

Inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* por bacterias ácido lácticas aisladas de leche cruda y queso Paraguayo

Growth inhibition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by lactic acid bacteria isolated from raw milk and Paraguayan cheese

Tomás López^{1,4} , Yadira Parra^{1,2} , Danilo Fernández¹ , Sandra Álvarez¹ , Camila Ayala^{1,3} ,
Matías Policani^{1,3}  & Gabriela Ulke¹ 

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología, San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad Nacional de Itapúa, Facultad de Ciencia y Tecnología, Maestría en Biotecnología en alimentos, San Lorenzo, Paraguay.

³Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Programa de Iniciación Científica, San Lorenzo, Paraguay.

⁴Autor correspondiente: tlopez@facen.una.py

Resumen: Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos que poseen una gran capacidad para la bioconservación. Son conocidas por la producción de una variedad de compuestos antagonistas, entre ellos las bacteriocinas. Su potencial antimicrobiano está definido por la acción combinada de los metabolitos sobre bacterias no deseadas. En este trabajo se evalúa la actividad antimicrobiana de 8 cepas de BAL aisladas de leche cruda y queso Paraguayo contra *E. coli* y *S. aureus* mediante dos metodologías: antibiograma y ensayos en medio líquido. Se observó inhibición de los patógenos con ambas metodologías. Sin embargo, encontramos mejores resultados con el ensayo en medio líquido.

Palabras clave: BAL, lácteos, bioconservación, antimicrobianos, inhibición, patógenos.

Abstract: Lactic acid bacteria (LAB) are microorganisms with great potential for biopreservation. They are known to produce a variety of antagonistic compounds, among them bacteriocins, and their antimicrobial potential is defined by the combined action of metabolites on non-desired bacteria. This work evaluates the antimicrobial activity of 8 strains of LAB isolated from raw milk and Paraguayan cheese against *E. coli* and *S. aureus* by two methodologies: antibiograms and liquid medium assays. Both methodologies yielded growth inhibition against the pathogens. However, we found better results with the liquid medium assays.

Keywords: LAB, dairy, biopreservation, antimicrobials, inhibition, pathogens.

Introducción

Las bacterias ácido láctica (BAL) constituyen un grupo heterogéneo de bacterias gram positivas, anaerobias, no esporuladoras, que pueden ser cocos o bacilos y que producen ácido láctico como principal producto durante el proceso de fermentación y poseen un gran potencial biotecnológico en la industria de alimentos (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Sabatini, 2010). Como cualquier BAL que participe en un proceso de fermentación puede producir una variedad de compuestos inhibidores, el potencial antimicrobiano de estas bacterias está dado por la acción combinada de sus metabolitos en bacterias indeseadas (Salomskiene et al., 2019).

La importancia de las pruebas de enfrentamiento

radica en tener resultados sobre actividad antimicrobiana de las BAL aisladas frente a patógenos comúnmente encontrados en los alimentos y que producen su deterioro o enfermedades transmitidas por los alimentos; para los cuales deben actuar como bacteriostáticos o bactericidas.

Materiales y Métodos

Obtención de cepas

Se utilizaron 8 cepas previamente aisladas de BAL: M6A, M6B, M16A, M17A, M17B, M18, M19 y M21 que posteriormente fueron depositadas al cepario del Departamento de Biotecnología de la FACEN-UNA. Como cepa control se utilizó *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™.

Recibido: 27/01/2020 Aceptado: 12/02/2021



Pruebas de actividad antimicrobiana

Antibiogramas

Se plantearon tres pruebas de enfrentamiento bacteriano independientes, cultivando las BAL en distintos periodos de incubación y con distintos procesos de tratamiento del sobrenadante con el fin de obtener resultados óptimos en cuanto a la actividad inhibitoria (Jabbari et al., 2017; Kormin et al., 2001).

Procedimiento 1

Se procedió a la activación de las bacterias en estudio por 24 horas en MRSA a 37 °C en atmósfera aerobia. Pasado el periodo, se tomaron con un asa de siembra 5 µL de colonias provenientes de los cultivos, y se traspasaron a tubos que contenían 5 mL del MRSB, y se incubaron por 19 horas a 37 °C. Luego se tomaron 3 mL de las cultivos y se centrifugaron a 8290 g por 20 minutos a 4 °C. Se filtró el sobrenadante con filtros de 0,22 µm SFCA (Minisart, Sartorius), logrando así un sobrenadante libre de células. Posteriormente, se procedió a la realización de pocillos de 5 mm en placas con MHA y se agregó 10 µL de MHA en cada pocillo para cerrar el fondo del mismo y se dejó gelificar. Se colocaron 25 µL del sobrenadante libre de células en cada pocillo. Una vez colocadas las muestras se incubaron a 4 °C durante 2 horas para permitir que el sobrenadante se difundiera.

Se inocularon 100 µL cada una de las cepas patógenas de 24 horas de incubación en Agar LB, *E. coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 25922™) y *S. aureus* subsp. aureus Rosenbach (ATCC® 25923™) y se realizó el hisopado por toda la placa creando un césped homogéneo. Posteriormente se incubaron a 37 °C por 18 horas en atmósfera de aerobiosis. Por último, se procedió al control de los resultados midiendo el halo de inhibición, con ayuda de una regla de vernier. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Procedimiento 2

Se realizó primeramente la activación de las bacterias en estudio por 24 horas en MRSA a 37 °C en atmósfera aerobia, pasado el periodo, tomando un

asa de siembra de 5 µL de colonias provenientes de los cultivos y se traspasaron a tubos con 5 mL de MRSB, se incubaron por 93 horas a 37 °C; se tomaron 3 mL de los cultivos y se centrifugaron los 3 mL a 8290 g por 20 minutos a 4 °C. Se filtró el sobrenadante con filtros de 0,22 µm SFCA (Minisart, Sartorius), logrando así un sobrenadante libre de células. Posteriormente se procedió a la realización de pocillos de 5 mm en placas con MHA y se agregó 10 µL de MHA en cada pocillo para cerrar el fondo del mismo y se dejó gelificar. Se colocó 25 µL del sobrenadante libre de células en cada pocillo, una vez colocadas todas las muestras se incubaron a 4 °C durante 2 horas para permitir que el sobrenadante se difundiera.

Se inoculó 100 µL de cada una de las cepas patógenas de 24 horas de incubación en Agar LB, *E. coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 25922™) y *S. aureus* subsp. aureus Rosenbach (ATCC® 25923™) y se realizó el hisopado por toda la placa creando un césped homogéneo. Posteriormente se incubaron a 37 °C por 18 horas en atmósfera de aerobiosis. Por último, se procedió al control de los resultados midiendo el halo de inhibición, con ayuda de una regla de vernier. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Procedimiento 3

Se realizó sin tratamiento previo del sobrenadante, dejando en el mismo todas las células bacterianas presentes; primeramente, activando las bacterias en estudio por 24 horas en MRSA a 37 °C en atmósfera aerobia, pasado el periodo, se tomó un asa de siembra de 5 µL de colonias provenientes de los cultivos y se traspasaron a tubos con 5 mL del MRSB, se incubaron por 24 horas a 37 °C. Se realizaron pocillos en placas con MHA y se agregó 10 µL de MHA en cada pocillo para cerrar el fondo del mismo y se dejó gelificar, se colocó 25 µL del cultivo no tratado en cada pocillo.

Se inoculó 100 µL de las cepas patógenas de 24 horas de incubación en Agar LB, *E. coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 25922™) y *S. aureus* subsp. aureus Rosenbach (ATCC®

Tabla 1. Tratamientos utilizados en la prueba de inhibición en medio líquido.

Tratamientos		Componentes (240 µL)
1	Medio estéril	200 µL de medio LB + 40 µL de agua estéril
2	Control 1	185 µL de agua estéril + 40 µL de medio LB + 15 µL de patógeno ($1,5 \times 10^5$ UFC/mL)
3	Control 2	185 µL de medio MRSB + 40 µL de medio LB + 15 µL de patógeno ($1,5 \times 10^5$ UFC/mL)
4	Medio + Agua	185 µL de medio MRSB + 40 µL de medio LB + 15 µL de agua estéril
5	Blanco	40 µL de medio LB + 185 µL de sobrenadante + 15 µL de agua estéril
6	Ensayos	40 µL de medio LB + 185 µL de sobrenadante + 15 µL de patógeno ($1,5 \times 10^5$ UFC/mL)
7	Control +	40 µL de medio LB + 185 µL de <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC® 8014™ + 15 µL de patógeno ($1,5 \times 10^5$ UFC/mL)

25923™) y se realizó el hisopado por toda la placa creando un césped homogéneo. Posteriormente se incubaron a 37 °C por 18 horas. Por último, se procedió al control de los resultados midiendo el halo de inhibición; todos los ensayos se realizaron por triplicado (Kormin et al., 2001).

En los tres procedimientos se utilizó la cepa *Lactobacillus plantarum* (Orla-Jensen) Bergey et al. (ATCC® 8014™), como control positivo de potencial inhibidor frente a las bacterias patógenas humanas y como control negativo se utilizó suero fisiológico al 0,9% estéril.

Prueba en medio líquido

Preparación de sobrenadantes y patógeno

Se cultivaron las cepas de BAL en medio MRSB por 24 h a 37 °C y las cepas patógenas *E. coli* y *S. aureus* en medio LB por 24 hs a 37 °C, ambas en una incubadora de CO2 serie 3 water-jacketed (Thermo Scientific™), con una atmósfera de CO2 de 0,1%. Se centrifugaron los cultivo de los patógenos a 4500 rpm por 10 min a 10 °C en una centrífuga refrigerada TGL-16M (Boyn™), se desechó el sobrenadante y se resuspendió en PBS (1X). Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 600 nm buscando llegar a una absorbancia de equivalente a $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. Luego, se hicieron dos diluciones seriadas 1:10. Por otra parte, se centrifugaron los cultivos de

BAL a 6000 g (7600 rpm) por 20 minutos a 4 °C y se recuperaron los sobrenadantes. Luego se filtraron los sobrenadante con filtros de 0.22 µm (Sartorius) y se neutralizaron con hidróxido de sodio hasta un pH de 6~7 (Gellert et al., 1999; Zimina et al., 2016).

Finalmente, se incubó en una placa multipocillo (×96) a 37 °C por 24 h en un Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific™), acorde a los tratamientos presentados en la Tabla 1, y se midió la densidad óptica a 620 nm cada 30 min por espectrofotometría durante la incubación (Gellert et al., 1999; Zimina et al., 2016). Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado; como control positivo se utilizó se utilizó la cepa *Lactobacillus plantarum* (Orla-Jensen) Bergey et al. (ATCC® 8014™) y como controles negativos se utilizaron: medio LB y agua estéril (Control 1) y medio MRSB y medio LB (Control 2), ambas inoculadas con 15 µL de *L. monocytogenes* ($1,5 \times 10^5$ UFC/mL).

Cálculo del porcentaje de inhibición

Para el cálculo del porcentaje de inhibición se procedió a utilizar la absorbancia máxima del tratamiento y del control y se utilizó la siguiente fórmula:

$$I = \frac{Abs_t - Abs_c}{Abs_c} \times 100$$

Donde:

I = Porcentaje de inhibición.

Abs_t = Absorbancia máxima del tratamiento.

Abs_c = Absorbancia máxima del control.

Resultados y discusión

Antibiogramas

En esta investigación se realizaron en total doce enfrentamientos, todos por triplicado, siguiendo las tres metodologías descritas en todos los casos. Aunque las BAL hayan tenido corto o largo periodo de incubación, los resultados arrojaron valores mínimos en cuanto a inhibición de las bacterias patógenas con las que fueron enfrentadas. Esto puede deberse a la falta de estrés de las BAL, las cuales para que liberen sus metabolitos secundarios deben tener un periodo de incubación prolongado o faltantes de nutrientes en su medio.

En todas las pruebas se detectaron zonas de inhibición mayores a 1 mm (Tablas 2-4). En la prueba del estudio de Kormin *et al.* (2001) se registró una sola zona de inhibición pequeña, indicando así un efecto inhibitorio de crecimiento frente a otras cepas; una variable de importancia fue el control

Tabla 2. Prueba de actividad antimicrobiana en placa con cultivos de BAL de 19 horas de incubación.

Muestra	Cepa patógena			
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Promedio (mm)	Desviación estándar (mm)	Promedio (mm)	Desviación estándar (mm)
M6A	0,00	0,00	2,00	3,46
M6B	0,00	0,00	4,70	4,04
M16A	0,00	0,00	0,00	0,00
M17A	0,00	0,00	6,70	0,58
M17B	1,30	2,30	7,00	0,00
M18	0,00	0,00	2,30	4,04
M19	0,00	0,00	2,30	4,04
M21	0,00	0,00	2,30	4,04
Control	0,00	0,00	5,30	1,15

Tabla 3. Prueba de actividad antimicrobiana en placa con cultivos de BAL de 93 horas de incubación.

Muestra	Cepa patógena			
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Promedio (mm)	Desviación estándar (mm)	Promedio (mm)	Desviación estándar (mm)
M6A	0,00	0,00	0,00	0,00
M6B	0,00	0,00	0,00	0,00
M16A	0,00	0,00	2,00	3,46
M17A	0,00	0,00	0,00	0,00
M17B	0,00	0,00	0,00	0,00
M18	2,00	3,46	2,67	4,62
M19	0,00	0,00	2,67	4,62
M21	2,00	3,46	0,00	0,00
Control	0,00	0,00	0,00	0,00

del pH en los ensayos, pues el mismo es un factor muy importante para la producción de agentes antimicrobianos de las BAL (Biswas *et al.*, 1991; Parente *et al.*, 1994), inhibiendo así el crecimiento bacteriano de cepas patógenas.

Procedimiento 1

Para el primer procedimiento se procedió según la metodología descrita en Jabbari *et al.* (2017), donde se enfrentaron 8 cepas de BAL aisladas y reactivadas por 19 horas. En el caso de *E. coli* solo se observó un halo de inhibición frente a M17B y en el caso de *S. aureus* se observó un halo de inhibición para todas las cepas estudiadas a excepción de M16A, los mayores halos corresponden a M17A (6,70 mm) y M17B (7,00 mm) (Tabla 2).

Procedimiento 2

En este procedimiento se cultivaron las 8 cepas de BAL aisladas por 93 horas frente a cepas patógenas alimentarias, se obtuvieron halos de inhibición en el caso de *E. coli* frente a M18 y M21, ambos de 2,00 mm y para *S. aureus* se observaron halos de inhibición frente a M16A, M18 y M19. Con este

procedimiento no se obtuvieron halos frente al control positivo (Tabla 3), por lo que no es recomendable utilizar.

Procedimiento 3

En la tercera prueba de enfrentamiento la variable principal fue la no realización de los tratamientos previos de las células bacterianas posteriores a su incubación de 24 horas, las 8 cepas de BAL fueron aisladas y reactivadas por 24 horas y enfrentadas a cepas patógenas alimentarias; no se obtuvieron halos de inhibición en el caso del enfrentamiento con *E. coli* y en el caso de *S. aureus* se observaron halos frente a M6A, M17A, M18, M19, M21 y el control (Tabla 4). Los mayores halos de inhibición corresponden a M18 (4,33 mm) y M21 (4,00 mm).

Usando como base el estudio de Jabbari *et al.* (2017), de 40 muestras de origen lácteo, se obtuvieron 11 BAL aisladas, y en el estudio de antagonismo de todas ellas frente a bacterias patógenas como son *S. tiphy*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. coli* frente a los aislados se obtuvieron valores más significativos, donde una de las variables es el periodo de incubación de las BAL en el proceso

Tabla 4. Prueba de actividad antimicrobiana en placa con cultivos de BAL de 24 horas de incubación sin tratamiento previo del sobrenadante.

Muestra	Cepa patógena			
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Promedio (mm)	Desviación estándar (mm)	Promedio (mm)	Desviación estándar (mm)
M6A	0,00	0,00	2,00	3,46
M6B	0,00	0,00	0,00	0,00
M16A	0,00	0,00	0,00	0,00
M17A	0,00	0,00	2,00	3,46
M17B	0,00	0,00	0,00	0,00
M18	0,00	0,00	4,33	3,79
M19	0,00	0,00	2,00	3,46
M21	0,00	0,00	4,00	3,46
Control	0,00	0,00	2,30	4,04

previo al enfrentamiento y la atmósfera modificada de oxígeno. En el estudio mencionado se utilizaron incubaciones de 48 y 72 horas, produciendo mayor estrés a las BAL; en cambio en las tres pruebas realizadas en este estudio, los periodos de incubación fueron sólo de 19, 24 y hasta 93 horas; sugiriendo que cuanto más estresadas se encuentran las BAL, mayor poder de inhibición tienen frente a patógenos. Otros estudios demuestran que el efecto inhibidor de BAL frente a *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum* y *Clostridium perfringens*, todas ellas reconocidas patógenas de origen alimentario, que son de aún mayor relevancia ya que son las de mayor incidencia y prevalencia en los estudios referidos a enfermedades de transmisión alimentaria.

Las pruebas referidas al enfrentamiento antagónico realizadas en el presente trabajo posibilitaron determinar cuáles BAL aisladas son posibles productoras de bacteriocinas y qué enfrentamientos realizar en nuevas pruebas.

Prueba en medio líquido

Se realizaron 3 repeticiones de cada ensayo para cada uno de los patógenos, cuyos resultados se observan en la Tabla 5.

Se observaron porcentajes de inhibición de hasta 99% en algunos casos. Sin embargo, se observa que existen diferencias en el porcentaje de inhibición entre repeticiones de algunos de los sobrenadantes analizados.

Conclusión

En casi todos los estudios bibliográficos se determina que las BAL tienen varios compuestos con propiedades inhibitorias frente a bacterias patógenas y deteriorantes de alimentos, por lo que es importante en este estudio destacar que debemos proseguir con los ensayos de inhibición, con las bacterias aisladas e identificadas determinando las fuentes de actividad inhibitoria como ácidos orgánicos, peróxidos de hidrógeno y bacteriófagos.

Si bien se observaron inhibiciones de crecimiento para todos los métodos utilizados, los

Tabla 5. Porcentajes de inhibición obtenidos mediante la prueba de inhibición en medio líquido.

Muestra	Porcentaje de Inhibición					
	Cepa Patógena					
	<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
M6A	14,66%	4,82%	-3,28%	-29,08%	31,17%	-44,36%
M6B	7,32%	56,84%	-7,18%	-	31,58%	-46,06%
M16A	31,34%	-0,35%	-	-	-4,32%	-99,68%
M17A	-	24,60%	18,90%	-	25,60%	-93,50%
M17B	-	0,27%	-5,89%	-	-33,44%	-61,59%
M18	10,12%	33,71%	35,93%	-99,44%	-99,68%	-
M19	4,89%	72,42%	32,21%	-99,46%	33,36%	-36,12%
M21	-99,47%	-99,78%	-	-83,62%	12,30%	-99,46%
Control	13,14%	-97,93%	-	-98,10%	-99,74%	-92,07%

métodos que mejor funcionaron en términos generales son el procedimiento 1 de antibiogramas y la prueba en medio líquido. Además, en todos los ensayos se observó que *S. aureus* fue más susceptible a los tratamientos que *E. coli*.

Para obtener mejores resultados se recomienda la estandarización y optimización de los dos métodos mencionados anteriormente para reducir la varianza que existe entre distintas repeticiones.

Por otro lado la utilización de la prueba en medio líquido es interesante no solo porque permite cuantificar la inhibición lo que hace sea más fácil de comparar los resultados sino también porque la utilización de placas multipocillos permite realizar diferentes ensayos y/o tratamiento en simultáneo por lo que permite ahorrar tiempo y reactivos debido a que se trabajan con volúmenes menores en comparación con las pruebas de antibiograma. Por lo que los posteriores ensayos de inhibición serán realizados mediante esta metodología.

Agradecimientos

El trabajo se realizó en el marco del proyecto “Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de Lactobacilos aisladas de productos lácteos (PINV15-681)” financiado por el CONACYT a través de su programa PROCENCIA.

Literatura citada

- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: Extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7): 2939–2951.
- Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M. C., & Ray, B. (1991). Influence of Growth Conditions on the Production of a Bacteriocin, Pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), 1265–1267.
- Gellert, G., Stommel, A., & Trujillano, A. B. (1999). Development of an optimal bacterial medium based on the growth inhibition assay with *Vibrio fischeri*. *Chemosphere*, 39(3), 467–476.
- Jabbari, V., Mokarram, R. R., Khiabani, M. S., Askari, F., Ahmadi, E., Hassanzadeh, A. mohammad, Aghazadeh, S. buick, Asgharzadeh, M., & Kafil, H. S. (2017). Molecular Identification of *Lactobacillus acidophilus* as a probiotic potential from traditional doogh samples and evaluation of their antimicrobial activity against some pathogenic bacteria. *Biomedical Research*, 28(4): 1458–1463.
- Kormin, S., Rusul, G., Radu, S., & Ling, F. H. (2001). Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Fermented

- Food. *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS*, 8(1), 63–68.
- Parente, E., Ricciardi, A., & Addario, G. (1994). Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 14ONWC during batch fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(4), 388–394.
- Sabatini, N. (2010). A Comparison of the Volatile Compounds, in Spanish-style, Greek-style and Castelvetrano-style Green Olives of the Nocellara del Belice Cultivar. Pp. 219–231 in Preedy, V. & Watson, R. (eds.). *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Amsterdam: Academic Press. 746 pp.
- Salomskiene, J., Jonkuviene, D., Macioniene, I., Abraitiene, A., Zeime, J., Repeckiene, J., & Vaiciulyte-Funk, L. (2019). Differences in the occurrence and efficiency of antimicrobial compounds produced by lactic acid bacteria. *European Food Research and Technology*, 245(3), 569–579.
- Zimina, M. I., Sukhih, S. A., Babich, O. O., Noskova, S. Yu., Abrashina, A. A., & Prosekov, A. Yu. (2016). Investigating antibiotic activity of the genus *Bacillus* strains and properties of their bacteriocins in order to develop next generation pharmaceuticals. *Food and Raw Materials*, 4(2), 92–100.