

Efecto bactericida de diferentes poblaciones de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* sobre *Escherichia coli* ATCC 25922TM inoculado en queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio durante el almacenamiento

Bactericidal effect of different populations of *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* on *Escherichia coli* ATCC 25922TM inoculated on Buttery cheese produced in laboratory conditions during the storage

Henry Yony Risco Torres

Universidad César Vallejo, Trujillo, Perú
Henry_risco@hotmail.com

Resumen

El presente artículo tiene como objetivo determinar el efecto bactericida de *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* sobre *E. coli* en queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio. Para lo cual se utilizó el método de recuento en placa y los resultados se expresaron en UFC/g.

Se trabajaron tres ensayos problema y uno control, donde se adicionó al queso mantecoso en la etapa del amasado por separado tres poblaciones iniciales de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* (10^3 , 10^6 y 10^9 UFC/mL) sobre una población inicial de *Escherichia coli* ATCC 25922 (10^3 UFC/mL) en cada ensayo problema, mientras que para el grupo control solo se inoculó una población inicial de *Escherichia coli* ATCC 25922 (10^3 UFC/mL). Las muestras fueron almacenadas a una temperatura de 8 ± 2 °C por 15 días.

El método de recuento bacteriano en placa permitió conocer que la población inicial de 10^9 UFC/mL de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* agregada al queso mantecoso en la etapa del amasado, ejerció un efecto bactericida sobre la población 10^3 UFC/mL de *E. coli* puesto que redujo a dicha bacteria hasta una población de 10 UFC/g en el día 15 de la investigación.

Descriptores: Queso mantecoso, *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus*, *E. coli*, Efecto bactericida, población.

Abstract

This article aims to determine the bactericidal effect of *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* on *E. coli* on Buttery cheese made under laboratory conditions. For which the counting method was used in plaque and the results expressed as UFC/g.

They worked three trials problem and one control, where it was added to the buttery cheese at the stage of initial mixing three separate populations of *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* (10^3 , 10^6 and 10^9 UFC/mL) on an initial population of *Escherichia coli* ATCC 25922 (10^3 UFC/mL) in each test problem, while control group only an initial population of *Escherichia coli* ATCC 25922 was inoculated (10^3 CFU/mL). Samples were stored at a temperature of 8 ± 2 °C for 15 days.

The method of bacterial plate count envisioned that the initial population of 10^9 UFC/mL of *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* added to the Buttery cheese at the stage of mixing, exerted a bactericidal effect on the population 10^3 UFC/mL *E. coli* since which it reduced the bacteria to a population of 10 UFC/g on day 15 of the investigation.

Keywords: Buttery cheese, *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus*, *E. coli*, Bactericidal effect, Population.

1. Introducción

El queso mantecoso es rico en vitaminas, proteínas y minerales que son requeridos para nuestra alimentación y el buen funcionamiento de nuestros sistemas; sin embargo, los quesos mantecosos artesanales también son los de mayor riesgo potencial de intoxicación e infecciones alimentarias, debido a que en la producción muchas veces se utiliza materia prima contaminada con bacterias como *Escherichia coli* ó son manipulados en condiciones antihigiénicas. Los nutrientes que contiene permiten un rápido crecimiento de los microorganismos que alteran los alimentos y generan un riesgo para el consumidor, es por ello la preocupación de asegurar la inocuidad del mismo. El *Lactobacillus rhamnosus* aporta no solo ácido láctico al alimento si no también bacteriocinas que de acuerdo a la población en el producto podría otorgar efectos bactericidas sobre *Escherichia coli*, responsables de infecciones alimentarias y del deterioro acelerado del alimento. La adición de *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* en la producción de queso mantecoso regula la carga inicial de bacterias presentes en el producto, mejorando la condición sanitaria del queso, permitiendo que se reduzca el uso de conservantes y preservantes en el queso mantecoso

En la presente investigación se usó *Lactobacillus casei* var *rhamnosus*, quien posee la capacidad de producir bacteriocinas, como principal producto bactericida. La presencia de este antibacteriano inhibe y controla el crecimiento del *Escherichia coli* presente en el queso mantecoso

Los quesos elaborados artesanalmente, han sido causa frecuente de diversas infecciones alimentarias, cuando son consumidos después de estar expuesto a condiciones no apropiadas durante su proceso de elaboración o en el almacenamiento. Estas enfermedades alimentarias son producidas principalmente por microorganismos tales como: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *coliformes*, *Staphylococcus aureus*, entre otros consideradas entre las principales causas de intoxicación alimentaria a nivel mundial y substancialmente en Latinoamérica y el Caribe (Caldaz, 2008; Díaz *et al.* 2001; Cristóbal y Maurtua 2003; Espinoza, 2003, Mercado, 2007) Citado por Acevedo *et al.* 2013). [1]

El efecto de esta situación puede ocasionar Enfermedades de transmisión alimentaria (ETA'S), como gastroenteritis por *Escherichia coli* (enterohemorrágica), una enfermedad caracterizada por una abundante diarrea de carácter hemorrágico, dolores abdominales, fiebre y en los casos más

severos, la toxina puede provocar anemia e insuficiencia renal.

De lo anteriormente expuesto este proyecto propone contrarrestar las causas de diversas infecciones alimentarias producidas por *Escherichia coli*, inoculando cepas de *Lactobacillus casei* var *Rhamnosus* en el proceso de elaboración del queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio, lo que permitirá crear un efecto bactericida contra *Escherichia coli*.

Roldán *et al.* (2011), demostraron que la cepa de *L. casei* ensayada podría ser utilizada como herramienta biotecnológica útil para impedir el desarrollo de *E. coli* O157:H7 en caso de contaminación de un producto alimentario, especialmente cárnico, con este patógeno, como también han informado previamente otros investigadores. Estos resultados fueron alentadores, ya que cepas de BAL aisladas a partir de un ecosistema regional, pueden convertirse en una herramienta biotecnológica útil para controlar *E. coli* O157:H7. [2]

Álvarez (2011), realizó un estudio de la aplicación de las concentraciones de *Lactobacillus casei* ATCC 393™ inoculadas al queso fresco, determinó que es necesario la presencia de esta bacteria en poblaciones por encima de 10⁶ UFC/mL para obtener un efecto considerable en la inhibición de *Escherichia coli* ATCC 25922™. Siendo así que la inoculación de 10⁹ UFC/mL de *Lactobacillus casei* ATCC 393™, permitió la reducción poblacional de *Escherichia coli* ATCC 25922™ presente en el producto hasta valores permitidos por la NTS N° 071 DIGESA/MINSA, mostrando un efecto de tipo bactericida. [3]

2. Materiales y método.

Los análisis y resultados de la presente investigación se realizaron en el laboratorio de investigación de microbiología molecular y biotecnología de la facultad de medicina humana de la universidad privada Antenor Orrego, pabellón J, 4to. Piso, en Trujillo, Perú.

Para la elaboración del queso mantecoso se utilizó leche entera cruda, del establo lechero "Las Pampas" del distrito de Simbal, provincia de Trujillo, departamento de la Libertad.

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, se tomó una muestra de 120 lts de leche entera cruda, lo que equivalió a la producción de 12 kg de queso mantecoso.

Elaboración de queso mantecoso

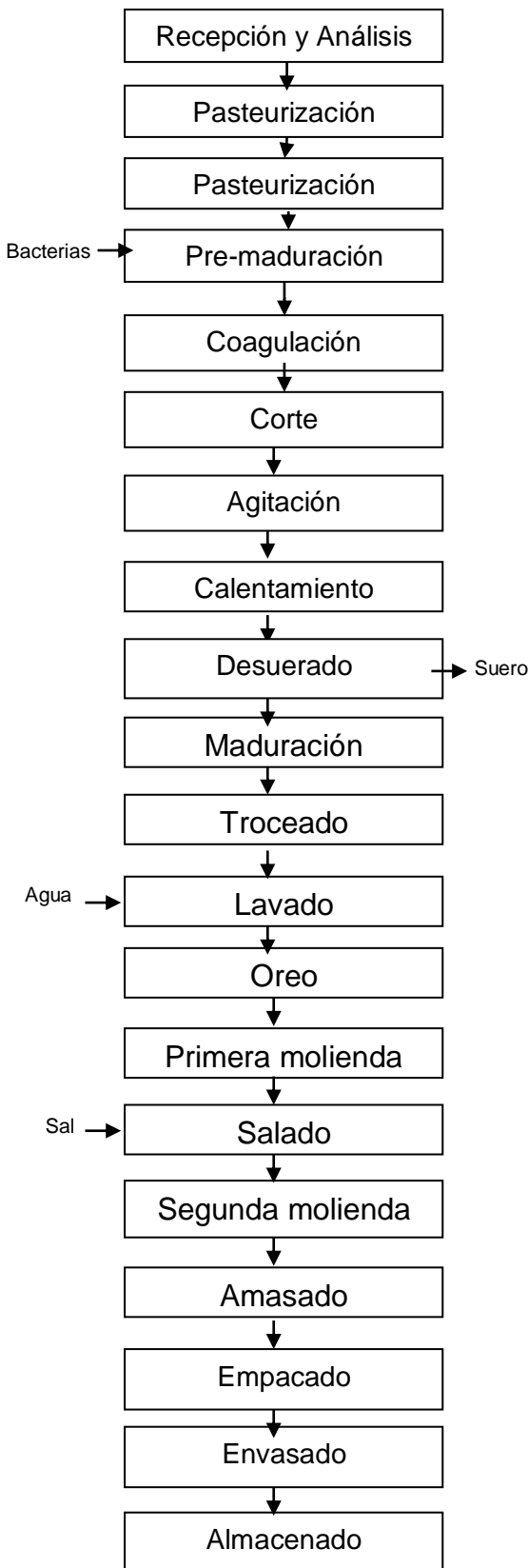


Figura 1. Flujograma de elaboración de queso mantecoso

Fuente: Sánchez, (2012). [4]

La cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922™ se activó previamente a la elaboración del queso mantecoso y se realizó a partir de un cepario almacenado en congelación a -24 °C.

Lactobacillus casei var *Rhamnosus*, se aisló y activó a partir del cultivo liofilizado Bacilor, del laboratorio Lyocentre – Francia

Inoculación de cepas experimentales en el Queso mantecoso.

La inoculación de las cepas experimentales se realizó durante el proceso de amasado del queso mantecoso, donde se inoculó 1 mL de (*E coli* y *L. Rhamnosus*) por cada 100 g. de masa, lo cual se realizó en una cabina de bioseguridad clase II, tipo A2, de marca Labconco.

Posterior a la inoculación de bacterias, las muestras de queso mantecoso experimental y control se mantuvieron almacenadas en refrigeración a una temperatura de 8 ± 2 °C durante 15 días.

El periodo de análisis fue de 15 días considerando el día de producción (día 0).

Se realizó un muestreo a diario, lo cual permitió su análisis correspondiente.

Recuento en placa de *Escherichia coli*. [3]

Se pesó 10 g de muestra de queso mantecoso, la cual permitió el recuento de Coliformes totales mediante la técnica de recuento en placa por siembra en profundidad en Agar Mac conkey.

Se colocó la muestra y 90 mL de diluyente (S.S.F.P) a un matraz de 250 mL se procedió a homogenizar por 8-10 minutos y se obtuvo la dilución 10-1, se siguió diluyendo hasta las diluciones necesarias.

Para la siembra se utilizó el método de siembra por incorporación, cada tubo de ensayo se llevó a agitación en un agitador tipo Vórtex Mixer de marca Labnet graduado a 1200 rpm, se inoculó 1 mL de cada dilución a las placas Petri, seguidamente se agregó 12-15 mL de Agar Mac conkey temperado a 42 °C (Dos placas Petri por dilución) se homogenizó con movimientos suaves de vaivén y rotación y se dejó solidificar.

Las placas Petri se incubaron en aerobiosis a 37 °C por 24 horas en una incubadora de dos puertas marca Memment.

Concluido el periodo de incubación se realizó la lectura con un contador de colonias tipo “Quebec”.

Se retuvieron las placas con un máximo de 300 colonias y un mínimo de 30 colonias y se realizó el recuento en UFC/g

Análisis estadístico

Se aplicó un diseño factorial A*B, con 64 tratamientos y 3 repeticiones, lo que hizo un total de 192 tratamientos a analizar.

Se aplicó un análisis de varianza factorial para evaluar las diferencias en los resultados, con un nivel de significancia del 5%.

Posteriormente se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para seleccionar el mejor tratamiento.

4. Resultados y discusión

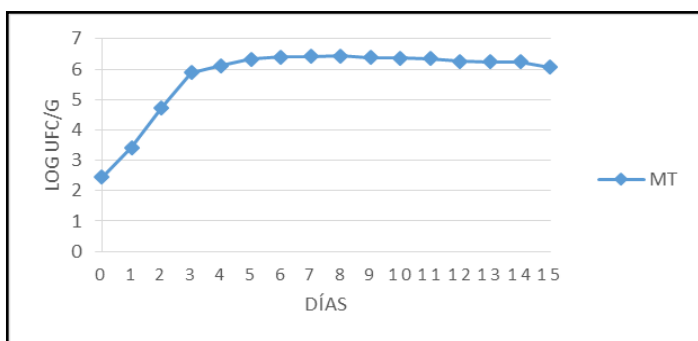


Figura 1: curva de crecimiento de *E. coli* inoculado en muestra testigo de queso mantecoso a temperatura 8 ± 2 °C, durante 15 días.

En la figura 1, se reporta una población inicial de 10^3 UFC/mL de *E. coli* que fue agregada en queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio a 8 ± 2 °C durante 15 días, para conocer con qué facilidad se reproduce dicha bacteria y tomarlo como patrón de referencia al momento de comparar los recuentos y tratamientos. *E. coli* alcanzó una población promedio final (día 15) de 1.16×10^6 UCF/g, aumentando aproximadamente hasta en 4 ciclos logarítmicos desde su población inicial (día 0) de 2.67×10^2 UFC/g. demostrándose que *E. coli* se reproduce con facilidad en el queso mantecoso, esto se debería a que el queso mantecoso es un excelente medio para el crecimiento de microorganismos indicadores de higiene, debido a su alto contenido en agua, pH óptimo y la gran variedad de nutrientes que éste posee, al respecto Durán *et al.* (2010). [5], realizaron ensayos en quesos de capa dando como resultado que estaban contaminados con *Escherichia coli*, un indicador de contaminación fecal, además evidenciaron una manipulación higiénica deficiente durante la elaboración del producto.

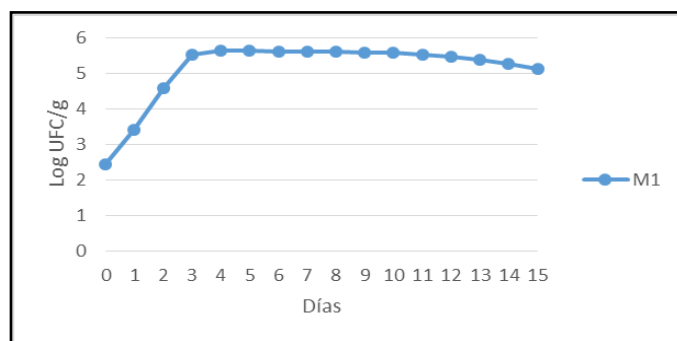


Figura 2: curva de crecimiento de *E. coli* inoculado en muestra 1, de queso mantecoso a temperatura 8 ± 2 °C, durante 15 días.

En la figura 2, se reporta el crecimiento de *E. coli* en la muestra 1 (M1), donde una población inicial 10^3 UFC/mL de *E. coli* fue agregada en el queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio a 8 ± 2 °C durante 15 días, a la cual en conjunto se le agregó una población de 10^3 UFC/mL de *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus*, donde *E. coli* alcanzó una población promedio final (día 15), de 1.38×10^5 UCF/g, aumentando aproximadamente hasta en 3 ciclos logarítmicos desde su población inicial (día 0) de 2.67×10^2 UFC/g. Al realizar el análisis estadístico por intermedio de las comparaciones múltiples HSD de Tukey entre la muestra testigo (MT) y la muestra 1 (M1) estadísticamente no se encontró diferencia significativa (significancia=0.259; $P > 0.05$), no demostrándose ningún efecto inhibitorio considerable. Esto se debería a la baja población de *Lactobacillus casei* var *rhamnosus* agregada y baja producción y acumulación de ácidos grasos así como bacteriocinas producidas por *Lactobacillus casei* var, *rhamnosus* en función del tiempo.

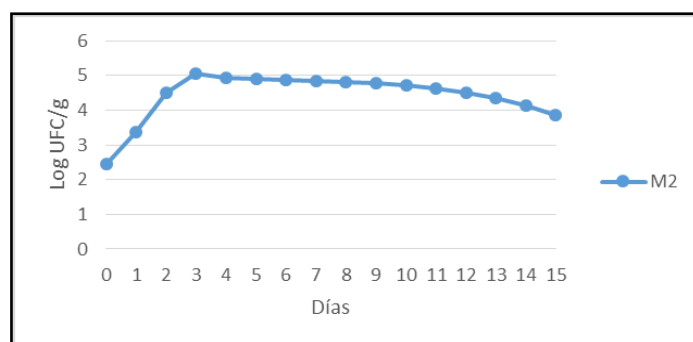


Figura 3: curva de crecimiento de *E. coli* inoculado en muestra 2 de queso mantecoso a temperatura 8 ± 2 °C, durante 15 días.

La figura 3, reporta el crecimiento de *E. coli* en la muestra 2 (M2) donde una población inicial 10^3

UFC/mL de *E. coli* fue agregada en queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio a 8 ± 2 °C durante 15 días, a la cual en conjunto se le agregó una población de 10^6 UFC/mL de *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus*, en donde *E. coli* alcanzó una población promedio final (día 15) de 7.1×10^3 UCF/g, aumentando aproximadamente hasta en 1.4 ciclos logarítmicos desde su población inicial (día 0) de 2.73×10^2 UFC/g. Al realizar el análisis estadístico por intermedio de las comparaciones múltiples HSD de Tukey entre la muestra testigo (MT) y la muestra 1 (M2) estadísticamente si se encontró diferencia significativa (significancia=0.001; $P < 0.05$), obteniéndose un efecto bacteriostático leve. Esto se debería a que la población agregada de *Lactobacillus casei* var *rhamnosus* fue duplicada y agregada al queso mantecoso, dando como resultado un aumento en la producción y acumulación de ácidos grasos y bacteriocinas producida por dicha bacteria en función del tiempo.

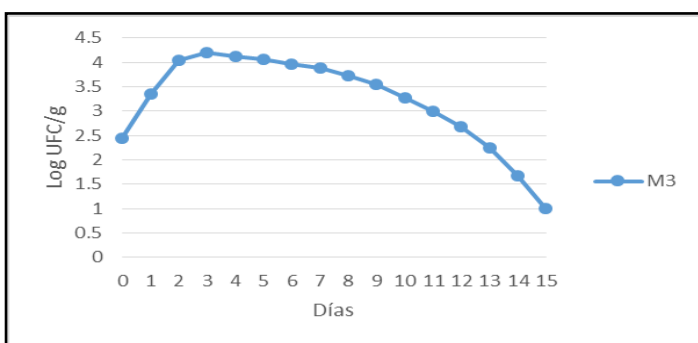


Figura 4: curva de crecimiento de *E. coli* inoculado en muestra 3 de queso mantecoso a temperatura 8 ± 2 °C, durante 15 días.

En la figura 4, Se reporta el crecimiento de *E. coli* en la muestra 3 (M3) en la cual una población inicial 10^3 UFC/mL de *E. coli* fue agregada en queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio a 8 ± 2 °C durante 15 días, a la cual en conjunto se le agregó una población de 10^9 UFC/mL de *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus*, donde *E. coli* alcanzó una población promedio final (día 15) de 10 UCF/g, disminuyendo hasta en 1.4 ciclos logarítmicos desde su población inicial (día 0) de 2.73×10^2 UFC/g. Al realizar el análisis estadístico por intermedio de las comparaciones múltiples HSD de Tukey entre la muestra testigo (MT) y la muestra 3 (M3) estadísticamente se encontró la mayor diferencia significativa (significancia=0.000; $P < 0.05$), demostrándose así un efecto bactericida considerable. Esto se debería a que la población inicial agregada de *Lactobacillus casei* var *rhamnosus* fue triplicada y agregada al queso mantecoso, superando en crecimiento a *E. coli* en

función del tiempo, produciendo y acumulando ácidos grasos y bacteriocinas.

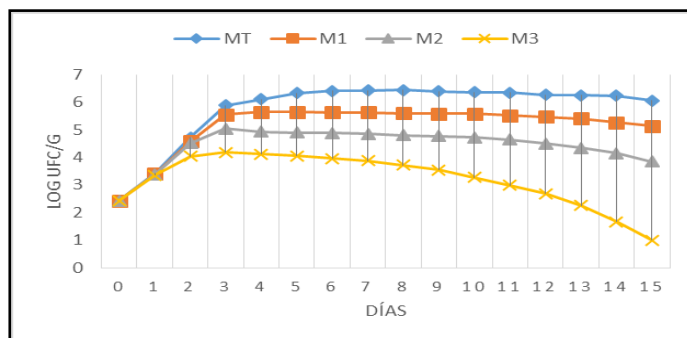


Figura 1: curvas de crecimiento de *E. coli* inoculado en MT, M1, M2 y M3 de queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio y almacenado a 8 ± 2 °C, durante 15 días de análisis.

Tal como se reporta en la figura 5, donde se muestran las curvas de crecimiento de la población inicial de 10^3 UFC/ml de *E. coli* que fue agregada en queso mantecoso a la cual se le agregaron poblaciones iniciales de 10^3 , 10^6 y 10^9 UFC/mL de *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* respectivamente, donde *E. coli* alcanzó una población máxima (día 15) de 1.16×10^6 UCF/g, aumentando aproximadamente 4 ciclos logarítmicos desde su población inicial (día 0) de 2.73×10^2 UFC/g, y una población mínima (día 15) de 10 UCF/g, reduciendo hasta 1.4 ciclos logarítmicos desde su población inicial de 2.73×10^2 UFC/g. demostrándose que a mayor poblaciones de *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* mayor era el efecto bactericida sobre *E. coli*.

5. Conclusiones

- Por intermedio del método de recuento de supervivencia bacteriana en placa se determinó que *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* causa efecto bactericida sobre *Escherichia coli* presente en queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio almacenado a una temperatura de 8 ± 2 °C.
- Mediante el test HSD de Tukey ($\alpha=0,05$), se demostró que el mejor tratamiento se dio en la muestra 3, donde se inoculó al queso mantecoso una población de 10^9 UFC/mL de *Lactobacillus casei* var *rhamnosus* sobre otra población de 10^3 UFC/mL de *E. coli* ATCC 25922™, con un límite de confianza al 95%.
- Se determinó que en el queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio almacenado a 8 ± 2 °C, es necesario la

presencia de *Lactobacillus casei* var. *ramnosus* en poblaciones de 10^9 UFC/mL o más, para obtener un efecto bactericida sobre una población de 10^3 UFC/mL de *Escherichia coli* ATCC 25922, en la cual *Lactobacillus casei* var. *ramnosus* redujo a *Escherichia coli* en promedio hasta 10 UFC/mL.

- El uso de *Lactobacillus casei* var. *ramnosus* en poblaciones iguales o mayores a 10^9 UFC/mL puede utilizarse en métodos de biopreservación alimentaria, reduciendo el uso de conservantes sintéticos dado su efecto bactericida sobre *E. coli* que fue comprobado en este trabajo de investigación.

Agradecimientos

A mi asesora MSc. Ing. León Marrou, María Elena, directora de escuela de Ingeniería agroindustrial y comercio exterior de la universidad César Vallejo, Trujillo, Perú. Por su confianza, apoyo y tiempo brindado en el presente trabajo de investigación

Al Dr. Blgo. González Cabeza, José Guillermo, profesor de la facultad de medicina humana de la universidad privada Antenor Orrego por permitirme aprender más de lo que exigió la investigación, por ser maestro, guía y amigo. Así como permitirme el acceso para los análisis respectivos y disponibilidad de materiales del "Laboratorio de investigación de Microbiología Molecular y Biotecnología" de la Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo, Perú

Al Mblgo. Ávila Vereau Elio, profesor de la facultad de medicina humana de la universidad privada Antenor Orrego, por su asería para resolver algunos problemas que se presentaron en la investigación, me brindó su apoyo incondicional dada su experiencia en el tema, me brindo su confianza y se convirtió en un buen amigo.

A la universidad César Vallejo por la disponibilidad del laboratorio de procesos industriales para la

elaboración del queso mantecoso en la facultad de ingeniería, pabellón E, 1er piso, en Trujillo, Perú.

Referencias

- [1] ACEVEDO, Iría. GARCÍA, Oscar y VARGAS, Daniela. 2013. Evaluación de la Calidad Bacteriológica por Método Rida Counten Quesos Tipo Mozzarella de Búfala Artesanal. Revista del Colegio de médicos veterinarios del Estado Lara, Venezuela. vol. 6, no. 2. ISSN: 2244 – 7733
- [2] María Liliana Roldan, *et al* (2011). Efecto inhibitor de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157:H7. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Venezuela. vol. 31, no. 1. ISSN 1315-2556
- [3] ALVAREZ Yanamango, Erick (2011). Efectos del *Lactobacillus casei* ATCC 393TM sobre el *Escherichia coli* durante la vida comercial del queso fresco. Trabajo de titulación (Ingeniero de Alimentos). Lima, Perú: Universidad Nacional del Callao. 153p.
- [4] SÁNCHEZ González, Jesús (2012). Predicción de la vida de anaquel de queso mantecoso de Cajamarca por efecto de la temperatura de almacenamiento refrigerado y tiempo de maduración usando redes neuronales. Tesis para optar el grado de maestro en ciencias. Escuela de postgrado. Universidad Nacional de Trujillo-Perú
- [5] DURÁN Lengua, Marlene (2010). Evaluación higiénico-sanitaria y acción antagónica de cepas de lactobacilos comerciales frente a microorganismos patógenos (*Escherichia coli*) presentes en el queso de capa del municipio de mompox. Revista científica (Maracaibo). Venezuela. Vol 20, no. 3. ISSN 0798 – 2259