

Cinética de desarrollo, producción de bacteriocinas y efecto antilisterial de *Lactococcus lactis* nativo en leche

Carro, Silvana¹; González Revello, Álvaro¹; Cal, Karina²; Lorenzo Gonzalo³; Raffo, Martín³; Rodríguez Ignacio³; Calliari, Aldo⁴; Escobar, Daniela⁵; Pelaggio, Ronny⁶; V. Velázquez-Ordóñez V⁶

¹Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche, Facultad de Veterinaria, UdelaR. ²Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. ³Tesis de Grado, Facultad de Veterinaria. ⁴Departamento de Biología Celular y Molecular, Área Biofísica, Facultad de Veterinaria, UdelaR. ⁵Gerencia de Investigación, Desarrollo e Innovación Laboratorio Tecnológico del Uruguay LATU. ⁶Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México

Introducción

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son componentes de cultivos iniciadores o *starter* utilizados en la industria alimentaria (Axelsson, 2004). Éstas al igual que otros microorganismos pueden ser capaces de generar diferentes sustancias antimicrobianas, entre ellas las bacteriocinas, definidas como péptidos con actividad antimicrobiana, producidos por síntesis ribosomal (García y col., 2010). Las bacteriocinas producidas por BAL son de interés por su potencial acción bioconservante, existiendo varias reconocidas por la FDA con el *status* de "seguras" o GRAS (Generally Recognized as Safe) (Dal Bello y col., 2012). En este sentido, las bacteriocinas constituyen una barrera útil, que actúan sinérgicamente con otros tratamientos de conservación en la obtención de alimentos inocuos. En la industria láctea gran parte de los cultivos iniciadores comerciales se integran por diferentes cepas de *Lactococcus lactis*, para la elaboración de queso y otros productos fermentados. Además, se han identificado y caracterizado varias cepas de *L. lactis* aisladas de diferentes fuentes, las que producen diferentes tipos de bacteriocinas. La Nisina, descrita en 1928, fue una de las primeras bacteriocinas aisladas, producida por *Lactococcus lactis lactis* (de Arauz y col., 2009). El espectro de acción antimicrobiana de algunas bacteriocinas producidas por BAL es amplio e incluye microorganismos alterantes y/o patógenos de los alimentos como por ejemplo *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum* entre otros. *Listeria monocytogenes* es un patógeno emergente, el cual es un peligro para la salud pública y que presenta leve o mediana resistencia a los sistemas de conservación tradicionales, como la refrigeración o la acidificación, incluso se ha demostrado que sobrevive a las condiciones de congelación (Gurira y Buys, 2005; Gandhi y Chikindas, 2007).

Resultados y Discusión

Crecimiento y producción de bacteriocinas en leche

El número máximo de células viables se obtuvo a las 10 hs de incubación (8,17 Log UFC/mL). En cuanto a la producción de bacteriocinas, la actividad se detectó desde las 9 hs de incubación y hasta el final del ensayo (30hs). La actividad máxima alcanzada fue 200 UA/mL a las 12 hs de incubación correspondiéndose con el final de la fase exponencial e inicio de la fase estacionaria (Fig. 1).

En concordancia con estos resultados varios autores han informado que la biosíntesis de bacteriocinas y particularmente de la nisina se produce durante la fase de crecimiento exponencial y que se ve afectada por el medio de cultivo (tipo y nivel de nutrientes) y las condiciones ambientales, entre otras (Powell y col., 2007; Settani y col., 2008; de Arauz y col., 2009). Luego de las 12 hs de incubación la actividad disminuyó más del 50%. Se mantuvo en este valor hasta las 30 hs.

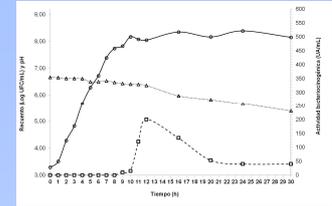


Figura 1. Curva de crecimiento y producción de bacteriocinas de *L. lactis* nativo en leche (RSM) a 30°C. Valores promedio de: Recuento bacteriano en Log UFC/mL (○) y producción de bacteriocinas en UA/mL (□) y pH (Δ) (N=3; n=3)

Esta disminución puede deberse al agotamiento de nutrientes, degradación de proteínas, adsorción a la célula productora y/o diferentes efectos en la producción debido a un pH bajo (Settani y col., 2008; de Arauz y col., 2009)

El objetivo de este trabajo fue determinar la cinética de crecimiento y producción de bacteriocinas de *Lactococcus lactis* nativo en leche, así como evaluar el efecto antimicrobiano producido sobre *Listeria innocua* en dicha matriz.

Efecto antimicrobiano en leche

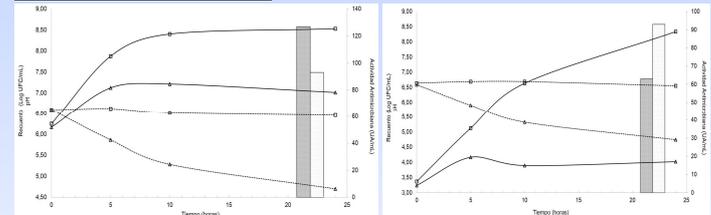


Figura 2. Crecimiento de *L. innocua* en co-cultivo con *L. lactis* nativo en leche (RSM) a 35°C, Tratamiento A (dosis alta de *Listeria* - Izquierda), Tratamiento B (dosis baja de *Listeria* - derecha). Valores promedio del Recuento bacteriano en Log UFC/mL de: co-cultivo (△), control de *Listeria innocua* (□), pH co-cultivo (△), pH control de *Listeria innocua* (□). Actividad antimicrobiana en UA/mL de: co-cultivo (○) y control de *L. lactis* (○). (N=3; n=3).

Existieron diferencias significativas ($p < 0.01$) en los recuentos de *L. innocua* de ambos tratamientos (A y B) en comparación con los respectivos controles. Dichas diferencias se encontraron a las 5, 10 y 24hs de incubación. En el tratamiento A, el crecimiento de *L. innocua* a las 24hs resultó 1,52 Log UFC/mL menor con respecto al control. Mientras que en el tratamiento B el efecto inhibidor del crecimiento (posible efecto bacteriostático) fue más acentuado ya que el crecimiento de *L. innocua* a las 24hs fue 4,32 Log UFC/mL menos que el tratamiento control. Los resultados observados coinciden en parte, con lo reportado por Cosentino y col., (2012), que obtuvieron luego de 24 hs de incubación 4 Log UFC/mL menor en el co-cultivo con respecto al control. En cuanto al pH, existieron diferencias significativas en ambos tratamientos en comparación con los controles (5,10 y 24 hs). Esta reducción del pH es debida a la incorporación de la BAL nativa (producción de ácido láctico) ya que no existieron cambios en el pH del control de *Listeria*. En este sentido es probable que la reducción del número de *L. innocua* en los tratamientos A y B sea en parte por un efecto independiente del grado de pH alcanzado (producción de bacteriocinas), al menos a las 10 hs de incubación donde la media de pH fue de 5.3 y existieron diferencias significativas en el recuento de *Listeria*. Esto se respalda con lo descrito por Sorrells y col., 1989 respecto a su resistencia a pH ácido, pudiendo crecer a pH entre 5,0-9,6 e incluso a pH 4,4. Con respecto a la actividad bacteriocinogénica, a las 24hs fue detectada en todos los tratamientos (A, B y en el control de *L. lactis* individual) y el título en UA/mL fue similar al obtenido durante las curvas de crecimiento de *L. lactis* nativo.

Materiales y Métodos

Lactococcus lactis GU967439 (secuenciación del gen 16S del rRNA) es una BAL nativa, aislada de leche cruda utilizada para la elaboración de quesos artesanales en Colonia, Uruguay. En estudios previos de este grupo se ha demostrado, su efecto antimicrobiano *in vitro* frente a *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*; debido a sustancias proteicas tipo bacteriocinas (González, 2012; Fraga y col., 2013).

Para cumplir con el objetivo del presente trabajo, se realizaron curvas de crecimiento de *L. lactis* en leche en polvo descremada estéril al 10% (RSM) a 30°C/30hs (Valbuena y col., 2008). A su vez, se determinó su actividad acidificante por pH y la cinética de producción de bacteriocinas a través del método "well diffusion", expresada en unidades arbitrarias de actividad por mililitro (UA/mL) (Fraga y col., 2008). Cada ensayo se realizó por duplicado y se realizaron tres ensayos de manera independiente.

Por otra parte, se evaluó la capacidad de *L. lactis* nativo para antagonizar el crecimiento de *L. innocua* durante su co-cultivo en RSM a 35°C/24 hs (Cosentino y col., 2012). Se utilizaron 2 tratamientos (A y B) variando la concentración de *Listeria innocua*. El tratamiento A utilizando 6 Log UFC/mL y el tratamiento B con 3 Log UFC/mL. En A y B la dosis de *L. lactis* nativo fue de 6 Log UFC/mL. Como controles, se evaluaron en paralelo el crecimiento de cada uno de los microorganismos. Luego de 0, 5, 10, y 24 hs, se realizaron el recuento de *L. lactis* y de *L. innocua*, y el control de pH a los mismos tiempos. A las 24 hs se evaluaron muestras para actividad bacteriocinogénica.

Análisis Estadístico

Los resultados de los recuentos, el pH y la actividad bacteriocinogénica se analizaron independientemente mediante ANOVA ($p < 0,001$) considerando los efectos fijos de tratamiento, tiempo y la interacción tratamiento/tiempo.

Conclusiones

L. lactis nativo es capaz desarrollarse y producir bacteriocinas en leche, alcanzado un nivel máximo al inicio de la fase estacionaria. En cuanto al efecto *in situ* sobre *Listeria innocua*, la incorporación de esta BAL en un co-cultivo afectó su desarrollo de forma significativa (posible efecto bacteriostático) en las concentraciones y períodos evaluados.

Bibliografía

- Axelsson, L. (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: Salminen, S.; von Wright, A.; Ouwehand, A. (Eds.) Lactic Acid bacteria, New York, Marcel Dekker, pp 1-66.
- Cosentino, S.; Fadda, M.E.; Deplano, M.; Mellis, R.; Pomata, R.; Pisano, M.B. (2012) Antilisterial activity of nisin-like bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from traditional Sardinian dairy products. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Articles in Press.
- Dal Bello, B.; Coccolin, L.; Zepa, G.; Field, D.; Cotter, P.; Hill, C. (2012) Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology* 153:59-65.
- de Arauz L.J.; Jozalías, A.F.; Mazzitab P.G.; Penna, T.C.V. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends. Food. Sci. Tech.* 20: 146-154. 2009.
- De Vuyst, L.; Vandamme, E.J. (1992) Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *Journal of General Microbiology* 138:571-578.
- Fraga, M.; Perelmutter, K.; Deluchil, L.; Cidade, E.; Zunino, P. (2008) Vaginal lactic acid bacteria in the mare: evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 93:71-78.
- Gandhi, M.; Chikindas, M.L. (2007) *Listeria*: A foodborne pathogen that knows.
- García, P.; Rodríguez, L.; Rodríguez, A.; Martínez, B. (2010) Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science and Technology* 21:373-382.
- González, A. (2012) *Lactococcus Lactis* Autóctono: Efecto Antilisterial y evaluación de propiedades sensoriales en quesos tipo cuartirolo. Tesis de grado. Universidad de la República. Uruguay. 61 p.
- Gurira, O.Z.; Buys, E.M. (2005) Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. *Food Microbiology* 22:159-168.
- Powell, J.E.; Witthuhn, R.C.; Todorov, S.D.; Dicks, L.M.T. (2007) Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *International Dairy Journal* 17:190-198.
- Settani, L.; Valmorri, S.; Suzzi, G.; Corsetti, A. The role of environmental factors and medium composition on bacteriocin like inhibitory substances (BLIS) production by *Enterococcus mundtii* strains. *Food Microbiol.* 25: 722- 728. 2008.
- Sorrells, K. D Enigi & J Hatfield. Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot.* 52: 571-573. 1989.
- Valbuena, E.; Barreiro, J.; Sánchez, E.; Castro, G.; Kutichinskaya, V.; Briñez, W. (2008) Predicción del crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en leche descremada estéril en función a la temperatura. *Revista Científica FCV-LUZ* 18:745-758.