

EVALUACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES NATURALES EN LA INHIBICIÓN DE BACTERIAS DEL GÉNERO *LEUCONOSTOC*

Mónica Serra¹, Micaela Sanmartino¹, Micaela Pairone¹, Susana Garnero¹, Jorge Garnero¹,
Alfonsina E. Andreatta^{1,2}

¹Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional San Francisco. Av. de la Universidad 501.
2400. San Francisco. Córdoba. Argentina.

²IPQA - Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos y Química Aplicada-
CONICET- FCEFyN- Universidad Nacional de Córdoba. Av. Vélez Sarsfield 1611, Ciudad
Universitaria, X5016GCA Córdoba, Argentina

Resumen

El presente estudio, se focaliza en la inhibición de bacterias alterante de los alimentos que se encuentran como flora contaminante en salchichas tipo Viena y cuyo crecimiento se manifiesta en el producto envasado al vacío a partir de dos a tres semanas de almacenamiento bajo refrigeración provocando hinchazón de los envases. Investigaciones previas sugieren que esta alteración es producida por bacterias del género *Leuconostoc* que crecen en condiciones anaerobias con formación de gas. Se aislaron bacterias del género *Leuconostoc* de la superficie de salchichas tipo Viena envasadas al vacío y se procedió a la observación de la morfología celular al microscopio, tinción de Gram, siembra en diferentes medios de cultivo e incubación a diferentes temperaturas, formación de gas, formación de dextrano y tipificación genética de la cepa que confirmaron el género *Leuconostoc*. A su vez, con el objetivo de encontrar inhibidores/bactericidas de origen natural de la bacteria en estudio, se han obtenido diferentes extractos naturales a través de la técnica de hidrodestilación a partir de hojas de tomillo, laurel, eucalipto, cedrón, menta, diente de león y perejil; frutos de pimentón y ajo; flores y frutos de clavo de olor y cáscaras de limón y pomelo. Posteriormente, con cada uno de los extractos obtenidos, se procedió a realizar ensayos de sensibilidad microbiana para conocer el efecto inhibidor o bactericida sobre a esta bacteria.

1. Introducción

El interés de evitar el crecimiento de bacterias heterofermentativas del género *Leuconostoc* principalmente *L. mesenteroides* ssp., y sus efectos no deseables sobre productos cárnicos, plantea diferentes métodos para inhibir su crecimiento: utilización de microorganismos bactericidas, utilización de aditivos o el uso de procesos tecnológicos. En general, las especies del género *Leuconostoc* crecen rápidamente, debido a que su metabolismo es eficiente energéticamente, lo que influye de manera significativa en la caída de pH, producción de exudado lechoso y olor agrio. El crecimiento de estas bacterias está asociado con la aparición de ciertos compuestos volátiles tales como aldehídos y ácidos orgánicos (Diez et al., 2009).

Con respecto a la utilización de microorganismos bactericidas, se aislaron bacterias productoras de ácido láctico naturalmente presente en productos cárnicos envasados al vacío para analizar su poder bactericida. *L. carnosum* 4010, fue seleccionada como potencial bactericida por presentar fuerte actividad frente a *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos sin producir compuestos de sabor indeseables en los mismos (Budde et al., 2003). En este sentido, también se observó que la bacteria *Lactobacillus sakei* 10 A de metabolismo homofermentativo en alimentos cárnicos envasados al vacío inhibe el crecimiento de *L. mesenteroides*, *B. thermosphacta* y *L. monocytogenes* de metabolismos heterofermentativos (Vermeiren et al., 2006).

Con respecto al uso de aditivos, se ha observado que la adición de sales orgánicas da como resultado una vida útil más prolongada del producto (Diez et al., 2009). Otros autores han encontrado una inhibición de crecimiento bacteriano con lisozima, nisina y EDTA (Gill & Holley, 2000).

El uso de procesos tecnológicos como la aplicación de altas presiones y pasteurización, ha extendido la vida útil del producto cárnico, produciendo una disminución de la población de *L. mesenteroides* (Diez et al., 2009). El uso de extractos naturales también está siendo estudiado. En este sentido, el efecto del extracto de romero fue investigado en la inhibición de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y en *Pseudomonas* spp., en salchichas de cerdo frescas almacenadas a 4 °C (Georgantelis et al., 2007) resultando un posible uso comercial de este extracto en la preservación de estos productos sin el uso de nitritos u otros aditivos.

Por otra parte, fue investigada la inhibición de la bacteria *L. monocytogenes* sobre salchichas tipo bologna por un film antimicrobial que contiene extracto de mostaza o sinigrina (Lara-Lledó et al., 2012) y se ha estudiado la actividad antimicrobiana de extractos de la planta *Petiveria alliacea* L. en distintas condiciones experimentales (Sandra et al., 2013). También, un film de quitosano con el agregado de extracto de té verde fue utilizado como envase activo para extender la vida en anaquel de salchichas de cerdo (Siripatrawan & Noipha, 2012). A su vez, se encontró que el ácido jasmónico, obtenido en plantas por lipoxigenación del ácido linolénico, posee un efecto inhibitorio sobre las cepas de *L. mesenteroides* (Michelena et al. 2005). De todas estas investigaciones, se ha demostrado la prolongación de la vida útil de los productos estudiados.

En este trabajo, en particular, se propone encontrar extractos naturales con poder inhibitorio y bactericida frente a las bacterias del género *L. mesenteroides* presentes en salchichas tipo Viena envasadas al vacío, cuyo crecimiento se manifiesta en el envasado al vacío a partir de dos a tres semanas de almacenamiento bajo refrigeración provocando hinchazón de los envases.

2. Procedimiento

Para llevar a cabo este trabajo, fueron necesarias las siguientes etapas: obtención de extractos naturales, tipificación bioquímica y molecular de la bacteria en estudio, preparación de ensayos de sensibilidad a los extractos y determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM) y de la concentración bactericida mínima (CBM) a partir del método de macrodilución en caldo.

Todas las operaciones de inoculación y siembra se realizaron con materiales esterilizados en autoclave y bajo condiciones de asepsia, en una campana de bioseguridad (Telsar Clase II–A).

2.1. Obtención de extractos naturales

La Tabla 1 menciona los diferentes productos naturales renovables a partir de los cuales se obtuvieron los correspondientes extractos naturales. La extracción, se realizó mediante un equipo clásico de hidrodestilación constituido por un balón de fondo redondo de 500 mL, un manto calefactor con regulación de calentamiento y un condensador. La muestra a destilar se preparó mezclando 50 g de material vegetal triturado, con 250 mL de agua destilada. El método consistió en llevar a ebullición la suspensión acuosa del material por 120 min., condensando los vapores y colectándolos en una ampolla de decantación para poder a continuación, separar la fase de aceite esencial de la acuosa. La temperatura de extracción fue de 100 °C, la presión de operación de 1 atm (Andreatta et al., 2009). Los extractos se conservaron en viales y fueron cerrados herméticamente con tapa de goma y precinto de aluminio.

2.2. Tipificación bioquímica y molecular de la cepa

La bacteria con la que se trabajó pertenece al género y especie *L. mesenteroides*. Las bacterias de este género son cocos Gram (+), catalasa (-), glucosa tipo 4, forman pares y cadenas, anaerobias facultativas, heterofermentativas (producen etanol, dióxido de carbono, acetato, y lactato), poseen reacción negativa al crecimiento a 45 °C, disimilación negativa a la

arginina, no son móviles ni forman esporas. El medio selectivo utilizado para el cultivo de *L. mesenteroides* es Man Rogosa Sharpe (MRS), consiguiendo un óptimo desarrollo en estufa de cultivo a 30 °C y en un tiempo de 24 a 48 h. Todas estas características constituyen a la tipificación bioquímica de la bacteria.

Por su parte, la identificación por técnicas de biología molecular se realizó mediante la identificación de microorganismos por secuenciación de un fragmento del gen que codifica el 16S rRNA en el Instituto de Lactología Industrial de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina). A partir de los cultivos originales se sembró por estría una placa de agar MRS (37°C, 24 h) a los fines de obtener colonias aisladas y comprobar la pureza de los cultivos. Posteriormente, se realizó la observación microscópica de las muestras con contraste de fases (1000x). Se procedió a la realización de la reacción catalasa a partir de una colonia aislada, con agua oxigenada 10 vol. Se determinó la capacidad de producir gas a partir de glucosa (prueba de heterofermentación) sembrando la cepa en caldo MRS con campana de Durham invertida, incubando los cultivos a 34°C durante 48 h. Se observó la presencia de gas (o no) en el interior de la campanita. Posteriormente se extrajo ADN cromosómico utilizando el kit GeneElute™ Bacterial Genomic DNA (Sigma, St Louis, MO, USA) a partir de cultivos *overnight* en caldo MRS (34°C, 16 h) provenientes de una colonia aislada (agar MRS). La identidad de los microorganismos se determinó por amplificación y posterior análisis de un producto de 1500 bp perteneciente al gen 16S rDNA, utilizando primers universales (pA y pH; Edwards et al., 1989). La reacción de amplificación se realizó utilizando 5 µl de ADN como templado, 2,5 U de Taq polimerasa (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom), 200 nM de dNTPs (GE Healthcare) y 400 nM de cada primer (Sigma-Genosys, The Woodlands, TX USA) en 50 µl de volumen final, añadiendo un control negativo de reacción (sin ADN). La reacción de PCR se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) bajo las siguientes condiciones: 3 min a 94°C, 36 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 51°C y 2 min a 72°C, incluyendo un paso final de extensión de 7 min a 72°C. El producto de PCR fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5 % en buffer TBE, adicionado de GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) y se visualizó bajo luz UV (Sambrook & Russell, 2001). Los productos de amplificación obtenidos se purificaron, a partir de agarosa, utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) y su secuencia nucleotídica fue determinada por "primer extension" (dos reacciones de secuenciación para cada muestra, una con cada uno de los primers) en el Servicio de Secuenciación de MacroGen Inc. (Seúl, Corea). Los datos de secuencias (con ambos primers) fueron ensamblados y comparados utilizando el análisis de secuencia del software disponible en el nodo EMBL (CNB, CSIC, España). La identidad de la cepa fue determinada por similitud con las secuencias disponibles mediante la comparación del tipo "nucleotide-nucleotide BLAST" de la base de datos NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

2.3. Ensayos de sensibilidad

Se realizaron los ensayos de sensibilidad frente a los diferentes extractos naturales aquí analizados. Para ello, se utilizó el método de difusión en agar por medio de discos, donde el disco con una cantidad específica de antimicrobiano, es aplicado a una superficie de MRS agarizado de una caja de Petri inoculado previamente con *L. mesenteroides*. El inóculo se preparó siguiendo el método de suspensión directa de colonias en solución salina para obtener una densidad de 0,5 en la escala de Mc Farland; que se corresponde, aproximadamente, con una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Se aplicó el inóculo con un hisopo embebido en la solución estandarizada y se distribuyó uniformemente sobre el medio de cultivo agarizado. Los discos estériles, se corresponden a papel de filtro de 6 mm de diámetro los cuales fueron impregnados con 10 µL de cada extracto natural. Posteriormente, las cajas de Petri se incubaron a 30 °C por 48 h. El antimicrobiano difunde desde el disco al medio de cultivo produciendo una zona de inhibición.

Posteriormente, se tomó una muestra en los halos de inhibición, se sembró en placas de Petri con MRS sin antimicrobianos y se incubó a 30 °C por 48 h. Posteriormente se observó evidencia o no de crecimiento de *L. mesenteroides* en las muestras, determinando si las concentraciones de los extractos son bactericidas o inhibitorias.

2.4. Método de macrodilución en caldo

Para medir cuantitativamente la actividad *in vitro* del extracto natural que presentó actividad bactericida en las anteriores pruebas de sensibilidad frente a un cultivo de *L. mesenteroides*, se continuó con la utilización de la técnica de dilución en medio de cultivo. Este método consistió en la preparación de una serie de tubos con medio de cultivo, a los cuales se les agregó el extracto natural en distintas concentraciones. Luego se inoculó cada uno de los tubos con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinaron después de incubar a 30 °C por 24 – 48 h. A partir de estos resultados, se determinó la CIM y la CBM del extracto natural frente al microorganismo ensayado. CIM y CBM se definen como la mínima concentración de extracto natural, inhibitoria y bactericida respectivamente, que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir ó inducir a la muerte del 99.9% respectivamente, el crecimiento *in vitro* de un inóculo de *L. mesenteroides* previamente estandarizado.

La preparación de las diluciones se realizó en tubos de vidrio con tapas de plástico con diferentes concentraciones del extracto natural en el medio de cultivo comprendidas entre (0,09 a 9,54) %m/v donde el volumen final mínimo, de cada tubo, fue de 1 mL. Como control, se utilizó un tubo con el medio de cultivo sin el extracto natural.

La preparación del inóculo se realizó con la misma técnica descrita en la sección 2.3. Luego se agregó un ansa del inóculo estandarizado a cada tubo de las diluciones anteriores junto al tubo de control de crecimiento con posterior homogeneización de la mezcla, teniendo en cuenta que el tiempo empleado no debe ser superior a 15 min entre la preparación del inóculo y su colocación en el tubo.

3. Resultados

De las características particulares de la bacteria en estudio, se pudo comprobar en el laboratorio las siguientes: morfología de coco, Gram (+), formación en pares o cadenas; formación de dióxido de carbono y de dextrano; crecimiento en MRS, en Mayeux, en caldo nutritivo; crecimiento positivo en caldo MRS con solución de NaCl 3%, crecimiento negativo en caldo MRS con solución NaCl 10%

Por su parte, de los resultados obtenidos de la *tipificación biológica* en la identificación de microorganismos por secuenciación de un fragmento del gen que codifica el 16S rRNA, el aislamiento (cocos ovalados en cadena, productor de gas en MRS a 34°C) pudo identificarse como perteneciente a la especie *L. mesenteroides* con un elevado grado de certeza (99 %), sin poder discernirse mediante la técnica empleada, la subespecie (*mesenteroides* o *dextranicum*).

Posteriormente a la identificación de la bacteria en estudio, se realizaron las pruebas de sensibilidad a partir de los extractos provenientes de hojas de tomillo, laurel, eucalipto, cedrón, menta, diente de león y perejil; frutos de pimentón y ajo; flores y frutos de clavo de olor; y cáscaras de limón y pomelo. Se obtuvieron halos de inhibición de 10 mm con el extracto de pomelo; de 16 mm con el extracto de limón; de 9 mm con el extracto de menta y de 12 mm con el extracto de eucalipto. Con los restantes extractos no se obtuvieron halos de inhibición. A continuación, para las situaciones donde se formó el halo de inhibición, se efectuaron siembras a partir de los halos de inhibición, en una segunda placa con medio MRS agarizado. De esta observación, se pudo ver que el extracto obtenido a partir de cáscaras de limón presentó concentración bactericida ya que no exhibe crecimiento en esta placa con MRS, mientras que los extractos de menta, pomelo y eucalipto presentaron concentración de inhibición por producir crecimiento en las mismas. La Tabla 1 resume los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad.

Tabla 1. Pruebas de sensibilidad para los diferentes extractos naturales utilizados

Producto natural	Parte de la planta usada	Diámetro del halo (mm)	Crecimiento en placa
Limón	Cáscaras	16	(-)
Eucalipto	Hojas	12	(+)
Pomelo	Cáscaras	10	(+)
Menta	Hojas	9	(+)
Tomillo	Hojas	n.d.	
Laurel	Hojas	n.d.	
Cedrón	Hojas	n.d.	
Diente de León	Hojas	n.d.	
Perejil	Hojas	n.d.	
Pimentón	Frutos	n.d.	
Ajo	Frutos	n.d.	
Clavo de olor	Flores y frutos	n.d.	

n.d.: no detectado

Considerando que el extracto natural obtenido de las cáscaras de limón presentó actividad bactericida se continuó su estudio como antimicrobiano, para la cuantificación de la actividad in vitro de este extracto natural frente al crecimiento de *L. mesenteroides*. Para ello, se efectuaron pruebas, aplicando el método de macrodilución en caldo, con diferentes diluciones del extracto natural en el medio de cultivo MRS y en caldo nutritivo. Para ello, se prepararon diferentes concentraciones del antimicrobiano comprendidas entre 0,09 a 9,54 %m/v. Se observó que, para lograr la inhibición de la cepa en estudio, se requirió una menor concentración del extracto en caldo nutritivo que en el MRS La CIM del extracto natural en el caldo nutritivo, se encontró en un rango de (0,17 – 0,29) %m/v; mientras que en el MRS se encontró entre (0,29 – 0,43) %m/v.

4. Conclusiones

Diferentes extractos obtenidos a partir de productos naturales renovables han sido evaluados para la búsqueda de inhibidores y bactericidas de la bacteria *L. mesenteroides*, presente en salchichas tipo Viena, envasadas al vacío a partir de dos a tres semanas de almacenamiento bajo refrigeración.

De esta investigación se concluye que el extracto obtenido a partir de la cáscara de limón puede ser utilizado como potencial bactericida mientras que los extractos naturales obtenidos de hojas de menta, hojas de eucalipto y cáscaras de pomelo pueden ser utilizados como potenciales inhibidores de las mismas.

5. Agradecimientos

Los autores de este trabajo agradecen a la Universidad Tecnológica Nacional por la ayuda económica recibida (PID 3486 y 3458) y a la empresa La Piamontesa por la facilitar la bacteria en estudio.

6. Referencias

- Andreatta, A. et al., 2009. Caracterización de Aceites Esenciales del departamento San Justo (Córdoba).
- Budde, B.B. et al., 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: Culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *International Journal of Food Microbiology*, 83, pp.171–184.
- Diez, A.M., Jaime, I. & Rovira, J., 2009. The influence of different preservation methods on spoilage bacteria populations inoculated in morcilla de Burgos during anaerobic cold storage.

- International Journal of Food Microbiology*, 132(2-3), pp.91–9.
- Edwards, U., Rogall, T., Blockerl, H., Emde, M. and Bottger, E. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* 17(19), 7843-7853.
- Georgantelis, D. et al., 2007. Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. *Meat Science*, 76(1), pp.172–181.
- Gill, A.O. & Holley, R. A., 2000. Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. *Food Research International*, 33(2), pp.83–90.
- Lara-Lledó, M., Olaimat, A. & Holley, R.A., 2012. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on bologna sausages by an antimicrobial film containing mustard extract or sinigrin. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), pp.25–31.
- Michelena, G. et al., 2005. Efecto inhibidor del ácido jasmónico sobre el crecimiento de bacterias y hongos. *Redalyc*, p.6.
- Sandra, L. et al., 2013. *Petiveria alliacea* L. : distintas condiciones experimentales en la elaboración de extractos con actividad antimicrobiana *Petiveria alliacea* L. : various experimental conditions in the extracts elaboration with antimicrobial activity. , pp.274–287.
- Sambrook, J., Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Siripatrawan, U. & Noipha, S., 2012. Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 27(1), pp.102–108.
- Vermeiren, L. et al., 2006. The sensory acceptability of cooked meat products treated with a protective culture depends on glucose content and buffering capacity: A case study with *Lactobacillus sakei* 10A. *Meat Science*, 74(3), pp.532–545.