

**EFFECTO DEL *Lactobacillus acidophilus* SOBRE CALIDAD
MICROBIOLOGICA DEL QUESO FRESCO, PROVINCIA DE MANABÍ,
ECUADOR.**

(Effect of *Lactobacillus acidophilus* on the microbiological quality of fresh
cheese, province of manabi, Ecuador)

**Jhonny Navarrete Alava¹, Patricio Noles Aguilar², Piero Fajardo Navarrete²
Nancy Hernandez Pulgar³**

Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "Manuel Félix López"
(ESPAM FML), Área agroindustrial, Manabí, Ecuador.
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela

jnav_57@hotmail.com

RESUMEN

En la actualidad se encuentra en auge la utilización de probióticos, con la finalidad de mejorar la calidad nutricional y a la vez mejorar la salud. Son diversos los microorganismos que han sido probados con esta finalidad de crear alimentos funcionales, sin embargo, *L. acidiphylus* ha sido uno de los microorganismos más usados como probióticos en las últimas décadas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de inhibición de bacterias patógenas como *E.coli* y *S. aureus* en presencia de *L. acidophylus* en queso fresco. En cuanto a los métodos utilizados, se realizó la inoculación de *L. acidophylus* a tres concentraciones 1,35 g (A); 2,35 g (B) y 3,35 g (C) respectivamente, posterior a la inoculación, se evaluó el porcentaje de presencia de microorganismos a los 10, 20 y 30 días, permaneciendo el producto a temperaturas controladas de refrigeración (4°C); una vez transcurridos los tiempos, se evaluó la cantidad de microorganismos presentes a través de conteo indirecto, determinando la cantidad de UFC. Se obtuvo como resultado que *L. acidophylus* tiene un efecto inhibitor de microorganismos patógenos como *E. coli* y *S. aureus* en queso fresco, se observó que a medida que aumentan los días de inoculación, el crecimiento de organismos patógenos disminuye. Por lo tanto, se comprueba el efecto antimicrobiano de los probióticos, lo cual podría ser utilizado como una alternativa para la producción de quesos, en comparación con los productos lácteos fermentados.

Palabras clave: probiótico, *E.coli*, *S. aureus*.

ABSTRACT

The use of probiotics is currently booming, with the aim of improving nutritional quality and at the same time improving health. There are several microorganisms that have been tested with this purpose to create functional foods; however, *L. acidiphylus* has been one of the microorganisms most commonly used as probiotics in recent decades. The objective of the present work was to evaluate the inhibitory capacity of pathogenic bacteria such as *E. coli* and *S. aureus* in the presence of *L. acidophylus* in fresh cheese. As for the methods used, the inoculation of *L. acidophylus* was carried out at three concentrations 1.35 g (A); 2.35 g (B) and 3.35 g (C) respectively, after inoculation, the percentage of presence of microorganisms at 10, 20 and 30 days was evaluated, the product remaining at controlled temperatures of refrigeration (4°C). Once the times had elapsed, the amount of microorganisms present through indirect counting was evaluated, determining the amount of CFU. It was obtained as a result that *L. acidophylus* has an inhibitory effect of pathogenic microorganisms such as *E. coli* and *S. aureus* in fresh cheese, observing that as the days of inoculation increase, the growth of pathogenic organisms decreases; Therefore the antimicrobial effect of probiotics is proven which could be used as an alternative for the production of cheeses, in comparison with fermented dairy products.

Key words: probiotic, *E.coli*, *S. aureus*.

INTRODUCCION

El término probiótico significa “para o por la vida” y es utilizado en la actualidad para hacer referencia a las bacterias asociadas a efectos beneficiosos para los humanos y los animales (Iniesta *et al.*, 2011). El uso de probióticos no es nuevo ya que se consumen desde la antigüedad, incluso hace más de un siglo científicos como Pasteur y Metchnikoff observaron el potencial benéfico de algunas bacterias por su antagonismo con agentes infecciosos (Guarner, 2000).

En la Unión Europea aún no existe una legislación armonizada al respecto, solo refleja con claridad la prohibición de incluir en las etiquetas cualquiera referencia a propiedades preventivas terapéuticas o curativas. Existen, no obstante, en diferentes estados miembros de la UE, directrices sobre las alegaciones de la salud de los alimentos funcionales. En los estados Unidos la FDA permite desde 1993 hacer referencia a las alegaciones de salud, siempre que existan evidencias científicas públicamente disponibles, pero es Japón quien tiene una legislación más desarrollada en 1991 se estableció el concepto de alimentos para uso específico en la Salud. Los alimentos incluidos en esta categoría deben estar avalados por ensayos científicos contrastados que demuestren las propiedades beneficiosas para la salud cuando son consumidos en la dieta habitual.

Para ser consideradas como probióticos las bacterias deben de reunir algunas características como: ser habitante normal del intestino humano, no patógena, no toxigénica, capaz de sobrevivir y metabolizar en el ambiente intestinal y tener la capacidad de ejercer un efecto benéfico en el huésped; siendo *Lactobacillus acidophilus* uno de los microorganismos más usados como probióticos en las últimas décadas (Torres, 1999). Los productos probióticos deben contener una concentración $\geq 10^6$ ufc/ ml de microorganismos que se implanten en el intestino para ser considerado como tal y deben ser consumidos regularmente. Los microorganismos probióticos que se emplean en los productos lácteos son utilizados fundamentalmente en la elaboración de leches fermentadas. Estos productos se consumen normalmente en un plazo

breve de tiempo tras su producción. Un producto lácteo funcional alternativo, con un periodo de consumo potencialmente más largo, sería el queso probiótico. En la última década se ha desarrollado una gran variedad de nuevos productos con probióticos, la cual incluye productos lácteos fermentados: yogurt, queso, helado (Reid *et al.*, 2003).

Prácticamente todos los trabajos de queso funcionales probióticos se han hecho en variedades de queso de producción industrial (Cheddar, Cottage, Gouda, Ras, etc.). En la elaboración de dichos quesos se han utilizado distintas cepas probióticas, que pertenecen a las especies *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *B. longum*, *B. lactis*

Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral (UNL) y el CONICET estudian una forma de regular la actividad de los microorganismos contaminantes agregando de manera controlada aquellos que pueden mejorar el aroma y el sabor de los quesos.

Sorprendentemente, no existe referencia sobre ensayos similares realizados en quesos artesanales, los cuales son especialmente apreciados por los consumidores por la singularidad de sus características organolépticas, reflejo de la variedad de tradiciones y métodos de elaboración. La producción de estos quesos se restringe a aéreas geográficas muy localizadas, a las que a menudo deben su nombre, y se lleva a cabo en pequeñas queserías frecuentemente familiares.

Las cepas de bacterias *Lactobacillus acidophilus* forman ácido láctico, lo que modifica favorablemente el medio intestinal, inhibiendo flora potencialmente patogénica y fermentaciones anómalas (Rodríguez-Cervantes *et al.*, 2008). En los últimos años, se ha sugerido que los quesos son un medio más adecuado para contener probióticos en comparación con los productos lácteos fermentados; ya que presentan un pH mayor, y su matriz sólida compacta junto con las condiciones de almacenamiento, permiten la supervivencia de organismos durante el almacenamiento (Hernández *et al.*, 2004).

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el efecto del *Lactobacilos acidophilus* sobre calidad microbiológica del queso fresco en la provincia de Manabí.

Objetivos Específicos

- ✚ Determinar el tratamiento óptimo del *Lactobacilos acidophilus* que inhiba el desarrollo de las bacterias patógenas en el queso fresco.
- ✚ Establecer la mezcla óptica del probiótico *Lactobacilos acidophilus* que no alteren las características organolépticas del queso fresco.
- ✚ Realizar una estimación económica de los tratamientos en estudio.

1.2. Hipótesis

La adición del *Lactobacillus acidophilus* en la mayor de sus dosis inhibe el desarrollo de las bacterias patógenas y prolonga la vida útil del queso fresco.

1.3. Justificación

La principal causa del deterioro de los alimentos es provocada por la presencia de diferentes tipos de microorganismos (bacterias, levaduras y mohos). El deterioro microbiano provoca pérdidas económicas sustanciales tanto para los fabricantes (pérdida de materia prima y productos elaborados antes de su comercialización, deterioro de la marca); como para distribuidores y consumidores (deterioro del producto después de su adquisición y antes de su consumo). Se calcula que más del 20 % de todos los alimentos producidos en el mundo se pierden por acción de microorganismos. La clave para el control microbiológico tanto de la inocuidad como de la alteración de los alimentos reside en el conocimiento y en la aplicación de los principios de la ecología microbiana, (relación entre los microbios y su medio). Que da como resultado su crecimiento, su supervivencia y su muerte. Sin embargo, los microbios reaccionan a las influencias, tanto abióticas como bióticas, más rápidamente

que las formas superiores de vida. Los microbios son especialmente interactivos con su hábitat porque su tamaño insignificante hace que la relación entre su superficie y su masa sea elevada. A pesar de ello, algunos microbios han desarrollado unas impresionantes resistencias a las influencias abióticas. Y, por ejemplo, se sabe que son capaces no solo a sobrevivir, sino también de multiplicarse en unas condiciones de presión osmótica elevada, de temperatura elevada y baja, de valores de pH y presión de oxígeno extremos, situaciones todas ellas inhóspitas para la mayoría de las formas superiores de vida. Mossel, D.A., *et al* (2003).

Las enfermedades microbianas que se transmiten por medio de los alimentos se suele dividir en dos clases principales. La primera comprende las enfermedades que son consecuencia de la presencia en los alimentos de microorganismos infectivos por ingestión. La segunda clase de enfermedades transmitidas por alimentos es consecuencia de la absorción intestinal de toxinas que ya estaban presentes en los alimentos antes de su ingestión.

Existen razones suficientes para evitar la alteración de los alimentos. Al método físico como calentamiento, deshidratación, irradiación o congelación, pueden asociarse métodos químicos que causen la muerte de microorganismos o que al menos evitan su crecimiento, estos existen en algunos alimentos en forma natural con actividad antimicrobiana disminuyendo el sabor amargo, mejorando su aroma y en el mejor de los casos que tenga potencial como probiótico (Caballero y Lengomín, 1998)

MATERIALES Y METODOS

Tratamiento de la leche

La leche se recolectó en la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Área agroindustrial, la cantidad que se utilizó fue 24 litros para el ensayo. Se le realizó las pruebas de alcohol, acidez, y densidad resultados que nos indica la calidad de la leche, cuyos rangos están establecidos por las normas INEN 0009:09 requisitos para leche cruda.

Para iniciar el tratamiento de la leche, se procedió a pasteurizarla incrementando su temperatura a 65°C por 30 minutos, y luego se bajó la temperatura a 40°C provocando así la eliminación de microorganismos patógenos. Posteriormente se adicionó 0,2 g de cuajo por cada 9 litros de leche a 40°C (previamente diluidos en una proporción de 250 ml de agua hervida) y se adicionó las cantidades de probiótico (*Lactobacillus acidophilus*) en concentraciones de 1,35 g (A); 2,35 g (B) y 3,35 g (C) respectivamente en el momento del cuajado a 40°C esperando su desarrollo durante los 40 minutos posteriores al cuajado.

Pasado los 40 minutos de cuajado se procedió al corte de la misma en forma vertical y horizontal con una lira, tomando en cuenta que los gránulos de la cuajada deberán quedar de 1 cm³ cada uno.

Parámetros microbiológicos

El porcentaje de presencia de microorganismos patógenos fue registrado a los 10, 20, 30, días después de haber aplicado el probiótico mediante análisis microbiológicos permaneciendo el producto a temperaturas controladas de refrigeración (4°C).

Para el análisis microbiológico se tomaron muestras de queso de 50g de cada una de las unidades de experimentación y se sembraron en medios de cultivos que nos indicara la presencia de organismos patógenos y determinara la condición del queso fresco.

Los medios de cultivos utilizados fueron: para *Escherichia coli*, Agar Mac-Conkey, para *Staphylococcus aureus* se utilizó agar Manitol y para *L. acidophilus* se utilizó agar MRS. Los reactivos empleados para coliformes fue suero fisiológico estéril (0,9% NaCl), para *Staphylococco*+agua destilada y para bacterias lácticas agua de peptona al 0,1%.

Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar, con tres tratamientos (A: 14,67 UFC, B: 13,37 UFC y C: 12,29 UFC) y tres repeticiones. Los valores fueron transformados a logaritmo neperiano (Ln). En el que se analizó la inhibición de microorganismos patógenos por los *lactobacillus sp.* Utilizándose un ANOVA de una vía para determinar si existen diferencia entre los grupos y para la comparación de medias se aplicó la prueba *Post hoc* de Tukey al 0,05 de probabilidad. Los datos fueron procesados con la ayuda del paquete estadístico STATISTICA v6.0 (STATISTICA, 2018).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza para *E. coli* arrojó diferencias significativas a los diez días siendo los resultados para los tratamientos A: 14,67 UFC, B: 13,37 UFC y C: 12,29 UFC respectivamente. Para la segunda toma de muestra a los 20 días no se determinó una variación significativa entre los factores, a excepción del testigo, quien arrojó un resultado de 13,62 UFC de *E. coli*. En la toma de datos a los 30 días, no hubo diferencia alguna, ya que tanto en el testigo como en los tratamientos las bacterias estaban totalmente ausentes (Figura 1).

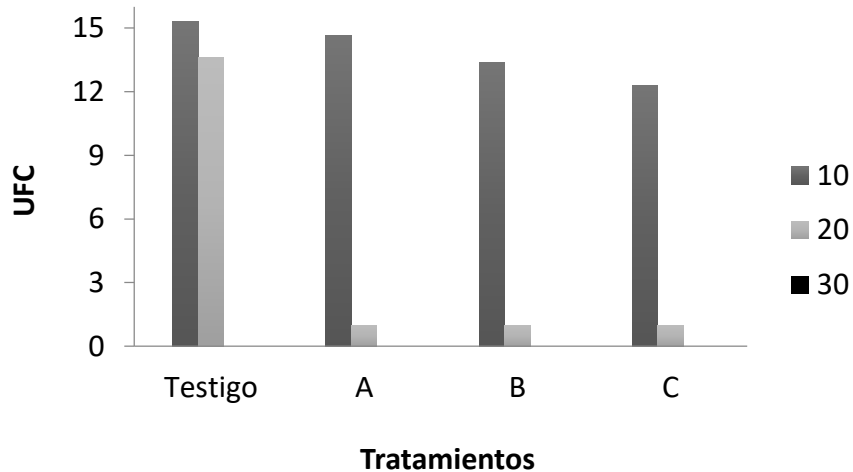


Figura 1. Evolución de UFC de *E. coli* en presencia de *L. acidophilus*, en queso fresco almacenado durante 10, 20 y 30 días a 4 °C.

La presencia del probiótico inhibió el desarrollo de *E. coli* en los tratamientos a los 10, 20 y completamente a los 30 días; esto se debe a la producción de ácido láctico y por consiguiente la disminución del pH, ya que los coliformes necesitan un pH entre 6 y 7 para sobrevivir; comprobándose así el efecto inhibitorio de *L. acidophilus* (Longoria *et al.*, 1983; Vallejo *et al.*, 2009).

Senne y Gilliland (2003) sugieren que la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimenticia, ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos puros que podrían reemplazar a los químicos.

Para *S. aureus* se observó una diferencia estadísticamente significativa de UFC a los diez días para los factores A, B y C, siendo los valores de 11,84, 11,61 y 10,90 respectivamente. Los datos obtenidos para la segunda toma de datos, correspondiente al día 20 no mostró diferencia significativa siendo los valores de los tres factores iguales (2.30 UFC), y para el día 30 tanto testigo como los tratamientos no hubo presencia de bacterias (Figura 2).

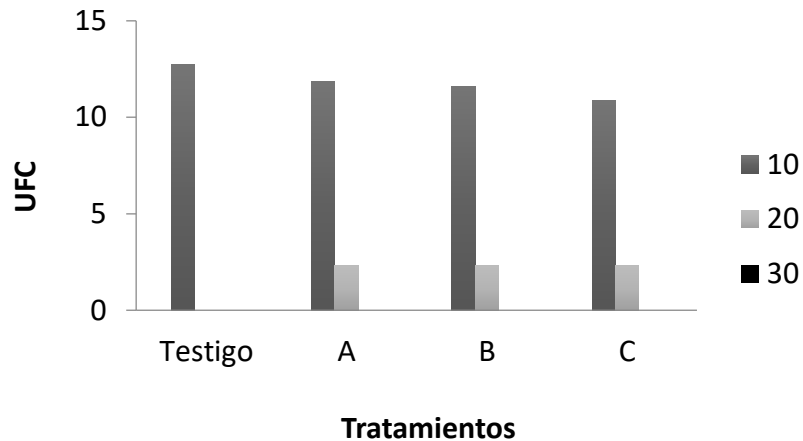


Figura 2. Evolución de UFC de *S. aureus* en presencia de *L. acidophilus* en queso fresco almacenado en el tiempo de 10 a 30 días a 4 °C.

Estos resultados coinciden con Fernández *et al.* (2014) quienes en dentro de sus resultados arrojan un 45% de coincidencia para estudios que evaluaron la presencia de *S. aureus* en alimentos lácteos, carnes y panadería; siendo esta bacteria la tercera causa más común de intoxicación alimentaria confirmada en el mundo. Por su parte, la FAO (2002) reporta que este microorganismo es de gran preocupación en la industria alimentaria debido a su versatilidad metabólica y la gama de condiciones ambientales (temperatura, pH junto con actividad acuosa) en la que puede crecer y producir enterotoxinas.

Por su parte *L. acidophilus* no mostró una diferencia significativa entre los factores, así como entre los días; lo que indica que se mantuvo presente en los tres tiempos establecidos para la toma de muestras. Por lo tanto la adición de probiótico estimuló el crecimiento de *L. acidophilus* y prolongó su permanencia en el producto.

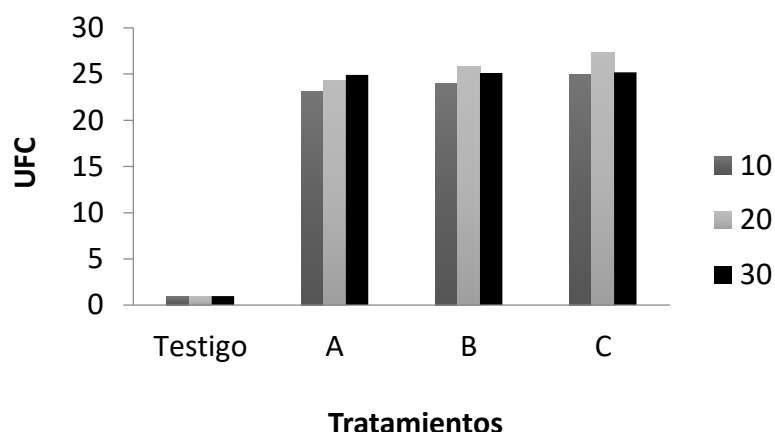


Figura 3. Evolución de UFC de *L. acidophilus* en queso fresco almacenado de 10 a 30 días a 4 °C.

Fernández *et al.*, (2014) afirman que las bacteriocinas son los metabolitos más estudiados para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos en matrices alimentarias; y que estas podrían incluso reducir las enfermedades transmitidas por alimentos. También se le han atribuido propiedades benéficas para la salud, ya que mejoran el tracto gastrointestinal de los seres humanos, evitando el desarrollo de microorganismos patógenos capaces de producir enfermedades, por la estimulación del sistema inmunológico y por consiguiente, la producción de anticuerpos (Del Campo *et al*, 2008).

La diferencia está a los 30 días ya que tanto el testigo como el queso con el tratamiento inhibe el crecimiento de la *E. coli*, esto se debe a q la temperatura de refrigeración por mucho tiempo 4⁰C a que fueron expuesta las muestra inhiben el desarrollo de estas bacterias por ser mesófilas, lo que si cambio en el testigo es la textura, el olor y el sabor, diferente al queso con lactobacilos que no sufrió modificación alguna.

CONCLUSION

A través de la presente investigación se concluye que este bioprotector, como lo es el *L. acidophilus* aplicado en tres concentraciones y evaluado en tres lapsos de tiempo, tiene un efecto inhibitor de microorganismos patógenos como *E. coli* y *S. aureus* en queso fresco. También se determinó que a medida que aumentan los días de inoculación, el crecimiento de organismos patógenos disminuye; Por tanto los probiótico podrían ser utilizados como una estrategia técnica de producción de queso. Por lo que concluimos diciendo que *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, fueron inhibidas con la aplicación de *Lactobacillus acidophilus* sin sufrir modificación alguna en el queso fresco.

BIBLIOGRAFÍA

- Caballero Torres A; Lengomín Fernández M E. (1998). Causas más frecuentes de problemas sanitarios en alimentos. *Rev Cubana Alimentación y Nutrición*, 12(10), 20-22.
- Castro-Longoria, R., J.M. Grijalva-Chon, R. B.-G., & Aguirre-Rosas, J. (1991). *Descripción de los principales rasgos estructurales de la comunidad ictiológica y zooplanctónica del Estero El Sargento, Sonora*. Sonora: DIGCSA/SEP-UNISON .
- Del Campo, C., Gómez, H., & Analíz, R. (2008). Bacterias Ácido Lácticas con capacidad antagonica y actividad bacteriocinogènica aisladas de quesos frescos. *E-Gnosis*, 6(0), 1-17.
- FAO (Food and Agriculture Organization). (2002). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. Retrieved junio 18, 2018, from http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
- Fernández, KJ; Chanci, IC; Wilches, L; Cardona, JA. (2014). CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y EFECTO INHIBIDOR DE LAS BACTERIOCINAS EN MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN ALIMENTOS: REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA LITERATURA, 2008-2012. *Revista Biosalud*, 13(1), 45-61.
- Guarner, F. (2000). Probioticos y flora bacteriana. Yogurt vivo. Alimento fresco y activo. 5(10).
- Hernández-Ledesma, B; Amigo, L; Ramos, M; Recio, I. (2004). Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity in Commercial Fermented Products. Formation of Peptides under Simulated Gastrointestinal Digestion. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 6(52), 1504-1510.
- M, I., Zurbriggen, M., Montero, E., & Herrera, D. (2011). Los probióticos y sus beneficios terapéuticos. *Periodoncia y Osteointegración*. 21(3), 171-179.
- Mossel DAA; Moreno B; Struijk CB. (2003). *Microbiología de los alimentos, Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (inocuidad y calidad) microbiológica de los alimentos* (2da ed.). Zaragoza, España: Acribia S.A.
- Reid, G., Jass, J., Sebulsy, M. T., & McCormick, J. K. (2003). Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(4), 658-672.
- Rodríguez-Cervantes, I.; Saldaña-Valerio, E; García-Almendárez, B; RegaladoGonzález. (2012). *Sobrevivencia de dos bacterias probióticas en dos quesos frescos mexicanos deslactosados*. México, Oaxaca, México: Asociación Mexicana de Ciencia de los Alimentos.
- Senne, M; Gilliland, S. (2003). Antagonistic action of cells of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* against pathogenic and spoilage microorganisms in fresh meat systems. *Journal of Food Protection*, 66(3), 418-425.
- STATISTICA. (2018). *Características de STATISTICA*. Retrieved 31 octubre, 2018, from <http://www.statsoft.com/Products/STATISTICA-Features>
- Torres, R. (1999). *Flora intestinal, probióticos y salud*. Guadalajara: Edit Gráfica Nueva.
- Vallejo, M; Etchehoury, V; Horiszny, C; Marguet, E. (2009). Inhibición de *Escherichia coli* O157: H7 por cepas *Lactobacillus* aisladas de queso ovino. *Analacta Veterinaria*, 29(1), 15-19.