

Formulación mixta de bacterias lácticas para el control de *Listeria monocytogenes*

Mixed formulation of lactic bacterium for the control of *Listeria monocytogenes*

García-Gonzalez E.* , García Salazar A.P.** , Rojas Dorado M. C.*** ,
Ordoñez-Artunduaga D.A.**** , Serna Cock L.*****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.55879

Resumen

La combinación de la actividad metabólica de cepas bacterianas potencializa la actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos, en comparación con la actividad que pueden presentar las cepas microbianas en forma individual. La formulación mixta de bacterias ácido lácticas ha sido estudiada para la producción de preparados probióticos con actividad antimicrobiana contra patógenos. *Listeria monocytogenes* es considerado un microorganismo patógeno para el hombre y animales, causando principalmente, la enfermedad conocida como listeriosis. Se evaluó la actividad antimicrobiana de una formulación mixta de *Lactobacillus brevis* y *Weissella cibaria* frente a *Listeria monocytogenes*. *L. brevis* y *W. cibaria* se reprodujeron por fermentaciones en discontinuo durante 48 horas. Se midió la cinética de la actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* en los siguientes tiempos de fermentación, 0, 1, 2, 6, 12, 24 y 48 horas. En cada tiempo, la actividad antimicrobiana de la mezcla de cepas se comparó con la actividad antimicrobiana de las cepas en forma individual. La actividad antimicrobiana se midió mediante el diámetro de Feret, utilizando un software de evaluación de imágenes. Se encontró que la actividad antimicrobiana de la mezcla de cepas contra *L. monocytogenes* fue estable desde la segunda hora de fermentación hasta las 48 horas. A partir de 18 horas de fermentación la mezcla de cepas presentó actividad antimicrobiana superior, comparada con las cepas individuales. Los resultados indican que la formulación mixta de *L. brevis* y *W. cibaria* podría ser una opción biotecnológica para el desarrollo de antimicrobianos naturales para el control y prevención de *L. monocytogenes*.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, fermentación, actividad antimicrobiana, cultivo mixto, cultivo antimicrobiano.

Abstract

The combination of the metabolic activity of bacterial strains potentiates the antimicrobial activity against pathogenic microorganisms, in comparison with the activity that the microbial strains can present individually. The mixed formulation of lactic acid bacteria has been studied to the production of probiotic preparations with antimicrobial activity against pathogens. *Listeria monocytogenes* is considered a pathogenic microorganism for man and animals, causing the disease known as listeriosis. The antimicrobial activity of a mixed formulation of *Lactobacillus brevis* and *Weissella cibaria* was evaluated against *Listeria monocytogenes*. *L. brevis* and *W. cibaria* were reproduced by discontinuous fermentations for 48 hours. The kinetics of antimicrobial activity against *L. monocytogenes* were measured at the next fermentation times, 0, 1, 2, 6, 12, 24 and 48 hours. At each time, the antimicrobial activity of the mixed formulation was compared with the antimicrobial activity of the strains individually. The antimicrobial activity was measured by Feret's diameter, using image evaluation software. It was found that the antimicrobial activity of the mixed formulation against *L. monocytogenes* was stable from the second hour of fermentation to 48 hours of fermentation. After 18 hours of fermentation the mixed formulation presented superior antimicrobial activity, compared to the individual strains. The results indicate that the mixed formulation of *L. brevis* and *W. cibaria* could be a biotechnological option for the development of natural antimicrobials for the control and prevention of *L. monocytogenes*.

Key words: *Listeria monocytogenes*, fermentation, antimicrobial activity, mixed culture, antimicrobial culture.

Recibido: noviembre 20 de 2016 **Aprobado:** mayo 12 de 2017

* Universidad Nacional de Colombia, egarciagon@unal.edu.co, Palmira, Colombia.

** Universidad Nacional de Colombia, apgarcias@unal.edu.co, Palmira, Colombia.

*** Universidad Nacional de Colombia, mcrojasd@unal.edu.co, Palmira, Colombia.

**** Universidad Nacional de Colombia, daordoneza@unal.edu.co, Palmira, Colombia.

***** Investigador Asociado Universidad Nacional de Colombia, lserna@unal.edu.co, Palmira, Colombia.

Introducción

La listeriosis es una enfermedad adquirida en el 99% de los casos por el consumo de alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes* y se asocia principalmente al consumo de quesos blandos y productos lácteos (Vasquez *et al.*, 2001). Una de las alternativas para enfrentar este tipo de microorganismos patógenos podría ser el uso de formulaciones con cepas mixtas, los cuales combinan el resultado de su actividad metabólica para ejercer actividad sinérgica (Bader *et al.*, 2010). La prueba de enfrentamiento dual, es el resultado de la presencia de más de un microorganismo en una misma formulación, en dicha condición es posible obtener metabolitos de interés de microorganismos seleccionados y observar la capacidad biocontroladora tanto de la cepa patógena como de la antagonista. Las bacteriocinas, compuestos de naturaleza proteica, son producidas por muchas bacterias, entre ellas las bacterias ácido lácticas (BAL), como *Lactobacillus brevis* y *Weissella cibaria* (Gautam & Sharma, 2009; Sriannual *et al.*, 2007). De estas bacterias se han producido y purificado metabolitos de carácter proteico. La actividad antimicrobiana de las BAL puede ser potencializada con la mezcla de varias cepas de BAL (Chapman *et al.*, 2011), es por esto que se ha estudiado el efecto de cepas mixtas para la producción de metabolitos de interés. En investigaciones realizadas por Calderón *et al.*, (2007), se comprobó el efecto antagonístico de los probióticos sobre *L. monocytogenes*, *E. coli* y *Salmonella spp*, y se destacó su uso para la conservación de productos lácteos. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de una formulación mixta de *Lactobacillus brevis* y *Weissella cibaria* frente a *Listeria monocytogenes*.

Materiales y métodos

Cultivo de microorganismos. Se utilizaron 2 bacterias lácticas, *Weissella cibaria* aislada del líquido ruminal bovino en trabajos anteriores (Serna *et al.*, 2010) y *Lactobacillus brevis*, aislados de cultivos de pitahaya amarilla en estudios previos de Valencia, 2015. Como microorganismo patógeno, se utilizó una cepa de *L. monocytogenes* ATCC 13932. Se realizaron fermentaciones en discontinuo de *Lactobacillus brevis* y *Weise-*

lla cibaria por triplicado. Estas fermentaciones se realizaron en Erlenmeyer de 500 mL (300 mL de volumen efectivo) y en sustrato MRS. Los tratamientos empleados fueron las fermentaciones con *L. brevis* se designaron como LB, con *W. cibaria* se designaron con WC, y la formulación mixta de *L. brevis* y *W. cibaria*, se designó como (LB+WC). Las fermentaciones LB y WC se hicieron de acuerdo a la metodología de Serna *et al.*, 2010. LB y WC se reprodujeron por separado, mediante fermentaciones independientes, a 37°C durante 48 horas. En todas las fermentaciones se tomaron muestras de 5 ml de fermentado, en los tiempos 0 (momento de inoculación), 1, 2, 6, 12, 24 y 48 horas, y se realizaron pruebas de actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes*.

Para obtener (LB+WC) se siguió la metodología de Serna *et al.*, (2010) y Kawarai *et al.*, (2007), con modificaciones, se mezclaron fermentados provenientes de LB y WC, en proporción 1:1, y con la mezcla se realizaron las pruebas de actividad antimicrobiana.

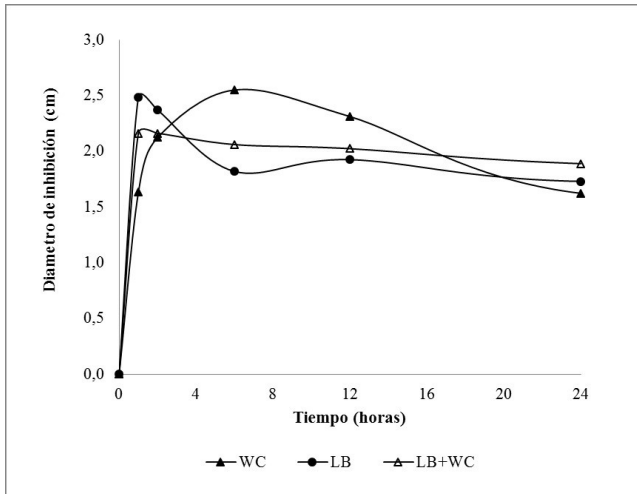
Medición de la actividad antimicrobiana. Las pruebas de actividad antimicrobiana se realizaron en cada tiempo de muestreo y para cada tratamiento. Se utilizó una modificación de la técnica de difusión en superficie de agar usada por Ryan *et al.*, (1996), así: se utilizaron placas de agar tripticasa de soya (TSA) de 5 mm de espesor, las cuales contenían nutrientes específicos para el crecimiento del patógeno *L. monocytogenes*. A estas placas se les realizaron orificios de 12 mm de diámetro, utilizando un sacabocado estéril. Se tomaron en forma aséptica, círculos de agar MRS estéril de 5 mm de espesor y de 12 mm de diámetro, los cuales se inocularon, por separado, con 60 µl de fermentado proveniente de las fermentaciones LB, WC y (LB+WC). Los círculos de agar inoculados se introdujeron en los orificios realizados en las cajas con agar TSA. Las cajas se incubaron a 36 °C por 24 horas, transcurrido este tiempo se midieron los halos de inhibición, los cuales se determinaron por la medición del diámetro de Feret, estableciendo como parámetro de medición el diámetro del orificio inoculado (12 mm), para analizar estos valores fue utilizando el software de evaluación de imágenes (Imagen j 1,40 g, Wayne Rasband, Institutos Nacionales de Salud, EE.UU).

Diseño experimental. Se utilizó un diseño de 2 factores: factor microorganismo con tres niveles (*L. brevis*, *W. cibaria*, y formulación mixta *L. brevis* + *W. cibaria*) y factor tiempo con 7 niveles (0, 1, 2, 6, 12, 24, 48 horas). La variable de respuesta fue el diámetro de inhibición del patógeno *L. monocytogenes*. Para el análisis estadístico se empleó el software R (Bell Laboratories, EEUU).

RESULTADOS

En la figura 1 se presenta la cinética de la actividad antimicrobiana de LB, WC y (LB+WC) de fermentado obtenido durante 24 horas de fermentación. Los datos de la hora 48 fueron iguales a los obtenidos en 24 horas, por lo cual no se muestran en la figura 1. No hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (LB, WC y LB+WC) ($p < 0.05$), sin embargo, se presenta diferencias estadísticamente significativas en el tiempo ($p > 0.05$).

Figura 1. Cinética de actividad antimicrobiana de *L. brevis* (LB), *W. cibaria* (WC) y formulación mixta de *L. brevis* + *W. cibaria* (LB+WC).



De la figura se destaca que en la formulación mixta la actividad antimicrobiana permanece aproximadamente constante durante todo el tiempo de fermentación, mientras que en los tratamientos con LB y WC la actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* decrece. En la formulación mixta se encontró que a partir de la hora 18 de fermentación la actividad antimicro-

biana contra *L. monocytogenes* fue mayor que la obtenida en LB y en WC. Entre los tratamientos, la mayor actividad antimicrobiana se obtuvo a la hora 6 de fermentación, con el tratamiento WC presentando diámetro de inhibición de $2,55 \pm 0,07$ cm, valor que descendió hasta $1,56 \pm 0,20$ cm en la hora 48. Por otro lado, en la formulación mixta el diámetro mayor fue $2,16 \pm 0,22$ cm en la hora 2, con valores de $1,80 \pm 0,16$ cm en la hora 48.

DISCUSIÓN

En estudios realizados por Gervasio (2012) se observó que desde la hora 2 hubo mayor presencia de bacteriocinas en el inicio de la fase logarítmica para dos cepas de *W. cibaria*, resultado similar al obtenido en el tratamiento de la formulación mixta (LB+WC), en donde a la hora 2 se presentó mayor diámetro confirmando la actividad inhibitoria contra *L. monocytogenes*, sin embargo, son varios los productos de la fermentación que podrían generar un efecto inhibitorio frente a *L. monocytogenes*, debido a que además de la producción de bacteriocinas de las BAL, *L. brevis* y *W. cibaria* son bacterias heterofermentativas, produciendo ácido láctico, etanol, diacetilo, formiato, ácido acético (Abdel-rahman, et al., 2013). La disminución de la actividad antimicrobiana de las BAL frente a *L. monocytogenes* a partir de la hora 6 de fermentación (figura 1), se puede explicar por el mecanismo de expresión llamado "quorum sensing", el cual denota un proceso que implica moléculas específicas que actúan como señales para la inducción de la expresión génica de diversos procesos (positivos o negativos), sólo cuando se ha alcanzado determinada concentración de estas moléculas (Kuipers et al., 1998). Investigaciones realizadas por Lim & Im, (2012) en donde se reportan diámetros de inhibición de 1,4 cm de *L. brevis* MLK27 frente a *L. monocytogenes* KCTC3569 en agar BHI empleando 50µl como inóculo de BAL, concuerdan con lo encontrado en este estudio, ya que en la hora 12 del tratamiento LB se presentaron diámetros de $1,82 \pm 0,17$ cm. Asurmendi et al., (2015) observaron en veintidós cepas BAL un efecto inhibitorio en el crecimiento de ocho cepas de *L. monocytogenes* con halos de inhibición entre $1,75 \pm 0,4$ cm - $2,37 \pm 1,2$ cm para *L. brevis* los cuales se asemejan a los resultados obtenidos en este estudio.

CONCLUSIONES

La formulación mixta de *L. brevis* y *W. cibaria* podría ser una opción biotecnológica para el desarrollo de antimicrobianos naturales para el control y/o prevención de listeriosis, no obstante, se requiere de investigación adicional para entender el mecanismo por medio del cual las dos bacterias ácido lácticas potencializan en el tiempo, la estabilización de la actividad antimicrobiana. *L. brevis* y *W. cibaria* son bacterias con potencial biotecnológico, ya que tienen actividad contra *L. monocytogenes*.

AGRADECIMIENTOS

A la división de investigación Palmira-DIPAL, de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, por la inclusión de semilleros al grupo de investigación GIBALABI.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 31(6), 877-902.
- Asurmendi, P., García, M. J., Pascual, L., & Barberis, L. (2015). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* by lactic acid bacteria isolated from brewer's grains used as feed-stuff in Argentina. *J Stored Prod Res*, 61(1), 27-31.
- Bader, J., Mast-Gerlach, E., Popović, M., Bajpai R., & Stahl, U. (2010). Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *J Appl Microbiol*, 109(2), 371-387.
- Calderón, O., Padilla, C., Chaves, C., Villalobos, L., & Arias, M. L. (2007). 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. *Arch Latinoam Nutr*, 57(1), 51-5.
- Chapman, C. M., Gibson, G. R., & Rowland, I. (2011). Health benefits of probiotics: Are mixtures more effective than single strains. *Eur J Nutr*, 50(1), 1-17.
- Gautam, N., & Sharma, N. (2009). Purification and characterization of bacteriocin produced by strain of *Lactobacillus brevis* MTCC 7539. *Indian J Biochem Biophys*, 46(4), 337-41.
- Gervasio, E. (2012). Determinación de sustancias tipo bacteriocinas producidas por cepas identificadas como *Weissella* sp. [Tesis para el título de: Especialista en Biotecnología]. [México D.F]. Universidad Autónoma Metropolitana. 41p.
- Kawarai, T., Furukawa, S., Ogihara, H., & Yamasaki, M. (2007). Mixed-Species Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Rice Wine Yeasts. *Appl Environ Microb*, 73(14), 4673-4676.
- Kuipers, O. P., De Ruyter, P. G. G. A., Kleerebezem, M., & De Vos W. M. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J Biotechnol*, 64(1), 15-21.
- Lim S, & Im D. 2012. Inhibitory effects of antagonistic compounds produced from *Lactobacillus brevis* MLK27 on adhesion of *Listeria monocytogenes* KCTC3569 to HT-29 cells. *Food Sci Biotech*, 21(3), 775-784.
- Serna, L., Valencia L. J., & Campos, R. (2010). Cinética de fermentación y acción antimicrobiana de *Weissella confusa* contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*, 55(1), 55-65.
- Sriannual, S., Yanagida, F., Lin, L. H., Hsiao, K. N., & Chen, Y. S. (2007). Weissellicin 110, a newly discovered bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, isolated from plaasom, a fermented fish product from Thailand. *Appl Environ Microbiol*, 73(7), 2247-50.
- Ryan, M. P., Rea, M. C., Hill, C., & Ross, R. P. (1996). An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl Environ Microb*, 62(2), 612-619.
- Valencia, L. 2015. Evaluación de la actividad fungistática *in vitro* de bacterias ácido lácticas contra especies de *Fusarium* causantes de pudrición basal en pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* Haw). [Tesis para el título de Magíster Ciencias Biológicas Directoras]. [Palmira, Colombia]. Universidad Nacional de Colombia. 109 p.
- Vázquez J, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez G, Goebel W, & Kreft J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev*, 14(3), 584-640.