



INFORME BREVE

Efecto inhibitorio de *Lactobacillus* spp. sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos



María J. Ruiz, Rocío Colello, Nora L. Padola* y Analía I. Etcheverría

Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, Centro de Investigación Veterinaria Tandil CONICET-CICPBA, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil, Buenos Aires, Argentina

Recibido el 29 de julio de 2016; aceptado el 25 de octubre de 2016
Disponible en Internet el 24 de marzo de 2017

PALABRAS CLAVE

Enfermedades de transmisión alimentaria;
Patógenos;
Lactobacillus;
Probióticos

KEYWORDS

Foodborne diseases;
Pathogens;
Lactobacillus;
Probiotic

Resumen El género *Lactobacillus* despierta día a día un creciente interés entre microbiólogos y tecnólogos, quienes intentan descubrir nuevas aplicaciones biotecnológicas y propiedades probióticas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad inhibitoria de *Lactobacillus* spp. frente a patógenos implicados en enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*. Para ello se tomaron muestras de las distintas etapas de la cadena productiva porcina. De dichas muestras se aislaron en total 78 cepas bacterianas, de las cuales 27 (34,61%) tuvieron características fenotípicas y genotípicas correspondientes al género *Lactobacillus* spp.; el 85,18% de ellas presentó capacidad inhibitoria frente a por lo menos una de las cepas patógenas evaluadas. Estos resultados indican que los microorganismos aislados representan una potencial alternativa para inactivar a los patógenos presentes en los alimentos y así brindar alimentos más seguros a los consumidores. © 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Inhibitory capacity of *Lactobacillus* spp. against pathogens involved in foodborne diseases

Abstract The genus *Lactobacillus* daily generates a growing interest among microbiologists and technologists, who try to discover new biotechnological applications and probiotic properties. The main goal of this study was to evaluate the inhibitory capacity of *Lactobacillus* spp. against pathogens (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*) involved in foodborne diseases. For this purpose, samples were collected at different stages of the pork production chain. Seventy eight bacterial strains were isolated. Twenty seven (27) of these

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: nlpadola@vet.unicen.edu.ar (N.L. Padola).

strains (37.18%) had genotypic and phenotypic characteristics corresponding to *Lactobacillus* spp. whereas 85.18% of them showed inhibitory capacity. These data showed that the studied strains represent a potential alternative to inactivate foodborne pathogens and thus provide safe food to consumers.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen un problema sanitario y económico de relevancia mundial. Millones de personas enferman y muchas mueren por consumir alimentos insalubres. Los estados miembros de la Organización Mundial de la Salud (OMS) adoptaron en el año 2000 una recomendación en la cual se reconoce el papel fundamental de la inocuidad alimentaria para la salud pública, ello implica la adopción de acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos. Las políticas y actividades que persiguen dicho fin deberán abarcar toda la cadena alimentaria, desde la producción hasta el consumo¹⁵. Se consideran ETA todas aquellas enfermedades causadas por la ingestión de agua o alimentos contaminados que provocan un efecto nocivo en la salud del consumidor, o de un grupo de consumidores, en forma aguda o crónica. Pueden ser causadas por patógenos, sustancias químicas o parásitos que contaminan los alimentos en distintos puntos de la cadena de producción.

Las bacterias generalmente implicadas en ETA corresponden a las especies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Listeria monocytogenes* o a los géneros *Salmonella*, *Campylobacter* y *Shigella*¹⁴.

E. coli es habitante normal de los intestinos de la mayor parte de los mamíferos sanos, donde se comporta como comensal e integra la flora intestinal⁵. La franja etaria más vulnerable a enfermar por este potencial patógeno incluye a niños entre uno y 8 años. La contaminación de los alimentos asociada a una deficiente cocción es generalmente la causa de estas ETA¹¹. *Salmonella* spp. es un agente productor de zoonosis cuyo hábitat natural normalmente es el tracto gastrointestinal de los mamíferos y las aves¹. Se transmite por contacto directo o contaminación cruzada durante la manipulación y el procesado de los alimentos, en el hogar o a través del agua³. *S. aureus* es, dentro de su familia, la especie que causa mayor cantidad de infecciones en el ser humano. Suele estar presente en la piel y en las membranas mucosas, sin causar infección. La intoxicación en el hombre se produce por la multiplicación y producción de enterotoxinas termorresistentes en los alimentos consumidos⁷.

En la cadena de producción de alimentos existen riesgos de infección por patógenos, por lo que se necesita un control microbiológico estricto para impedir que estos lleguen al consumidor. Para inactivar estas bacterias se han estudiado diversas estrategias, como por ejemplo, sistemas de biopreservación, tecnologías no térmicas o combinaciones de aquellas. El empleo de bacterias ácido lácticas (BAL) o de sus metabolitos son ejemplos de tratamientos de biopreservación.

Las BAL son consideradas seguras y se utilizan en muchos países en la producción de alimentos fermentados. Por esta

razón son sumamente atractivas como herramientas para controlar el crecimiento de patógenos en una gran variedad de alimentos⁹. Por lo general, las cepas empleadas para el desarrollo de alimentos probióticos son aisladas de humanos, ya que poseen mayor posibilidad de adherirse y colonizar el epitelio intestinal. Sin embargo, se ha demostrado que cepas de origen animal también poseen efectos favorables en el organismo humano⁶.

Desde la antigüedad y hasta hoy, este grupo de bacterias ha sido de gran utilidad biotecnológica en el área de los alimentos. La biopreservación de alimentos por medio de bacteriocinas producidas por bacterias del género *Lactobacillus* ha resultado exitosa en alimentos como la carne, para el control de ciertos microorganismos patógenos, entre ellos *Salmonella* spp. y *E. coli*⁸.

En los últimos años, las BAL se han aplicado como probióticos debido a su capacidad de controlar la microbiota intestinal y a su acción para evitar la colonización y el crecimiento de bacterias patógenas en el tracto gastrointestinal⁸. Las BAL se caracterizan por la producción de sustancias antimicrobianas (ácidos láctico y acético, metabolitos)⁷ y de numerosas bacteriocinas, en las cuales se fundamenta su potente acción probiótica, antimicrobiana y bioconservadora³. De esta manera, cumplen un importante papel en los procesos de bioconservación de la industria alimentaria¹⁴.

Teniendo en cuenta la importancia de la capacidad inhibitoria de *Lactobacillus* spp. sobre bacterias productoras de ETA y el impacto de estas enfermedades en la salud pública, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad inhibitoria de cepas de origen porcino de este género sobre bacterias patógenas asociadas a ETA como *E. coli*, *Salmonella* spp. y *S. aureus*.

Se realizaron muestreos en distintos establecimientos abarcando diferentes etapas de la cadena productiva de carne porcina, según el Reglamento (UE) N.º 209/2013 de la Comisión del 11 de marzo de 2013, que modifica el Reglamento (CE) N.º 2073/2005 y la Circular 3579 de SENASA N.º 3496/02 y Anexo II. Se tomaron 39 muestras: 11 de materia fecal porcina en criadero, 5 hisopados de reses en su sala de recepción, 5 hisopados en cortes de cámara de desposte, 11 de sala de elaboración de embutidos y 7 de boca de expendio.

Las muestras de carne y los hisopos fueron cultivados en caldo MRS durante 24 h en anaerobiosis. Estas suspensiones se sembraron en placas con MRS agar y se incubaron a 37 °C durante 48 h en anaerobiosis. Se seleccionaron 2 colonias características por placa, las que se sometieron a un primer *screening* mediante tinción de Gram, observación de movilidad y reacción de catalasa; estas se conservaron

a -70°C con glicerol para su posterior identificación y caracterización.

Para la identificación de las colonias seleccionadas se puso a punto la técnica de PCR utilizando los *primers* que amplifican regiones específicas del género *Lactobacillus*. Los *primers* utilizados fueron LbLMA1-rev (5'-CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC-3') y R16-1 (5'-CTT GTA CAC ACC GCC CGT CAA-3')⁴. Se preparó la mezcla de reacción de PCR de 25 μl con buffer de reacción (1 \times), cloruro de magnesio (1,5-3 mM), desoxirribonucleótidos trifosfato (200 μM), *primer reverse* y *primer forward* (0,4 μM), *Taq* ADN polimerasa (5 U), agua bidestilada y ADN bacteriano (2,5 μl). Para la extracción de ADN se incubaron las cepas en caldo MRS a 37°C durante 24 h hasta llegar a la fase estacionaria. Luego, se obtuvo el ADN con el kit de extracción Wizard (Promega), que fue conservado a 4°C hasta ser utilizado. La amplificación se realizó en un termociclador marca Ivema T-17, con un programa específico que incluye desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min; 20 a 30 ciclos que incluyen: desnaturalización a 95°C por 5 min, *annealing* o unión a 55°C por 30 s y extensión a 72°C por 30 s; 7 min finales de extensión a 72°C ; y almacenamiento hasta realizar la corrida electroforética a 4°C . Las muestras fueron sembradas en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. La corrida se realizó en una cuba de electroforesis a 100 V durante 20 min. Los productos de amplificación se visualizaron mediante un transiluminador con luz UV.

Para evaluar la actividad inhibitoria de los lactobacilos aislados y seleccionados, se trabajó con la cepa de referencia *E. coli* O157:H7 EDL 933 y con aislamientos del cepario del Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología: una cepa de *Salmonella* spp. (*invA*+), aislada de cerdo, y otra de *S. aureus*, aislada de boca de expendio de carne de cerdo. Cada uno de los aislamientos seleccionados se sembró por punción en placas de MRS agar. Luego de una incubación de 48 h a 37°C en anaerobiosis, las placas fueron expuestas a vapores de cloroformo durante 15 min, para inactivar a las bacterias que hubieran crecido, y se cubrieron con una capa de agar tripticasa soya (TSA) blando (0,75% de agar) que contenía el microorganismo patógeno que sería evaluado en cada caso (*E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. o *S. aureus*). La observación de zonas translúcidas se consideró indicativa de inhibición del crecimiento de las bacterias patógenas por acción de los aislamientos de *Lactobacillus* spp. Se consideró como prueba positiva la presencia de halos de inhibición mayores de 1 mm³.

Mediante análisis fenotípico y genotípico, se identificaron 27 cepas de *Lactobacillus* spp. (34,61%), de las cuales 23 inhibieron al menos un patógeno. De ellas, 5 fueron aisladas del criadero, 2 de la sala de recepción, 4 de la cámara de desposte, 5 de la sala de elaboración y 7 de la boca de expendio. Diecisiete cepas de *Lactobacillus* spp. (62,96%) inhibieron el desarrollo de *E. coli* O157:H7, 16 cepas (59,26%) inhibieron a *Salmonella* spp. y 11 cepas (40,74%) evitaron el desarrollo de *S. aureus*. Teniendo en cuenta la capacidad inhibitoria de las cepas de *Lactobacillus* spp. frente a los tres patógenos juntos, 7 de ellas (25,92%) presentaron esta propiedad (fig. 1).

El género *Lactobacillus* es uno de los predominantes en el ecosistema gastrointestinal de animales de granja¹³. En cerdos, se encontró *Lactobacillus casei* (*L. casei*) al aislar

Resultados del efecto inhibitorio de *Lactobacillus* spp.

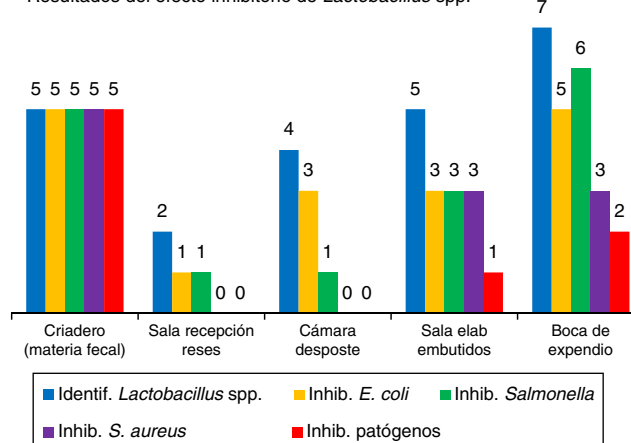


Figura 1 Resultados de la identificación de *Lactobacillus* spp. y su efecto inhibitorio frente a cada patógeno y a los tres juntos.

BAL del contenido cecal. Esta bacteria es un microorganismo reconocido como seguro y se encuentra dentro de las especies más comunes que se emplean en las preparaciones probióticas, con capacidad inhibitoria frente a una gran diversidad de patógenos. Por ejemplo, *L. casei* presenta un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de cepas de *E. coli* O157:H7 por medio de una combinación de sustancias de naturaleza peptídica, junto con una acción parcial del peróxido de hidrógeno y de la acidez del medio¹⁰. El estudio de Roldán et al.¹¹ puso de manifiesto la inhibición de este patógeno a partir de cepas de *L. casei* aisladas de un alimento cárnico fermentado. Vinderola y Reinheimer¹⁴ también proponen el uso de cepas de BAL productoras de sustancias antimicrobianas para prevenir la contaminación de diferentes matrices.

En general, se han estudiado cepas de *Lactobacillus* aisladas del contenido gastrointestinal de animales de granja, entre ellos el cerdo: contenido del intestino grueso de cerdos y calostro de cerdas. En este estudio, sin embargo, se aislaron también de muestras de materia fecal en el criadero y del ambiente (equipamiento, utensilios, mesadas) en distintas etapas de la cadena de producción porcina.

Se sabe que la carne bovina y derivados cárnicos constituyen un sustrato excelente para el aislamiento de *Lactobacillus* spp. productores de bacteriocinas¹². La carne porcina, en tanto, no ha sido matriz de estudio para el aislamiento de *Lactobacillus* hasta el momento, de allí la importancia de investigar esta posible fuente de aislamientos de interés. Por otra parte, la carne de cerdo y sus subproductos representan una excelente matriz para el desarrollo de patógenos como O157:H7 y no O157:H7. Un estudio reciente ha detectado *Salmonella* spp. y *S. aureus* en muestras obtenidas en distintas etapas de la cadena productiva porcina². Por lo tanto, estos patógenos pueden ser el origen de diversas ETA, y la capacidad de controlarlos o disminuirlos en toda la cadena de producción porcina por un medio biológico, a través de la aplicación de cepas de *Lactobacillus* —como se plantea en este estudio—, representa una alternativa beneficiosa tanto para la producción de carne y productos porcinos como para la salud pública.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

PICT-2013-1749 «Aislamiento de *Lactobacillus* spp. con actividad inhibitoria de bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos». Responsable: Dra. Analía Inés Etcheverría. Y SECAT-UNCPBA.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Castagna Ferraz S, Muller M, Macagnan M, Rodenbusch C, Wageck Canal C, Cardoso M. Detection of *Salmonella* sp. from porcine origin: A comparison between a PCR method standard microbiological techniques. *Braz J Microbiol.* 2005;36:373–7.
2. Colello R, Cáceres ME, Ruiz MJ, Sanz M, Etcheverría AI, Padola NL. From farm to table: Follow-up of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* throughout the pork production chain in Argentina. *Front Microbiol.* 2016;7:93, doi:10.3389/fmicb.2016.00093.
3. Daeschel MA. Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. En: Hoover DG, Steenson LR, editores. *Bacteriocins of lactic acid bacteria.* Academic Press; 1993. p. 63–91.
4. Dubernet S, Desmases N, Guéguen M. A PCR-based method for identification of *Lactobacilli* at the genus level. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;214:271–5.
5. Galli L. Estudio de los factores de adherencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga aisladas de bovinos. Tesis de Doctorado en Ciencia Animal. 2012. Departamento Bacteriología, ANLIS «Dr. Carlos G. Malbrán» y Universidad Nacional de la Plata.
6. Guerra N, Rua M, Pastrana L. Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. *Int J Food Microbiol.* 2001;70:267–328.
7. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Staphylococcus* y cocos gram-positivos relacionados. En: Murray P, Rosenthal K, Pfaller M, editores. *Microbiología médica.* 6.ª ed. España: Elsevier; 2009. p. 209–24.
8. Ray B, Daeschel MA. Bacteriocins of starter culture bacteria. En: Dillon VM, Board RG, editores. *Natural antimicrobial systems and food preservation.* Wallingford, United Kingdom: CAB International; 1994. p. 133–65.
9. Reid G. How science will help shape future clinical applications of probiotics. *Clin Infect Dis.* 2008;46 Suppl. 2:625–65.
10. Roberts RF, Zottola EA. Shelf life of pasteurized process cheese spreads made for Cheddar cheese manufactured with a nisin-producing starter culture. *J Dairy Sci.* 1993;76:1829–36.
11. Roldán ML, Otero JL, Villarreal F, Baroni MR, Carrasco MS, Álvarez C, Russell-White K, Méndez E, Simonetta AC. Efecto inhibitorio de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157:H7. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2011;31:37–41.
12. Schillinger U, Locke FK. Antibacterial activity of *Lactobacilli* sake isolated from meat. *Appl Environ Microbiol.* 1989;55:1901–6.
13. Tannock G, Fuller R, Pedersen K. *Lactobacillus* succession in the piglet digestive tract demonstrated by plasmid profiling. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56:1310–6.
14. Vinderola CG, Reinheimer JA. Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Res Int.* 2003;36:895–904.
15. World Health Organization [Internet]. Geneva, Switzerland. 2007 [consultado 7 jul 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/whr/2007/en/index.html>