

Bacterias lácticas nativas de interés industrial aisladas a partir de arándanos frescos (*Vaccinium corymbosum*)

Native lactic acid bacteria of industrial interest isolated from fresh blueberries (*Vaccinium corymbosum*)

Silvia Graciela Ortiz¹, Juan Ignacio Tunez², Alicia Gallo¹, Silvia Raffellini¹

1. Universidad Nacional de Luján, Departamento de Tecnología, Ruta 5 y Avenida Constitución, Luján (6700), Argentina.
2. Universidad Nacional de Luján. Departamento de Ciencias Básicas, INEDES-UNLU-CONICET, Ruta 5 y Avenida Constitución, Luján (6700), Argentina.

E-mail: ortiz@mail.unlu.edu.ar

Resumen

Las bacterias lácticas pueden poseer propiedades funcionales de interés para elaboración de alimentos frutales innovadores. El objetivo de este trabajo fue aislar cepas nativas de bacterias lácticas con propiedades de interés industrial, a partir de arándanos frescos. Las cepas se aislaron en MRS agar, se sometieron a identificación preliminar y se determinó: actividad antagonista frente a microorganismos indicadores patógenos e indicadores; resistencia a pH 3; crecimiento ante diferentes temperaturas, sales biliares (1 %) y alta concentración de cloruro de sodio (6,5 %); producción de exopolisacáridos (EPS) y caracterización de metabolitos antimicrobianos extracelulares. Se aislaron 10 cepas caracterizadas preliminarmente como bacterias lácticas, de las cuales la cepa Ar2, identificada por métodos moleculares como perteneciente a la especie *Weissella confusa*, fue la que presentó mayor actividad inhibitoria frente a *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Enteritidis*. Además, resistió pH 3, creció en medio MRS adicionado con sales biliares (1%), produjo EPS y metabolitos extracelulares tipo bacteriocina con efecto anti-*Listeria monocytogenes*. Por consiguiente, la cepa nativa *Weissella confusa* Ar2 podría ser potencialmente aplicada en elaboración de alimentos frutales innovadores ya sea como cultivo bioprotector, probiótico o productor de espesantes naturales.

Palabras clave: Bacterias lácticas, frutas, bioprotección, probióticos, exopolisacáridos.

Abstract

Lactic acid bacteria may have functional properties that can be used for the production of innovative fruit foods. The objective of this work was to isolate native strains of lactic acid bacteria with properties of industrial interest from fresh blueberries. Native strains were isolated on MRS agar and subjected to preliminary identification. Antagonistic activity against pathogenic and indicator microorganisms was determined. Other tests carried out were: resistance to pH 3; growth at different temperatures, bile salts (1%) and high concentration of sodium chloride (6.5%); production of exopolysaccharides (EPS); and characterization of extracellular antimicrobial metabolites. Ten native strains preliminarily characterized as lactic acid bacteria were isolated. The Ar2 strain, identified by molecular methods as *Weissella confusa*, showed the highest inhibitory activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. In addition, it resisted pH 3, grew in MRS medium added with bile salts (1%), produced EPS and extracellular bacteriocin-like metabolites with anti-*Listeria monocytogenes* effect. Consequently, the native lactic strain *Weissella confusa* Ar2 could potentially be applied in the production of innovative fruit foods either as a bioprotective microorganism, as a producer of natural thickeners or as a probiotic culture.

Keywords: Lactic acid bacteria, fruit, bioprotection, probiotics, exopolysaccharides.

1. Introducción

En la actualidad, se percibe por parte de los consumidores un marcado interés por la adopción de dietas saludables, poco procesadas, y con menos

aditivos químicos, por lo que la industria alimentaria necesita buscar alternativas que permitan ofrecer alimentos seguros, pero al mismo tiempo de alta calidad nutritiva y organoléptica. Las sociedades desarrolladas registran un incremento de la población

que, por diferentes causas como intolerancia a la lactosa, alergia a las proteínas de la leche, alto contenido de colesterol o de ácidos grasos saturados, han optado por consumir dietas vegetarianas o veganas (Vijaya Kumar et al., 2015). Las frutas y las hortalizas son esenciales para una dieta equilibrada debido a su contenido de agua, vitamina, minerales, carbohidratos (glucosa y fructosa), fibra, y compuestos bioactivos tales como polifenoles, carotenoides, tocoferoles entre otros, los cuales poseen efectos beneficios comprobados para la salud (Rodríguez et al., 2015; Ayed et al., 2020). Así, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la ingesta de un mínimo de 400 g diarios de frutas y verduras, para prevenir enfermedades crónicas y mitigar varias carencias de micronutrientes (OMS, 2018).

Las frutas pueden ser consumidas frescas, en jugos o néctares, en ensaladas o en variedad de frutas IV GAMA, lavadas, desinfectadas, peladas, cortadas y envasadas, sin embargo, la vida útil de estos alimentos es corta y son susceptibles al deterioro microbiano por su alto contenido de nutrientes y actividad de agua (Rodríguez et al., 2015; Valero, 2018). Asimismo, han estado también involucradas en brotes de enfermedades de transmitidas por alimento (ETA), producidos por distintos microorganismos como por ejemplo *Listeria monocytogenes*, y diferentes serovariedades de *Salmonella enterica* o de *Escherichia coli* (Oliveira et al., 2018; Carstens et al., 2019; EFSA and ECDC, 2021).

Una alternativa para la conservación de estos alimentos es la biopreservación (Ananou et al., 2007), que consiste en la aplicación de microorganismos, como por ejemplo bacterias lácticas (BAL), y/o sus metabolitos para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y deteriorantes (O'Sullivan et al., 2002; Akbar et al., 2016). Las BAL pueden contribuir también al desarrollo de características organolépticas, reológicas y de textura en alimentos innovadores de matriz vegetal debido a la habilidad de algunas cepas de producir exopolisacáridos (EPS) in situ que actúan como bioespesantes naturales. La producción de EPS por BAL está recibiendo creciente atención en los últimos años debido a los posibles efectos benéficos para la salud, en particular la actividad anticancerígena, antitumoral e inmunomoduladora (Behare et al., 2009; Patel et al., 2014). Estos efectos se suman a los ya demostrados en algunas cepas de BAL como por ejemplo la contribución al mantenimiento del equilibrio de la población microbiana en el tracto gastrointestinal o el aumento de la respuesta inmune contra infecciones entre otros, por lo que se las considera bacterias probióticas (Vinderola y Reinheimer, 2003; Fontana et al., 2013).

En general la población de bacterias lácticas en frutas y hortalizas se encuentra en un rango de 10^2 y 10^4 UFC/g y, hasta la fecha, la diversidad de bacterias lácticas en frutas ha sido escasamente estudiada, siendo los géneros frecuentemente reportados *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella* y *Enterococcus* (Di Cagno et al., 2010; Emerenini et al., 2013; Ruiz Rodríguez et al., 2019, Bouzaïene et al., 2019; Linares Morales et al., 2020).

Por otra parte, las frutas constituyen posibles sustratos para la inclusión de microorganismos probióticos, cuyos efectos benéficos se sumarían a las ventajas funcionales que ya de por sí presentan estos alimentos (fuente de micronutrientes, bajo contenido de alérgenos, buena digestibilidad). Además, esta inclusión podría ser una alternativa para aumentar el bajo consumo de vegetales frescos que se observa en países en desarrollo (Bernal Castro et al., 2017).

La combinación de cepas de bacterias lácticas productoras de EPS, de metabolitos antimicrobianos naturales con actividad biológica y con características probióticas, suponen una alternativa a los métodos tradicionales, para la conservación de los parámetros de calidad de alimentos de matriz vegetal, sumado los efectos benéficos que ejercen a la salud. Por consiguiente, el objetivo del siguiente trabajo fue aislar cepas de bacterias lácticas con propiedades de interés industrial a partir de arándanos (*Vaccinium corymbosum*) frescos, que puedan ser empleadas en la elaboración de alimentos innovadores derivados de frutales.

2. Materiales y métodos

Procesamiento de las frutas, aislamiento de bacterias lácticas y conservación de las cepas lácticas

Para el aislamiento de bacterias lácticas a partir de arándanos frescos adquiridos en supermercados, se preparó un homogenato en bolsas plásticas estériles (Whirl-Pack Nasco, EEUU) para lo cual se pesó 20 g del material, se agregó 180 ml de agua peptonada (0,1 %), y posteriormente se homogeneizó en digestor tipo Stomacher (Lab Cima, Argentina) durante 30 segundos a velocidad media. A partir de los homogenatos se realizaron placas de aislamiento en agar MRS (Biokar Diagnostic, Beauvais, Francia) mediante siembra en superficie por agotamiento. Las placas se incubaron 48 h a 37 °C en condiciones de anaerobiosis, al cabo de las cuales se aislaron con pipeta Pasteur las colonias que presentaron morfología típica de bacterias lácticas. Las cepas de bacterias lácticas aisladas se conservaron a -20 °C en caldo MRS adicionado con 15 % de glicerol. Antes de ser empleadas en los ensayos correspondientes, las cepas se inocularon en caldo MRS y se incubaron durante 24 h a 37 °C.

Cepas empleadas como indicadoras de actividad antibacteriana

Las cepas bacterianas empleadas como indicadoras de la actividad antibacteriana en los diferentes ensayos fueron: *Bacillus cereus* MA 130, *Cronobacter sakazakii* MA13, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* O:157 MA 61, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2583, *Salmonella* Enteritidis MA 44 y *Staphylococcus aureus* MA 106, provistas por la colección de cultivos del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad Nacional de Luján; *Listeria innocua* CIP 8011, provista por la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA; y *Listeria monocytogenes* tipo 1 BE 16/96, *Listeria seeligeri* 19/02, *Listeria welshimeri* BE313/01, provistas por el INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Las cepas de bacterias se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en caldo triptona soja (TSB, Biokar, Francia) adicionado con 15 % de glicerina. Antes de ser empleadas en los ensayos las cepas se desarrollaron en TSB y agar triptona soja (TSA, Biokar, Francia) 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Identificación taxonómica preliminar de las cepas lácticas aisladas

Para la identificación taxonómica preliminar de las cepas aisladas se sometieron a las siguientes pruebas: tinción de Gram, catalasa, fermentación de azúcares, diferenciación entre homofermentativas y heterofermentativas.

Caracterización de las cepas lácticas aisladas

Desarrollo a 15, 30, 37 y $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir de cultivos ON, cada una de las cepas se inoculó en caldo MRS y se incubó a 15, 30, 37 y $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 h, al cabo de las cuales se observó en forma cualitativa el desarrollo de turbidez. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Desarrollo en CINa al 6,5 %. A partir de cultivos ON, cada una de las cepas se inoculó en caldo MRS adicionado con 6,5 % de CINa y se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 h al cabo de las cuales se realizó la lectura cualitativa de la turbidez producida. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Producción de exopolisacáridos (EPS). La producción de EPS se determinó sembrando cada cepa, con ansa calibrada (10 μl), en MRS agar suplementado con 5 % de sacarosa (Grosur-Tudor y Zamfir, 2011). Las placas se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 h al cabo de las cuales se observó el desarrollo de colonias mucosas. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Resistencia a sales biliares. La resistencia a la bilis se determinó mediante el método modificado

propuesto por Kociubinski et al. (1999). A partir de cultivos ON, las cepas de bacterias lácticas se sembraron con ansa calibrada (10 μl) en placas de agar MRS adicionado con 1 % de sales biliares (Britania, Argentina) y se incubaron 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para control, las cepas se sembraron también en medio MRS sin adición de sales biliares. Finalizada la incubación se comparó cualitativamente el desarrollo de las cepas en medios con y sin sales biliares adicionadas. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Resistencia a pH ácidos (pH 3). La resistencia a pH 3 de las cepas de bacterias lácticas, se evaluó mediante el método propuesto por Garriga et al. (1998) modificado. A partir de cultivos ON cada una de las cepas se sembraron en tubos de centrifuga con 10 ml de caldo MRS y se incubaron 24 horas; a continuación, se recuperaron las células por centrifugación (5000 rpm, 10 minutos, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), los pellets fueron lavados 2 veces en buffer fosfato salino pH 6,5 (PBS 6,5) y resuspendidos en 10 ml de PBS. De cada cepa se colocó 0,5 ml de suspensión en tubos con 4,5 ml de PBS con pH 3 (pH ajustado con HCl 1 M) y pH 6,5, utilizado como control, que se incubaron 3 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se realizó el recuento de bacterias lácticas por siembra en profundidad en placas con MRS agar al inicio y al final de la exposición. Las placas se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h; a partir del recuento de unidades formadoras de colonias (ufc), se calculó el Índice de Supervivencia (IS) de la población expuesta a pH 3 utilizando la fórmula 1:

$$\text{IS} = \text{Log ufc final} / \text{Log ufc inicial} \quad (1)$$

Donde IS es el índice de supervivencia después de la exposición a pH 3 durante 3 horas; Log ufc final es el logaritmo decimal del número de unidades formadoras de colonias de la población después de haber sido expuesta durante 3 horas a pH 3, y Log ufc inicial es el logaritmo decimal del número de unidades formadoras de colonias de la población al inicio de la exposición.

Determinación de la actividad inhibitoria in vitro de las cepas lácticas aisladas sobre bacterias indicadoras

Para determinar la capacidad inhibitoria de las cepas de bacterias lácticas se utilizó la técnica de estrías cruzadas (González et al., 1995). Las cepas lácticas se sembraron en un arco de las placas de Petri sobre agar MRS y se incubaron 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 y *Salmonella* Enteritidis MA 44, se sembraron en forma de estría perpendicular al cultivo desarrollado de la cepa láctica y las placas se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las longitudes de las zonas de inhibición se midieron con

calibre (en mm) cada 24 h durante 120 h. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Determinación de la producción de metabolitos antimicrobianos extracelulares

Esta determinación se realizó con el extracto libre de células (ELC) del cultivo de la cepa láctica que presentó la mayor actividad inhibitoria sobre bacterias indicadoras en el ensayo de estrías cruzadas. Para la obtención del ELC, la cepa se cultivó 3 veces consecutivas en caldo MRS y se incubó ON a 37 °C. El cultivo obtenido se sembró al 3% en 100 ml de caldo MRS, se incubó a 37 °C durante 16-20 h, al cabo de las cuales el cultivo se centrifugó (6000 rpm 30 minutos a 5 °C en centrífuga Sorvall RC-5B, Alemania), y se concentró el sobrenadante 10 veces con un evaporador rotatorio Büchi RE130 (Suiza) en un baño a 40 °C. Posteriormente el extracto se ajustó a pH 5 con NaOH 3M y se esterilizó por filtración (membrana de 0,22 µm de diámetro de poro, Sartorius, Alemania). Para evaluar la actividad inhibitoria del ELC, se utilizó la técnica de difusión en agar (Benkerroum et al., 1993). Las cepas utilizadas como indicadoras de la actividad antibacteriana se cultivaron en TSB a su respectiva temperatura óptima de crecimiento. Se mezcló 0,5 ml del inóculo con 12 ml TSA que posteriormente se volcó en placas de Petri. Una vez que el agar solidificó, se realizaron pozos con sacabocado estéril (7 mm de diámetro) y en cada uno se colocó 50 µl del ELC a ensayar. Las placas se incubaron 24 h a 37 °C, al cabo de las cuales se midieron los halos de inhibición producidos. Los ensayos se realizaron por triplicado y en todos los casos como testigo se utilizó caldo MRS concentrado acidificado con ácido láctico a pH 5, coincidente con el pH del ELC.

Para la caracterización preliminar de los metabolitos antimicrobianos presentes en el ELC, se evaluó la estabilidad de su actividad biológica frente a la acción de diferentes enzimas y ante la exposición a tratamientos térmicos de alta temperatura. Para esto, el ELC se expuso ante las siguientes enzimas: catalasa, pronasa E, proteasa, pepsina, tripsina. Cada enzima se preparó en una concentración de 1mg/ml, según recomendación del fabricante (Sigma, USA) y luego se esterilizó por filtración (membrana de 0,22 µm de diámetro de poro, Sartorius, Alemania). Posteriormente, se mezclaron 1 ml de las enzimas esterilizadas con 1 ml del ELC (concentración final de la enzima: 0,5 mg/ml), y la mezcla se incubó a 37 °C durante 4 h, al cabo de las cuales se evaluó la persistencia de la capacidad inhibitoria de los ELC por el método de difusión en agar descripto anteriormente, utilizando *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 como bacteria indicadora. Los ensayos se realizaron por triplicado y como testigos se utilizaron la enzima sin el agregado del ELC (blanco de enzima), el ELC sin tratar enzimáticamente y MRS

concentrado (blanco del medio). Para evaluar la persistencia de la actividad antimicrobiana ante tratamientos de altas temperaturas, el ELC (1 ml) se incubó en un baño termostático Vicking Modelo Masson (Argentina) a 100 °C durante 30 minutos. Luego se ensayó la actividad inhibitoria remanente mediante el método de difusión en agar. Como cepa indicadora se empleó *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 y como testigos se utilizaron MRS concentrado (blanco del medio), sometido a los mismos tratamientos que los utilizados para el ensayo, y ELC sin tratar. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Identificación molecular

A partir de un cultivo ON de la cepa láctica aislada de arándanos seleccionada por su alta capacidad inhibitoria, se realizó la extracción del ADN genómico por el método de fenol-cloroformo. Para la amplificación de secuencias específicas del ADN que codifican la fracción 16S rRNA se empleó la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando una mezcla que contenía ADN genómico bacteriano, primers (27F y 518R; 27F: 5'-GAG TTT GAT CMT GGC TCA G-3' Y 518R: 5'-WTT ACC CGC GCT GCT GG-3'), enzima Taq ADN polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y buffer de reacción. El termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient AG 22331 Hamburg Made in Germany) se utilizó con las siguientes condiciones de ciclado: 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg y 72 °C por 5 min. El producto amplificado fue purificado por el método Exo-SAP (Werle et al., 1994) y enviado a un laboratorio externo (Macrogen Inc., Corea del Sur) donde fue secuenciado en ambas direcciones utilizando los mismos primers empleados en la amplificación.

Análisis estadísticos

Los análisis de varianza y de comparaciones múltiples (test de mínimas diferencias significativas de Fisher), empleados para establecer diferencias significativas entre los tratamientos, se realizaron usando el paquete estadístico STATGRAPHICS PLUS (StatPoint Inc., EEUU).

3. Resultados y Discusión

De un total de 13 cepas aisladas de arándanos, 10 cepas presentaron colonias con características morfológicas similares a las de las bacterias lácticas, por reacción de Gram positiva y catalasa negativa. Según la vía fermentativa de la glucosa, las 10 cepas se clasificaron como heterofermentativas. En la Tabla 1 se reseñan las características diferenciales de las cepas de bacterias lácticas aisladas de arándanos.

La temperatura óptima de crecimiento de las bacterias lácticas permite determinar si las bacterias son

mesófilas o termófilas y por lo tanto el uso industrial al que va a ser destinado. Todas las cepas aisladas desarrollaron en caldo MRS a 15, 30 y 37 °C, en cambio a 45 °C no mostraron desarrollo, por lo tanto, se las considera mesófilas.

La resistencia de las cepas de bacterias lácticas a altas concentraciones de NaCl sin perder su capacidad de crecimiento les confiere amplias posibilidades de ser utilizadas en cultivos iniciadores, bioprotectores o probióticos en una amplia variedad de alimentos (Castillo Arroyo et al., 2018). Todas las cepas aisladas de arándanos desarrollaron en caldo MRS adicionado con ClNa (6,5 % p/v), excepto Ar7 y Ar12.

Tabla 1. Características diferenciales de cepas lácticas nativas aislada a partir de arándanos frescos.

Cepas	Morfología microscópica	ClNa 6,5%	EPS	IS pH3
Ar1	Bastones cortos	±	±	0,75
Ar2	Diplococos y cadenas cortas	±	+	0,75
Ar3	Diplococos y cadenas cortas	+	+	0,54
Ar4	Diplococos	±	±	0,70
Ar5	Bastones cortos	±	+	0,43
Ar6	Diplococos y cadenas cortas	+	+	0,50
Ar7	Bastones cortos	-	+	0,52
Ar11	Bastones cortos	±	+	0,38
Ar12	Bastones cortos	-	+	0,41
Ar13	Bastones cortos	±	+	0,65

ClNa 6,5 %: crecimiento en caldo MRS adicionado con ClNa (6,5 % p/v); **EPS:** producción de exopolisacáridos; **IS pH3:** Índice de Supervivencia de cultivos expuestos a pH 3 durante 3 horas a 37 °C, calculado aplicando la fórmula 1.

Las BAL que producen EPS son microorganismos de importancia industrial en el desarrollo de productos alimenticios funcionales y se utilizan como cultivos iniciadores o coadyuvantes para desarrollar alimentos fermentados. En la industria de los alimentos estas bacterias mejoran las características reológicas y desempeñan un papel importante como agentes texturizantes y bioespesantes, debido a la naturaleza hidrocoloidal, gelificante, emulsificante y estabilizante de los EPS que producen. Además, diversos investigadores han señalado una variedad de beneficios para la salud que los EPS pueden proporcionar a los consumidores como, por ejemplo, efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antitumorales, o anticolesterolémicos (Patel et al., 2012; Zannini et al., 2016; Fessard y Remize, 2017; Jin et al., 2019). Las 10 cepas aisladas de arándanos sembradas en MRS agar suplementado con sacarosa

mostraron producción de EPS, si bien difieren en algunas cepas la producción fue moderada (Tabla 1).

En la generación y diseño de un alimento con microorganismos probióticos adicionados, se debe considerar propiedades intrínsecas de la cepa a emplear, como por ejemplo su capacidad de sobrevivir y colonizar en el tracto gastrointestinal, ser tolerante al pH ácido y a la pepsina del estómago, a sales biliares, a pancreatina en la parte superior del intestino, poseer capacidad de adherirse a la mucosa intestinal, entre otras (Havenaar y Huis in't Veld, 1992; Ren et al., 2014). Por este motivo en las cepas lácticas aisladas de arándanos se evaluó su capacidad de supervivencia a pH3 (Tabla 1) y el desarrollo en MRS agarizado adicionado sales biliares. Todas las cepas aisladas desarrollaron en MRS agarizado adicionado con sales biliares, y las cepas Ar 1 y Ar 2 se destacaron significativamente por su elevado Índice de Supervivencia a pH 3 (0,75).

Todas las cepas aisladas de arándanos mostraron capacidad inhibitoria contra las bacterias indicadoras ensayadas (Figura 1). La cepa más inhibitoria fue Ar2 y las especie más inhibidas fueron *Listeria monocytogenes* (24±0,16) y *Salmonella Enteritidis* (24±0,16), seguida por *Escherichia coli* (19,7±0,047).

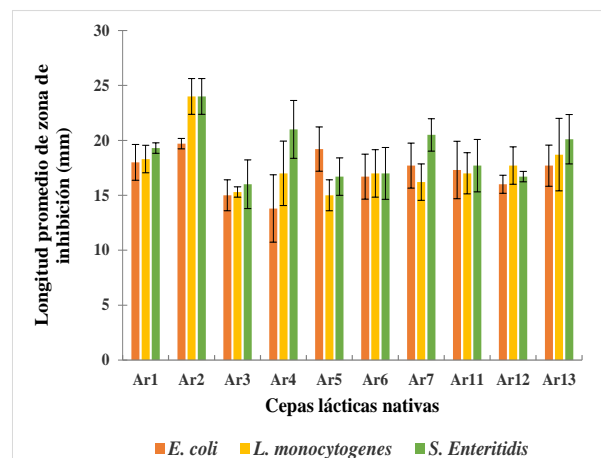


Figura 1. Inhibición producida por cepas aisladas de arándanos sobre *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Enteritidis*.

Debido a que la cepa Ar2 mostró mayor capacidad inhibitoria frente a las cepas indicadoras ensayadas y además, resistió pH 3, sales biliares 1 % y produjo exopolisacáridos (EPS), se seleccionó para los ensayos de determinación de metabolitos extracelulares antimicrobianos y para la identificación taxonómica molecular.

Los resultados obtenidos de la acción inhibitoria del ELC de la cepa Ar2 se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Actividad inhibitoria del ELC de la cepa Ar2 contra bacterias indicadoras y patógenas

Cepas patógenas o indicadoras	Halos de inhibición (mm)
<i>Bacillus cereus</i> MA 130	11,5±0,8
<i>C. sakazakii</i> MA13	11,1±0,2
<i>E. coli</i> ATCC 35218	-
<i>E. coli</i> O:157 MA 61	-
<i>Listeria innocua</i> CIP 8011	10,5±0,5
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	11,7±0,4
<i>L. monocytogenes</i> tipo 1 BE 16/96	11±0,1
<i>Listeria seeligeri</i> 19/02	13,5±0,5
<i>L. welshimeri</i> BE313/01	10,9±0,5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 2583	12,7±0,5
<i>S. Enteritidis</i> MA 44	13,4±0,4
<i>S. aureus</i> MA 106	11,2±0,4

Dado que el ELC de la cepa Ar2 presentó marcada actividad inhibitoria frente a todas las cepas del género *Listeria* ensayadas, se decidió usar *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 como cepa indicadora para la caracterización preliminar de los metabolitos antimicrobianos contenidos en el ELC, debido a que esta especie ha estado involucrada en numerosos brotes de ETA vinculados con el consumo de frutas y hortalizas (CDC, 2012; 2015a; 2015b; 2016a; 2016b; EFSA and ECDC, 2019; EFSA and ECDC 2021).

La actividad inhibitoria de los metabolitos antimicrobianos presentes en el ELC, fue afectada por la acción de enzimas proteolíticas, pero permaneció estable frente a los tratamientos térmicos y la catalasa. Estos resultados sugieren, por consiguiente, que la inhibición observada no es debida a la producción de peróxido de hidrógeno, y que la cepa Ar2 produciría una sustancia proteica termorresistente del tipo bacteriocina con efecto inhibitorio frente a *Listeria monocytogenes*.

De acuerdo con el resultado de la identificación molecular de (amplificación por PCR de fragmentos de aproximadamente 500 pb de gen que codifica la fracción 16S rRNA y posterior secuenciación) la cepa nativa Ar2, seleccionada para su uso como bioconservante, probiótico o espesante, se identificó como perteneciente a la especie *Weissella confusa*, con 99 % de similitud.

Las propiedades observadas en la cepa nativa *Weissella confusa* Ar2 son comparables con los obtenidos por otros investigadores con otras cepas del mismo género o especie. La actividad antimicrobiana es una propiedad importante para que una cepa pueda ser utilizada como probiótica. *Weissella confusa* Ar2, inhibió el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativa: estos resultados son similares a los

reportados por Trias et al. (2008) que encontraron que dos cepas de *Weissella cibaria* aisladas de acelga y tomates, inhibieron microorganismos patógenos asociados con frutas y vegetales frescos, o por Serna et al. (2010) quienes reportaron actividad antimicrobiana de una cepa de *Weissella confusa* contra cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*.

Con respecto a la producción de EPS observada en *W. confusa* Ar2, se destaca que esta propiedad ha sido también observada con cepas de la misma especie aisladas por otros investigadores (Jin et al., 2019), y lo mismo ocurre con respecto a la capacidad de crecer con altas concentraciones de cloruro de sodio (Lee et al., 2012).

Por último, con respecto a la potencialidad de cepas de *W. confusa* para ser empleadas como probióticas, los resultados obtenidos en este trabajo son comparables, en lo referente a la supervivencia a pH 3,0 y resistencia a las sales biliares, a los presentados por Lee et al. (2012) y Wang et al. (2020), con cepas aisladas a partir de heces, o por Ayeni et al. (2011) y Sharma et al. (2018), con cepas aisladas a partir de alimentos fermentados.

4. Conclusiones

En este trabajo se aislaron diferentes cepas autóctonas de bacterias lácticas a partir de arándanos. Se identificó por método molecular a *Weissella confusa* Ar2, cepa productora de exopolisacáridos, con alta capacidad inhibitoria de diversos microorganismos patógenos, que resistió pH 3 y sales biliares y que puede crecer con elevada concentración de ClNa. Además, los ELC de *W. confusa* Ar2 tuvieron efecto inhibitorio contra *Listeria* spp. y las cepas específicas testeadas de *Bacillus cereus*, *Cronobacter sakazakii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Enteritidis y *Staphylococcus aureus*. La capacidad inhibitoria observada contra *Listeria monocytogenes* es debida aparentemente a sustancias de naturaleza proteica termorresistentes, tipo bacteriocina. Estos resultados justifican evaluaciones adicionales de *W. confusa* Ar2 para su potencial uso en la industria alimentaria, ya sea como bioprotectora, como probiótica o como productora de bioespesantes naturales.

5. Referencias

- Akbar, A.; Ali, I.; Anal, A. K. (2016). *Industrial perspectives of lactic acid bacteria for biopreservation and food safety*, The Journal of Animal & Plant Sciences, 26 (4), 938-948.
- Ananou, S.; Maqueda, M.; Martínez-Bueno, M.; Valdivia, E. (2007). *Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods*.

- En Méndez-Vilas, A. (Ed.) Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, Vol. 1. Ed. Formatex, España.
- Ayed, L.; M'hir, S.; Hamdi, M. (2020). *Microbiological, biochemical, and functional aspect of fermented vegetable and fruit beverages*, Journal of Chemistry 2020, 1-12.
- Ayeni, F. A.; Sánchez, B.; Adeniyi, B. A.; Reyes-Gavilán, C.G.; Margolles, A.; Ruas-Madiedo, P. (2011). *Evaluation of the functional potential of Weissella and Lactobacillus isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine*, International Journal of Food Microbiology 147, 97-104.
- Behare, P.V.; Singh, R.; Kumar, M.; Prajapati, J. B.; Singh, R. P. (2009). *Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: A review*, Journal Food Science Technology 46, 1-11.
- Benkerroum, N.; Ghouati, Y.; Sandine, W.E.; Tantaoui-Elar, A. (1993). *Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins*, Letters in Applied Microbiology, 17, 78-81.
- Bernal Castro, C.A.; Díaz Moreno, C.; Gutiérrez Cortés, C. (2017). *Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas*, Revista Chilena de Nutrición 44 (4), 383-392.
- Bouzaiane, T.; Lasram, S.; Ziadi, M.; Hadda-Imen, O.; Zohra, H.; Hamdi, M. (2019). *Isolation of lactic acid bacteria from grape fruit: antifungal activities, probiotic properties, and in vitro detoxification of ochratoxin A*, Annals of Microbiology 69, 17-27.
- Carstens, C.K.; Salazar, J.K.; Darkoh, C. (2019). *Multistate outbreaks of foodborne illness in the United States associated with fresh produce from 2010 to 2017*, Frontiers in Microbiology 10, 2667.
- Castillo Arroyo, P.L.; Betancur Hurtado, C.A.; Pardo Pérez, E. (2018). *Caracterización de microorganismos con potencial probiótico aislados de estiércol de terneros Brahman en Sucre, Colombia*, Revista de Investigaciones Veterinarias de Perú 29 (2), 438-448.
- CDC (2012). *Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado* (Final Update). Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html>. Fecha de consulta: 6/10/2021.
- CDC. (2015a). *Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Commercially Produced, Prepackaged Caramel Apples Made from Bidart Bros. Apples* (Final Update). Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/caramel-apples-12-14/index.html>. Fecha de consulta: 6/10/2021.
- CDC (2015b). *Wholesome Soy Products, Inc. Sprouts and Investigation of Human Listeriosis Cases* (Final Update) Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bean-sprouts-11-14/index.html>. Fecha de consulta: 6/10/2021.
- CDC (2016a). *Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Frozen Vegetables* (Final Update) Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/frozen-vegetables-05-16/index.html>. Fecha de consulta: 6/10/2021.
- CDC (2016b). *Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Packaged Salads Produced at Springfield, Ohio Dole Processing Facility* (Final Update) Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html>. Fecha de consulta: 6/10/2021.
- Di Cagno, R.; Cardinali, G.; Minervini, G.; Antonielli, L.; Rizzello, C. G.; and Ricciuti, P.; Gobbetti, M. (2010). *Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (Ananas comosus L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing*. Food Microbiology 27: 381-389.
- EFSA and ECDC. (2019). *The European Union One Health 2018 Zoonoses Report*. Disponible en: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2019.5926>. Fecha de consulta: 5/10/2021.
- EFSA and ECDC. (2021). *Multi-country outbreak of Salmonella Braenderup ST22, presumed to be linked to imported melons*, Disponible en: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/ROA_S_Braenderup-ST22_UI-719_2021.pdf. Fecha de consulta: 27/10/2021.
- Emerenini, E., Afolabi, O.; Okolie, P.; Akintokun, A. (2013). *Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from fresh fruits and vegetables using nested PCR analysis*, British Microbiology Research Journal 3 (3), 368-377.
- Fessard, A.; Remize, F. (2017). *Why Are Weissella spp. Not Used as Commercial Starter Cultures for Food Fermentation?*, Fermentation 3 (3), 1- 31.
- Fontana, L.; Bermudez-Brito, M.; Plaza-Diaz, J.; Muñoz-Quezada, S.; Gil, A. (2013). *Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics*, British Journal of Nutrition 109, S35-S50.
- Garriga, M.; Pascual, M.; Monfort, JM.; Hugas, M. (1998). *Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts*, Journal of Applied Microbiology 84, 125-132.
- González, F.; Mans M., Raffellini S., Fantuzzi L. (1995). *Preliminary test on the inhibitory effect of Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum isolated from raw milk on Gram negative*

- psychrotrophic bacteria*, *Microbiologie, Aliments, Nutrition* 13 (1), 55-59.
- Grosur-Tudor, S.S.; Zamfir M. (2011). *Isolation and characterization of lactic bacteria from romanian fermented vegetables*, *Romanian Biotechnological Letters* 16, 148-154.
- Havenaar R.; Huis in't Veld J. H. J. (1992). *Probiotics: A general view*. In: *The lactic acid bacteria in health & Disease*, BJB Wood (Ed.) Elsevier Applied Science, London.
- Jin, H.; Jeong, Y.; Yoo, S-H.; Johnston TV.; Ku, S., Ji, G.E. (2019). *Isolation and characterization of high exopolysaccharide-producing Weissella confuse VP30 from young children's feces*, *Microbial Cell Factories* 18 (110), 1-13.
- Kociubinski, G.; Pérez, P.; De Antoni, G. (1999). *Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacterial*, *Journal Food Protection* 62, 905-912.
- Lee, K.W.; Park, J.Y.; Jeong, H. R., Heo, H. J., Hand, N. S., Kim J.H. (2012). *Probiotic properties of Weissella strains isolated from human faeces*, *Anaerobe* 1 (1), 96-102.
- Linares-Morales, J.R.; Cuellar-Nevárez, G.E.; Rivera-Chavira, B.E.; Gutiérrez-Méndez, N.; Pérez-Vega, S.B. Nevárez-Moorillón, G.V. (2020). *Selection of lactic acid bacteria isolated from fresh fruits and vegetables based on their antimicrobial and enzymatic activities*, *Foods* 9 (10), 1399: 1-14.
- Oliveira Elias, S.; Tombini Decol, L.; Tondo, C.E. (2018). *Foodborne outbreaks in Brazil associated with fruits and vegetables: 2008 through 2014*, *Food Quality and Safety* 2, 173-181.
- OMS. (2018). *Alimentación sana*. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>. Fecha de consulta: 15/10/2021.
- O'Sullivan, L.; Ross, R.; Hill, C. (2002). *Potencial of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality*, *Biochimie* 84, 593-604.
- Patel, A.; Prajapati, J.B.; Holst, O., Ljungh, A. (2014). *Determining probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from vegetables and traditional Indian fermented food products*, *Food Bioscience* 5, 27-33.
- Patel, S.; Majumder, A.; Goyal, A. (2012). *Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria*, *Indian Journal Microbiology* 52, 3-12.
- Ren, D.; y otros trece autores (2014). *In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of Lactobacillus strains isolated from fermented food and human intestine*, *Anaerobe* 30: 1-10.
- Rodriguez, S. del C.; Gutierrez, D.R.; Sgroppo, Y.S.C. (2015). *Productos vegetales IV GAMA*, *Aspectos generales*, *Simiente* 85 (1-2), 1-12.
- Ruiz Rodríguez, L.G.; L.; Bleckwedel, J.; Medina, R.; De Vuyst, L.; Hebert, ME.; Mozzi, F. (2019). *Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in northern Argentina*, *Frontiers in Microbiology* 10, 1-26.
- Sharma, S.; Kandasamy, S.; Kavita, D.; Shetty, P.H. (2018). *Probiotic characterization and antioxidant properties of Weissella confuse KR780676, isolated from an Indian fermented food*, *LWT* 97, 53-60.
- Serna Cock, L.; Valencia L.; Campos, R. (2010). *Cinética de fermentación y acción antimicrobiana de Weissella confuse contra Staphylococcus aureus y Streptococcus agalactiae*, *Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad Antioquia* 55, 55-65.
- Trias, R.; Bañeras, L.; Badosa, E.; Montesino, E. (2008). *Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria*, *International Journal of Food Microbiology* 123, 50-60.
- Valero, D. (2018). *Frutas y hortalizas mínimamente procesadas o de IV Gama: cambios en los compuestos bioactivos*. *Horticultura*. Disponible en: <https://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/216797-Frutas-y-hortalizas-minimamente-procesadas-o-de-IV-Gama-cambios-en-compuestos-bioactivos.html>. Fecha de consulta: 15/10/2020.
- Vijaya Kumar, B.; Vijayendra, SVN.; Reddy, OVS. (2015). *Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review*, *Journal Food Science Technology* 52, 6112-6124.
- Vinderola, C.G.; Reinheimer, J.A. (2003). *Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological barrier resistance*, *Food Research International* 36, 895-904.
- Wang, W.; Liu, W.; Chu, W. (2020). *Isolation and preliminary screening of potentially probiotic Weissella confuse strains from healthy human feces by culturomics*, *Microbial Pathogenesis* 147, 1-7.
- Werle, E.; Schneider, C.; Renner, M.; Völker, M.; Fiehn, W. (1994). *Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing*, *Nucleic Acids Research* 22 (20), 4354-4355.
- Zannini, E.; Waters, D.M.; Coffey, A.; Arent, E. (2016). *Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (3), 1121-1135.