

EFECTO *in vitro* DE *Lactobacillus casei* Y *Lactobacillus acidophilus* SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Salmonella* spp. EN YOGURT LÍQUIDO

In vitro EFFECT OF *Lactobacillus casei* AND *Lactobacillus acidophilus* ON *Salmonella* spp. GROWTH IN LIQUID YOGURT

Omaira Besereni¹, Teresita Luigi^{1,4*} María Acosta² y Legna Rojas^{3,5}

¹ Laboratorio de Prácticas Profesionales de Bacteriología, Escuela de Bioanálisis Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Venezuela. ² Laboratorio de la Cruz Roja. Valencia, estado Carabobo, Venezuela. ³ Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Venezuela. ⁴ Centro de Investigaciones de Microbiología Ambiental (CIMA- UC). Departamento de Microbiología, Escuela de Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Venezuela. ⁵ Centro de Biotecnología Aplicada. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. Venezuela.

*Autor de correspondencia: Teresita Luigi S. (e-mail): teresitaluigi@hotmail.com

RESUMEN

El uso de lactobacilos probióticos como agentes de biopreservación en alimentos es cada vez más conocido ya que producen diferentes agentes antimicrobianos capaces de inhibir el crecimiento de patógenos además de aumentar la vida media del producto. Con el objetivo de evaluar el efecto *in vitro* de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* sobre el crecimiento de *Salmonella* spp. inoculada artificialmente en yogurt líquido semidescremado, se procedió a confrontar *L. acidophilus* y *L. casei* con suspensiones de *Salmonella* spp. de baja y alta concentración (1×10^3 y 1×10^8 UFC/mL, respectivamente) en yogurt líquido como matriz. Las poblaciones de *Salmonella* spp. inoculadas a baja y alta concentración disminuyeron más ($P < 0,001$) en presencia de la mezcla de lactobacilos que cuando fueron adicionados los probióticos por separado. El pH de las muestras, con y sin probióticos, disminuyó al transcurrir el tiempo en presencia del inóculo de *Salmonella* spp., mientras que el recuento de los lactobacilos durante el almacenamiento fue ligeramente mayor ($P < 0,02$) cuando ambos probióticos se encontraban juntos que cuando se encontraban por separado. La incorporación de las mezclas de probióticos *L. casei* y *L. acidophilus* en el yogurt líquido semidescremado favorece la total inhibición del crecimiento de bacterias gastrointestinales como *Salmonella* spp. El presente trabajo constituye un aporte importante para promover en la industria láctea nacional, la adición de estos microorganismos probióticos, los cuales no sólo confieren mayor valor agregado al alimento, sino que preservan y aseguran la inocuidad del mismo, repercutiendo en un menor riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos gastrointestinales.

Palabras clave: *Lactobacillus*; *Salmonella*; yogurt; probióticos

ABSTRACT

The use of probiotic lactobacilli as biopreservation agents in foods is increasingly known as they produce different antimicrobial agents capable of inhibiting the growth of pathogens as well as increasing the half-life of the product. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* effect of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* on *Salmonella* spp. growth in semi-skimmed liquid yogurt. *L. acidophilus* and *L. casei* strains were artificially inoculated with bacterial suspensions of *Salmonella* spp. at low and high concentration (1×10^3 and 1×10^8 CFU/mL, respectively). Populations of *Salmonella* spp. inoculated at low and high concentration decreased earlier in the presence of the mixture of lactobacilli than when the probiotics were added separately ($P < 0.001$). The pH of the samples with and without probiotics decreased through the time in the presence of *Salmonella* spp. inoculum, while the lactobacillus count during storage was slightly higher when both probiotics were added together than when they were incorporated separately ($P < 0.02$). The incorporation of probiotic mixtures *L. casei* and *L. acidophilus* in the semi-fat liquid yogurt favors the total inhibition of the growth of gastrointestinal bacteria such as *Salmonella* spp. The present research is an important contribution to promote in the national dairy industry the addition of these probiotic microorganisms, not only concedes more added value to the food, but also preserves and ensures the safety of it, having a lower risk of gastrointestinal diseases.

Key words: *Lactobacillus*; *Salmonella*; yogurt; probiotics

INTRODUCCION

Tradicionalmente, la producción de yogurt está basada en la adición de fermentos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [34]; estas bacterias son responsables de la acidificación del medio, las propiedades organolépticas (aroma, sabor, textura) y valor nutricional [18]. La producción de diferentes agentes antimicrobianos, tales como ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas por parte de bacterias ácido lácticas (BAL), como *Lactobacillus casei* principalmente *Lactobacillus casei Shirota* y *Lactobacillus acidophilus*, han permitido mejorar la producción de alimentos, disminuyendo el uso de preservativos químicos adicionales, e inclusive, dependiendo de la naturaleza del alimento, se podría prescindir de estos agentes químicos, aumentando así la vida media del producto sin sumar riesgos a la salud del consumidor. Como agentes terapéuticos, las BAL causan efectos beneficiosos como el restablecimiento del equilibrio microbiano y el mejoramiento de la digestión de la lactosa, eliminando síntomas de la intolerancia [32]. En este aspecto en particular, los productos lácteos fermentados proporcionan barreras para el crecimiento de microorganismos patógenos, entre ellos, el incremento de la acidez durante la fermentación así como almacenamiento refrigerado, no obstante, algunos estudios sobre *Escherichia coli* O157: H7 reportan su capacidad de tolerar las condiciones ácidas durante la preparación de yogurt, logrando sobrevivir periodos de 10 a 21 días (d) a diferentes temperaturas de almacenamiento [7]. En este sentido, varios estudios han demostrado que la adición de cultivos probióticos al yogurt acorta la supervivencia de *L. monocytogenes* y *E. coli* O157: H7 durante el período de almacenamiento, sin embargo, existe poca literatura disponible sobre estudios similares utilizando *Salmonella* spp. Las especies de *Salmonella* pueden producir infecciones invasivas que conducen a la sepsis y muerte en pacientes susceptibles. Aunque el contacto directo con animales infectados es una ruta posible de infección, las personas suelen adquirir salmonelosis a través de la exposición transmitida por los alimentos [6, 7]. Los estudios sobre probióticos permiten optimizar los procesos de elaboración del producto alimenticio, así como también, conocer los mecanismos por los cuales estas bacterias ejercen su efecto benéfico en el hospedador lo que refuerza la confianza de la comunidad médica y la población en general, en el uso de estos cultivos lácticos [19]. Es importante destacar que en Venezuela, los probióticos son un tema de poca difusión, existiendo pocos grupos de investigación que desarrollen, empleen o evalúen probióticos para uso en la industria de alimentos nacional. En el país existen escasos estudios publicados relacionados con el efecto *in vitro* de microorganismos probióticos, tales como *L. casei* y *L. acidophilus* sobre el crecimiento de *Salmonella* spp., enteropatógeno considerado un problema de salud pública debido a la aparición de cepas resistentes a muchos antibióticos y ser etiología importante de procesos gastrointestinales severos [30]. Asimismo, en Venezuela existe un bajo número de productos comercializados que contienen probióticos, por lo que es una realidad actual, que en la industria láctea del país, se

haga necesario desarrollar nuevos con estos microorganismos; lo que se traduciría en un impacto positivo a la salud del consumidor y a su vez, se requiere sensibilizar a la población sobre las ventajas de incorporar alimentos con probióticos como parte fundamental de los hábitos de consumo enfatizando en difundir conocimiento de la relación que existe entre alimentación y salud, la importancia de prevenir enfermedades y la búsqueda generalizada de una senectud más saludable. Considerando lo antes expuesto, el objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar el efecto *in vitro* de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* sobre el crecimiento de *Salmonella* spp. en yogurt líquido semidescremado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra

En el presente estudio fueron incluidas 32 muestras de yogurt líquido semidescremado, definido según, por la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) [14], como el producto coagulado obtenido por fermentación láctica de la leche o mezcla de ésta con derivados lácteos, mediante la adición de BAL (*S. thermophilus* y *L. bulgaricus*), viables y activas durante todo el proceso de elaboración. De consistencia fluida (líquida), con contenido de grasa entre 1 y 3,2 % p/p (semidescremado).

Se seleccionaron muestras pertenecientes a una misma marca comercial (presentación de 900 mililitros (mL), con los fermentos *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, Bifidobacterium y *L. acidophilus* y con un periodo de vida útil entre 20 a 30 d. Las mismas fueron adquiridas al azar en un expendio comercial de la ciudad de Valencia, estado Carabobo, Venezuela.

La distribución de las muestras se realizó de la siguiente manera: 24 muestras que conformaron el grupo experimental utilizadas para evaluar el efecto antagónico y viabilidad de las cepas en estudio y 8 muestras utilizadas como grupo control. Al momento de la compra, todas las muestras se encontraban almacenadas a 4 °C y se transportaron a temperatura de refrigeración en un recipiente isotérmico hasta el laboratorio de Prácticas Profesionales de Bacteriología de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad de Carabobo, sede Carabobo (EB-UC).

Cepas bacterianas

Se utilizaron cepas de *Lactobacillus casei* (MGS-21) y *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) suministradas por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM). Asimismo, se utilizó como cepa patógena para la contaminación artificial de las muestras de yogurt líquido semidescremado, un aislado puro de *Salmonella* spp., proveniente de la colección del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM 497), suministrada por el Prof. Vidal Rodríguez-Lemoine. Laboratorio de Biología de plásmidos bacterianos. Centro de

Biología Celular, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Las cepas de *Lactobacillus* se mantuvieron viables a temperatura ambiente realizando repiques periódicos en cuñas de Agar MRS (Man Rogosa y Sharpe) y en agar nutritivo para *Salmonella*.

Proporción de los cultivos lácticos en el yogurt

Se realizó un frotis delgado en una lámina portaobjetos tomando una alícuota del yogurt líquido semidescremado, el cual se dejó secar por unos minutos (min) al aire para luego fijarlo al calor; a continuación, se hizo la tinción de Gram. Finalmente, se observó al microscopio óptico con objetivo de inmersión (100X) (marca LEICA, DM1000, Alemania), para así obtener un estimado porcentual de la composición y densidad de las BAL encontradas en el yogurt [17].

Determinación de indicadores de calidad sanitaria del yogurt líquido semidescremado

Se determinó la calidad sanitaria a las 32 muestras de yogurt líquido semidescremado según metodología estándar sugerida por la American Public Health Association [3] y por las normativas regidas por la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) [10, 12, 14].

Determinación de *Salmonella*

La detección de *Salmonella* fue realizada según la metodología descrita en la Norma COVENIN [11] con etapas de pre-enriquecimiento, enriquecimiento selectivo, y aislamiento selectivo-diferencial con posterior identificación bioquímica convencional.

Inoculación artificial con cepas de *Lactobacillus casei*, *lactobacillus acidophilus* y *Salmonella* spp.

Las cepas de *L. casei*, *L. acidophilus* y *Salmonella* spp. fueron cultivadas en caldo nutritivo (HIMEDIA®, Mumbai, India), e incubadas a 36 ± 1 °C por 24 horas (h), para posteriormente preparar suspensiones cuya densidad bacteriana fue ajustada al patrón de MacFarland N° 2, equivalente a 6×10^8 células (cél) por (mL). En el caso de la suspensión de *Salmonella* spp. (10^8 células/mL) (Concentración alta de *Salmonella* spp.), se procedió a partir de ésta a la realización de diluciones seriadas hasta obtener una concentración de 1×10^3 cel/mL (Concentración baja de *Salmonella* spp.). Finalmente, para la preparación de la mezcla de *L. casei* y *L. acidophilus* se preparó una suspensión cuya densidad bacteriana se ajustó a la equivalente a la del patrón MacFarland N° 8 ($1,2 \times 10^8$) para ambas cepas (*L. casei* y *L. acidophilus*), obteniendo una mezcla con una relación 1:1. Las mediciones se realizaron utilizando un espectrofotómetro (Spectronic-20, Bausch- Lomb, EUA) y midiendo la absorbancia a 520 nanómetros (nm). Asimismo, se utilizó la técnica del recuento estándar en placa según norma COVENIN [8], luego de diluir la muestra del cultivo puro para confirmar la concentración

bacteriana.

Ensayos experimentales

Las 24 muestras experimentales, fueron subdivididas en 6 sub-muestras de las cuales se midieron 20 mL de yogurt y se llevaron a fiolas. Posteriormente, se realizó la inoculación artificial con las suspensiones bacterianas, tanto de probióticos como de *Salmonella* spp. El grupo de muestras control (n=8) fue inoculado solo con suspensiones de alta (10^8 células/mL) (n=4 grupo, control A) y baja (10^3 células/mL) (n=4, control B) concentración de *Salmonella* spp, con los protocolos de ensayos se realizaron de la siguiente manera: 1.- Yogurt inoculado con *Salmonella* spp. a baja concentración (1×10^3 Unidades Formadoras de Células (UFC)/mL), en presencia de *L. casei*, *L. acidophilus* por separado así como una mezcla de ellos. 2.- Yogurt inoculado con *Salmonella* spp. a alta concentración (1×10^8 UFC/mL), en presencia de *L. casei*, *L. acidophilus* por separado así como una mezcla de ellos. 3.- Controles A y B, en ausencia de probióticos añadidos. Finalmente, una vez realizadas las inoculaciones respectivas, todas las muestras fueron refrigeradas a 5 ± 1 °C por 21 días (d), período en el cual se realizó detección de *Salmonella* cada 24 h (COVENIN [11]).

Todos los ensayos se realizaron siguiendo normas de Bioseguridad en campana de Flujo Laminar (marca THERMO FORMA, modelo: SG-303, EUA) y con mechero de Bunsen Marca Fisher, modelo 1530, EUA) limpiando la boca del envase previo a la toma de cada alícuota.

Determinación de pH. Se realizaron mediciones de pH según la norma COVENIN [9] a las 32 muestras de yogurt líquido semidescremado, utilizando para ello, un pHmetro dual de IQ Scientific Instruments, Inc. (Carlsbad, CA, EUA). Las mediciones fueron realizadas a los 7; 14 y 21 d de almacenamiento a 5 ± 1 °C. Durante todo el tiempo de almacenamiento, se verificó diariamente la temperatura de refrigeración.

Recuento viable de lactobacilos

A las 24 muestras que conformaron el "grupo experimental", se les realizó un recuento viable de lactobacilos según norma COVENIN [13] a los 21 d de almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Análisis estadístico

Para determinar la sobrevivencia de inóculos de concentraciones conocidas de *Salmonella* spp. en yogurt líquido semidescremado con o sin adición de probióticos (*L. casei*, *L. acidophilus* o la mezcla de ambos), se realizó una comparación de medias utilizando el estadístico de Student (*t*) seguido de un Análisis de Varianza (ANOVA) de Kruskal-Wallis (comparación por Rangos), mientras que para determinar si hubo diferencias en los probióticos adicionados se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tamhane [29]. Para el análisis de la variación del pH a lo largo del tiempo, entre los diferentes tipos de cultivo

(grupo experimental y grupo control), se utilizó una ANOVA de dos vías a un nivel de confianza del 95 % [22]. Para todas las determinaciones se utilizó el programa estadístico SPSS [33].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la TABLA I se expresa el grado de aceptabilidad de las muestras según los indicadores de calidad estudiados, en la misma se observa que para el caso de los coliformes totales y termotolerantes, todas las muestras estuvieron dentro del rango aceptado (100 %) por la norma COVENIN [14] y coinciden con los reportados por Moreira y col. [24] y Bortoluzzi y col. [4], los cuales señalan valores por debajo de los límites permitidos.

TABLA I
GRADO DE ACEPTABILIDAD DEL TOTAL DE MUESTRAS DE YOGURT LÍQUIDO SEMIDESCREMADO PREVIO A LA CONTAMINACIÓN ARTIFICIAL

PARÁMETRO	m	M	NMA/32	% ACP
Coliformes Totales	10	1,0x 10 ²	32	100
Coliformes Termotolerantes	10	1,0x 10 ²	32	100
Mohos	10	1,0x 10 ²	32	100
Levaduras	10	1,0x 10 ²	24	75
<i>Salmonella</i> spp.	0	0	32	100

m, M= Límites de contajes microbiológicos mínimo (m) y máximo (M) recomendables por muestra analizada que no debe sobrepasarse, de ser así se considera la muestra defectuosa, NMA: Número de muestras aceptadas, ACP: Aceptabilidad.

Tales resultados son esperados, ya que la producción de ácido láctico por parte de las BAL disminuye el pH inhibiendo el crecimiento de estos microorganismos [2]. Los valores para el recuento de los mohos también mostraron un 100 % de aceptabilidad según la norma antes citada. En cuanto al recuento de levaduras se mostró que, 75 % de las muestras se presentaron dentro del rango de aceptación y sólo un 25 % no cumplió con los requisitos exigidos por la Normativa Venezolana. Es interesante resaltar, que la presencia de levaduras en las muestras evaluadas en esta investigación, podría explicarse, porque las mismas tienen la capacidad de desarrollarse en leches fermentadas a partir de un bajo número inicial, cuando ocurre la hidrólisis de la lactosa a glucosa mediante la acción de las BAL, además, de que su crecimiento se ve favorecido por pH ácidos, ya que son considerados organismos acidófilos [15]. Se corroboró además ausencia de *Salmonella* spp. en el 100% de las muestras de yogurt líquido analizadas previo a la contaminación artificial de las muestras.

En relación a los ensayos experimentales reflejados en los sistemas evaluados, se reportó una disminución total de viabilidad de las poblaciones de *Salmonella* spp. a baja concentración (1x10³ UFC/mL) luego de 24 y 72 h de almacenamiento en

presencia de los probióticos adicionados (*L. acidophilus*, *L. casei*, la mezcla de ambos) y el grupo control (FIG.1).

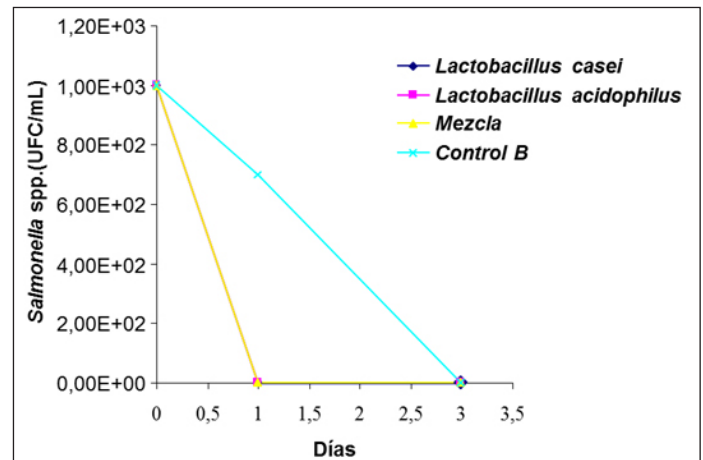


FIGURA 1. SOBREVIVENCIA DE *Salmonella* spp. (1x10³ UFC/ML) EN YOGURT LÍQUIDO SEMIDESCREMADO CON Y SIN PROBIÓTICOS A TRAVÉS DEL TIEMPO.

Día 0: corresponde al momento de incorporación de los probióticos.

Día 1: el crecimiento de *Salmonella* spp. disminuye en su totalidad al ser incorporados *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* por separado, así como la mezcla de ambos probióticos.

***Control B: Concentración inicial Baja del patógeno (1x10³ UFC/mL) sin probióticos** La evidente pérdida de viabilidad de *Salmonella* spp. puede atribuirse a varios factores, entre ellos, el efecto inhibitorio que ejerce el pH del yogurt, pues el pH de las muestras de yogurt disminuyó progresivamente a lo largo del tiempo, pasando de un valor inicial promedio de 4,45 hasta un valor final promedio de 4,16, valores en los cuales son inhibidos muchos patógenos [2, 24]. Adicionalmente, hay que destacar que los probióticos adicionados al yogurt pueden disminuir el pH a través de la producción de ácidos orgánicos de cadena corta como ácido láctico, ácido acético y ácido butírico, peróxido de hidrógeno y sustancias antimicrobianas de bajo peso molecular como bacteriocinas, por ende, el conjunto de estos factores, además de la acidez del medio, van a ejercer una acción tóxica directa sobre *Salmonella* spp. generando un ambiente hostil que va a inhibir el crecimiento de este patógeno [31]. Además, los probióticos también compiten con *Salmonella* por los nutrientes del medio [5] y disminuyen el potencial de óxido-reducción del alimento [23, 31], lo que se traduce en un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del patógeno. Por otro lado, cuando *Salmonella* fue inoculada a alta concentración (1x10⁸ UFC/mL), la viabilidad a las 24 h disminuyó parcialmente (más de 50 %) cuando se utilizó la mezcla de ambos probióticos, mientras que no se registraron recuentos viables y cultivables de *Salmonella* spp. a las 72 h del ensayo (FIG.2).

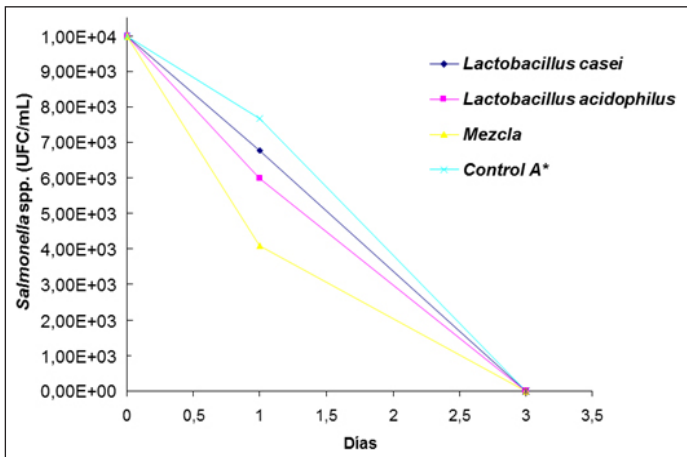


FIGURA 2. SOBREVIVENCIA DE *Salmonella* spp. (1×10^8 UFC/ML) EN YOGURT LÍQUIDO SEMIDESCREMADO CON Y SIN PROBIÓTICOS A TRAVÉS DEL TIEMPO.

*Control A: Concentración inicial del patógeno Alta (1×10^8 UFC/mL) sin probióticos.

La pérdida parcial de la viabilidad de *Salmonella* spp. a una alta concentración se puede deber a la adaptación del patógeno a las condiciones extremas de pH. El género *Salmonella* puede crecer a un pH mínimo de 3,8 gracias a la producción de un grupo de proteínas de choque ácido [21]. En este trabajo, la temperatura de almacenamiento del yogurt fue de $5 \pm 1^\circ\text{C}$, y el género *Salmonella* tiene capacidades psicrótróficas que les permitirían momentáneamente lograr sobrevivir a temperaturas de refrigeración, no obstante, la disminución del pH logró inhibir el crecimiento de *Salmonella* spp.

Al realizar un análisis exploratorio de los datos, se comprobó mediante la prueba de contraste de Levene [22] de que no existe homogeneidad de varianza entre las muestras de yogurt líquido con o sin probióticos inoculados con una concentración alta de *Salmonella* spp ($P < 0,016$), por lo que se procedió a comparar las medias de las diferentes muestras utilizando un ANOVA de Kruskal-Wallis, la cual resultó en una diferencia significativa ($P < 0,0001$) del recuento (UFC/mL) de *Salmonella* spp. entre los diferentes tipos de probióticos y el control cuando el microorganismo es inoculado a alta concentración (1×10^8 UFC/mL), por lo que el crecimiento del patógeno inoculado a alta concentración en las muestras de yogurt líquido con los diferentes probióticos adicionados es significativamente diferente. En este orden de ideas, al comparar las muestras de yogurt líquido que conforman el grupo control (sin probióticos experimentales) con las muestras de yogurt adicionado con probióticos más una concentración alta del patógeno (grupo experimental), se determinó, como era de esperarse, no sólo que hay diferencias entre el control y los grupos experimentales, sino que la magnitud de esta diferencia varía dependiendo del tipo de probióticos adicionado. Estas magnitudes se pueden observar al comparar la distribución de cada gráfico de caja (FIG.3), donde a mayor

distancia del control respecto a cada inóculo con probióticos, menor es la probabilidad que presenta la comparación de medias. Finalmente, se pudo evidenciar diferencias entre los probióticos adicionados, mediante la prueba de Tamhane [29], donde el grupo control (sin probióticos), presentó un mayor crecimiento de *Salmonella* spp. ($P < 0,03$), seguido de las muestras de yogurt con probióticos por separado ($P < 0,001$) y las muestras de yogurt con la mezcla de ambas cepas de lactobacilos ($P < 0,001$), lo que evidencia el sinergismo de ambos microorganismos probióticos en la disminución del crecimiento del patógeno.

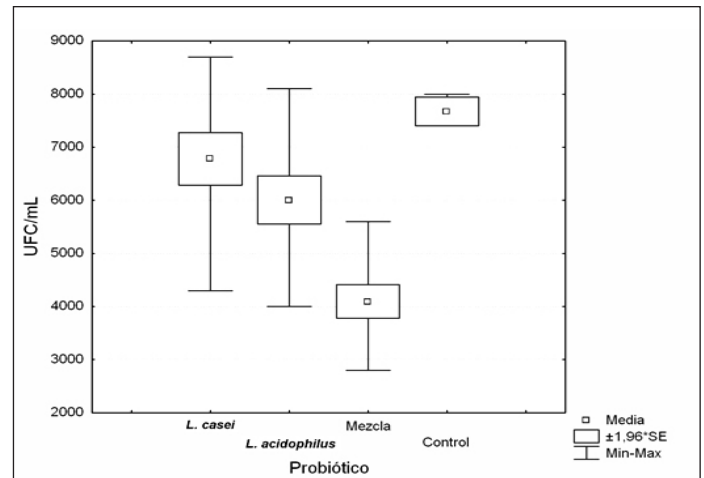


FIGURA 3. COMPARACIÓN DE RECuentOS (UFC/ML) OBTENIDOS DE *Salmonella* spp. a alta concentración (1×10^8 UFC/mL) en yogurt líquido con y sin probióticos.

Al comparar el pH de las muestras de yogurt con los diferentes tipos de probióticos adicionados, a ambas concentraciones del patógeno (inoculación alta y baja) en función del tiempo, arrojó diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,02$).

Asimismo, en la FIG.4 se detalla que el pH de las muestras de yogurt con y sin probióticos disminuyó al transcurrir el tiempo, tanto a baja (1×10^3 UFC/mL) como a alta (1×10^8 UFC/mL) concentración del inóculo de *Salmonella* spp. ($P < 0,05$), mientras que el pH de las muestras de yogurt líquido sin probióticos (grupo control) a ambas concentraciones del patógeno (alta y baja) en función del tiempo, tiende a ser ligeramente mayor ($P < 0,02$) que en las muestras de yogurt líquido con probióticos adicionados (FIG.4). A pesar de no haber realizado ensayos para la determinación de ácidos orgánicos (AO), se puede suponer que la disminución progresiva del pH a lo largo del tiempo en las muestras de yogurt se deba posiblemente a la producción de ácidos orgánicos (AO) (aportando un incremento la concentración de H^+ en el medio) por parte de las bacterias probióticas y del cultivo iniciador [35].

El recuento viable de lactobacilos arrojó que los grupos experimentales de *L. acidophilus*, *L. casei* y una mezcla de ambos (UFC/mL) disminuyó una unidad logarítmica respecto a su concentración inicial, por lo que no mostró un descenso

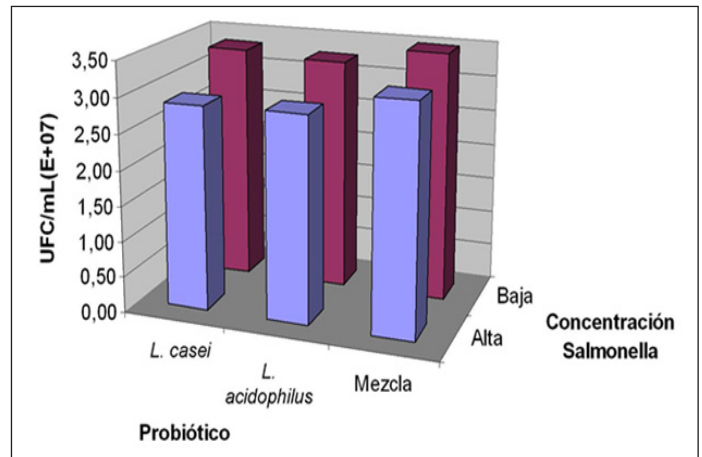
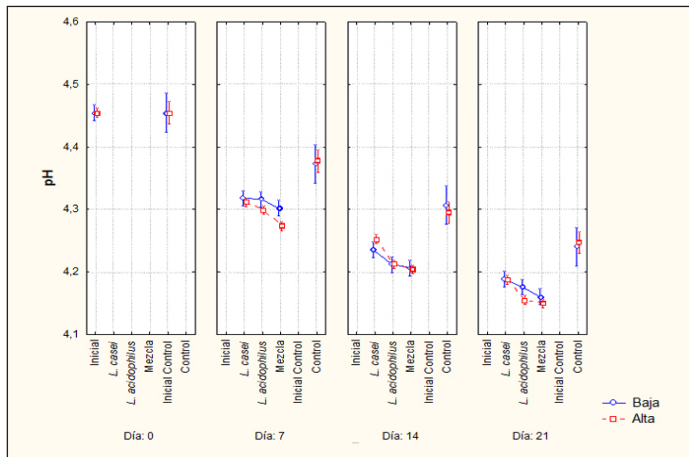


FIGURA 4. COMPARACIÓN DEL PH DE LAS MUESTRAS DE YOGURT SEGÚN EL TIPO DE PROBIÓTICO ADICIONADO, INOCULADO A BAJA Y ALTA CONCENTRACIÓN DEL PATÓGENO (*Salmonella* spp.) DURANTE EL TIEMPO DE EXPERIMENTACIÓN.

FIGURA 5. CRECIMIENTO PROMEDIO (UFC/ML) DE LOS DIFERENTES PROBIÓTICOS ADICIONADOS A LAS MUESTRAS DE YOGURT LÍQUIDO INOCULADOS CON *Salmonella* spp. A DIFERENTES CONCENTRACIONES (1×10^8 Y 1×10^3 UFC/ML) A LOS 21 DÍAS DE ALMACENAMIENTO.

significativo en su concentración ($P < 0,001$) luego de 21 d de almacenamiento. Según lo reportado en la bibliografía, la disminución de la viabilidad de los probióticos es esperada ya que factores, tales como la acidez propia del yogurt, disminución del niveles de oxígeno, sensibilidad a sustancias antimicrobianas producidas por las mismas bacterias probióticas y los cultivos iniciadores, falta de nutrientes en el medio y concentración de azúcares (presión osmótica), entre otros [16, 25], no sólo afecta al patógeno sino que también puede afectar de manera variable las cepas probióticas, por lo cual resulta relevante la evaluación experimental, tanto por separado así como de mezclas de cepas probióticas sobre el crecimiento de un patógeno como *Salmonella* [6, 26].

con la producción de bacteriocinas [1, 27, 28]. Moléculas como el ácido láctico actúa como un permeabilizador de la membrana externa de patógenos gramnegativos, aumentando así su susceptibilidad a las moléculas antimicrobianas al permitir la entrada de estas moléculas al interior de las bacterias [27, 28]. Por tanto, el sinergismo entre las dos cepas probióticas ejerce un efecto antagónico en la viabilidad *in vitro* de *Salmonella* spp. al impedir el crecimiento y desarrollo del patógeno. Es importante mencionar que las muestras de yogurt líquido que conformaron el grupo control (sin probióticos adicionados) también presentaron una paulatina disminución en el número de bacterias inoculadas de *Salmonella* spp., esto posiblemente se deba a que el cultivo iniciador por sí sólo (*S. thermophilus* y *L. bulgaricus*) también genera sustancias como el ácido láctico y proteasas, además del agotamiento de nutrientes en el medio y la acumulación de metabolitos [31, 35].

A pesar de la disminución de viabilidad reportada, al evaluar detalladamente el efecto de las cepas probióticas sobre el crecimiento del patógeno, los recuentos de los diferentes probióticos fue mayor cuando la concentración del inóculo de *Salmonella* spp. fue baja (1×10^3 UFC/mL) y cuando *L. casei* y *L. acidophilus* se encontraban juntos (FIG.5).

CONCLUSIONES

Estos resultados pueden deberse al factor de competencia existente entre los microorganismos debido a los nutrientes en el medio [1], mientras que a baja concentración de *Salmonella*, el patógeno se ve desplazado competitivamente por las cepas de *Lactobacillus*, con una alta concentración de *Salmonella* la competencia por los nutrientes es mayor, no obstante, la disminución de los niveles pH, producción de sustancias bactericidas, etc., también inhiben el crecimiento del patógeno [20].

La incorporación de mezclas de microorganismos probióticos como *L. casei* o *L. acidophilus*, en yogurt líquido semidescremado, favorece la total inhibición del crecimiento de bacterias gastrointestinales como *Salmonella*. El presente trabajo constituye un aporte importante para promover en la industria láctea nacional la adición de estos microorganismos, los cuales presentan un sinergismo mediante la secreción conjunta de ácidos orgánicos que contribuyen a ejercer un efecto antagónico en el crecimiento y desarrollo de *Salmonella* spp. La incorporación de ambos probióticos al yogurt no sólo aumenta su valor agregado al hacerlos más saludables para quienes los consuman, sino que preservan y aseguran la inocuidad del alimento, repercutiendo en un menor riesgo de ocurrencia de enfermedades gastrointestinales.

De acuerdo con los resultados, se evidencia que la mezcla de ambos microorganismos probióticos (*L. acidophilus* y *L. casei*) manifiestan un sinergismo favorable mediante la secreción de ácidos que producen una disminución del pH en combinación

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABDEL-DAIM, A.; HASSOUNA, N.; HAFEZ, M.; ASHOR, M.S.A.; ABOULWAFI, M.M. Antagonistic activity of *Lactobacillus* isolates against *Salmonella typhi* in vitro. **Biomed. Res. Int.** 5 (31): 1-11. 2013
- [2] ABREU, E. D.; ZENI, J.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J. Frozen yogurt from sheep milk. **Rev. Ceres.** 63(5): 605-613. 2016.
- [3] AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18 Ed. Washington, D.C. Pp 919-927. 1992.
- [4] BORTOLUZZI, M.; NUNES, C.R.Z.; SILVA, M.L.; KALSCHNE, D.L.; MENDONÇA, S.N.T.G.; BRANDÃO, W. Microbiological, physicochemical and sensory characterization of commercial yogurt with plum pulp. **Rev. Bras. Pesq. Alim.** 5(1): 9-18. 2014.
- [5] CAMPANA, R.; VAN HEMERT, S.; BAFFONE, W. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. **Gut. Pathog.** 9(1): 1-12. 2017.
- [6] CARTER, A.; ADAMS, M.; LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M.J. Colonisation of poultry by *Salmonella* Enteritidis S1400 is reduced by combined administration of *Lactobacillus salivarius* 59 and *Enterococcus faecium* PXN-33. **Vet. Microbiol.** 199: 100-107. 2017.
- [7] CIRONE, K.; HUBERMAN, Y.; MORSELLA, C.M.; MÉNDEZ, L.; JORGE, M.; PAOLICCHI, F. Growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* Enteritidis during Preparation and Storage of Yogurt. **ISRN. Microbiol.** 2013: 1-7. 2013.
- [8] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma N° 902: 78. ALIMENTOS. Métodos para el recuento de microorganismos aeróbios en placas Petri. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Fondonorma. Venezuela. 1978.
- [9] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma N° 1315-79. Determinación de pH (acidez iónica). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Fondonorma. Venezuela. 1979.
- [10] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma N° 1086: 84. Métodos para Recuento de Bacterias Coliformes en Placas de Petri. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Fondonorma. Venezuela. 1984.
- [11] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma N° 1291: 88. Alimentos. Aislamiento e identificación de *Salmonella*. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Fondonorma. Venezuela. 1988.
- [12] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma N° 1337: 90. Método para recuento de hongos y levaduras. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Fondonorma. Venezuela. 1990.
- [13] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma N° 3006-93. Recuento de *Lactobacillus Bulgaricus* y *Streptococcus Thermophilus*. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Fondonorma. Venezuela. 1993.
- [14] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma N° 2393: 2001. Yogurt. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Fondonorma. Venezuela. 2001.
- [15] DE OLIVEIRA, FM.; LYRA, I.N.; ESTEVES, G.S.G. Avaliação microbiológica e físico-química de iogurtes de Morango industrializados e comercializados no município de Linhares- Es. **Rev. Bras. Prod. Agroind.** 15(2): 147-155. 2013.
- [16] EL-SAYED, E.M.; EL-ZEINI, H.M.; HAFEZ, S.A.; SALEH, F.A. Antibacterial Activity of Probiotic Yoghurt and Soy-Yoghurt against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **J. Nutr. Food. Sci.** 4(303): 1-6. 2014.
- [17] ELLNER, R. Cultivos Iniciadores. En: **Preguntas y respuestas sobre la microbiología de la leche y los productos lácteos**. Díaz de Santos, Ed. Madrid (España). 52pp. 2000.
- [18] GEMECHU, T. Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation. **Afr. J. Food. Sci.** 9(4): 170-175. 2015.
- [19] KILIC, G. The Effects of Probiotic Cultures in Functional Foods: Technological Aspects of Probiotics. In: **Microbial Cultures and Enzymes in Dairy Technology**. IGI Global. Pp. 101-121. 2018.
- [20] LEBEER, S.; BRON, P.A.; MARCO, M.L.; VAN PIJKEREN, J.P.; MOTHERWAY, M.O.C.; HILL, C.; KLAENHAMMER, T. Identification of probiotic effector molecules: present state and future perspectives. **Curr. Opin. Biotechnol.** 49: 217-223. 2018.
- [21] MALIK, M.A.; KOTWAL, S.K.; RASHID, M.; SHARMA, H.K.; SINGH, M.; SHARMA, N. Growth Dynamics of *Salmonella*, Isolated from Different Sources, at different Temperature and pH. **J. Anim. Res.** 5(1): 85-93. 2015.

- [22] MILTON, J.S. Regresión y correlación. En: **Estadística para biología y ciencias de la salud**. 3ra Ed. McGraw-Hill Interamericana Madrid. Pp 407– 428. 2001.
- [23] MISHRA, V.; SHAH, C.; MOKASHE, N.; CHAVAN, R.; YADAV, H.; PRAJAPATI, J. Probiotics as potential antioxidants: a systematic review. **J. Agric. Food. Chem.** 63(14): 3615-3626. 2015.
- [24] MOREIRA, I.D.S.; CASTRO, D.S.D.; FEITOA, M.K.D.S.B.; NUNES, J.S.; SANTOS, F.M.D. Elaboração e avaliação da qualidade de iogurtes de maçã adoçados com sacarose e com mel. **Rev. Verde. Agroecol. Desenvol. Sustent.** 9(1): 10-14. 2014.
- [25] PAKDAMAN, M.N.; UDANI, J. K.; MOLINA, J.P.; SHAHANI, M. The effects of the DDS-1 strain of *Lactobacillus* on symptomatic relief for lactose intolerance-a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover clinical trial. **Nutr. J.** 15(56): 1-11. 2016.
- [26] POTOČNJAK, M.; PUŠIĆ, P.; FRECE, J.; ABRAM, M.; JANKOVIĆ, T.; GOBIN, I. Three new *Lactobacillus plantarum* strains in the probiotic toolbox against gut pathogen *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. **Food. Technol. Biotech.** 55(1): 48-54. 2017.
- [27] REIS, J.A.; PAULA, A.T.; CASAROTTI, S.N.; PENNA, A.L.B. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. **Food. Eng. Rev.** 4(2): 124-140. 2012.
- [28] SILVA, B.C.; SANDES, S.H.C.; ALVIM, L.B.; BOMFIM, M.R.Q.; NICOLI, J.R.; NEUMANN, E.; NUNES, A.C. Selection of a candidate probiotic strain of *Pediococcus pentosaceus* from the faecal microbiota of horses by in vitro testing and health claims in a mouse model of *Salmonella* infection. **J. Appl. Microbiol.** 122(1): 225-238. 2017
- [29] TAMHANE, A. C. 18 Multiple comparisons. **Handbook of statistics**.13: 587-630. 1996.
- [30] TARMAN, A.A.; RAMLI, N.N.; RIDLA, M.R.M.; YAMAN, M.A.; SETIYONO, A.A. Effects of organic acids on *Salmonella enteritidis* growth inhibition and ileum surface area in laying ducks fed anaerobically fermented feed. **Poult. Sci.** 16(3): 98-104. 2017.
- [31] TELLEZ, G.; PIXLEY, C.; WOLFENDEN, R.E.; LAYTON, S.L.; HARGIS, B.M. Probiotics direct fed microbials for *Salmonella* control in poultry. **Food. Res. Int.** 45(2): 628-633. 2012.
- [32] TSIRAKI, M.; YEHA, H.; ELOBEID, T.; OSAILI, T.; SAKKAS, H.; SAVVAIDIS, I. Viability of and *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in a delicatessen appetizer (yogurt-based) salad as affected by citrus extract (Citrox©) and storage temperature. **Food. Microbiol.** 69:11-17. 2018.
- [33] VISAUTA, V.B. Análisis Estadístico con SPSS 11.0 para Windows. Estadística Básica. Vol 1. McGraw-Hill. España. 331pp. 2002.
- [34] VÉNICA, C.I.; BERGAMINI, CV.; ZALAZAR, C.A.; PEROTTI, M.C. Effect of Lactose Hydrolysis during Manufacture and Storage of Drinkable Yogurt. **J. Food. Nutr. Disor.** 2 (5):1-7. 2013.
- [35] ZAPATA, I.C.; SEPÚLVEDA-VALENCIA, U.; ROJANO, B.A. Efecto del Tiempo de Almacenamiento sobre las Propiedades Fisicoquímicas, Probióticas y Antioxidantes de Yogurt Saborizado con Mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw). **Inform. Tecnol.** 26(2): 17-28. 2015.