suprimir la población de *S. aureus* de una manera más rápida y efectiva que el yogurt estándar que únicamente contiene *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, no obstante, no ejerce ningún efecto sobre la síntesis o estabilidad de la termonucleasa.

REFERENCIAS

- 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.
- Klaenhammer T. Probiotic bacteria: today and tomorrow. J Nutr. 2000;130:415S-416S.
- Anónimo. Oportunidades para los probióticos en productos lácteos. Tecnología Láctea Latinoamericana. 1999;17:60-65.
- Naidu A, Bidlack W & Clemens A. Probiotic spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 1999;38(1):13-126.
- Reid G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. Appl Environ Microbiol. 1999;65: 3763-3766.
- Dinges M, Orwin P & Schlievert P. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev. 2000;13:16-34.
- Archer DI & Young F. Contemporary issues: disease with a food vector. Clin Microbiol Rev. 1988;1:377-398.
- Evenson M, Hinds M, Bernstein R & Abergdoll M. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. Int J Food Microbiol. 1988;7:311-316.
- Vanderzant C & Splittstoesser D. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. APHA. Washington DC. 1995;553-590.
- 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 Nutr 2002;52:125-129.

11. Bracket R. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food Tech.* 1988;42:162-164.
12. Charlton B. Environmental survey of *Listeria* species in California milk processing plants. *J Food Prot.* 1990;53:198-201.
13. Hoover D. Bifidobacteria: activity and potential benefits. *Food Tech.* 1993;47:120-124.
14. Barrantes X, Railey D, Arias ML & Chaves C. Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7. *Arch Latinoamer Nutr.* 2004; 54:293-297.
15. Jack R, Tagg J & Ray B. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microb. Rev.* 1995;59:171-200.
16. 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.
17. 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.

Recibido:16-12-2003

Aceptado: 14-06-2004