

ID 1057 ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO EN EL CULTIVO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS SOBRE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *ASPERGILLUS CARBONARIUS*

Rubén Espinosa Salgado^a, Karen Solares-Avila^a, Isabelle Gaïme-Perraud^b,
Gabriela M. Rodríguez Serrano^a, Gerardo Saucedo Castañeda^a

saucedo@xanum.uam.mx

^aDepto. de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa,

^bInstitut de Recherche pour le Développement (IRD), Francia.

Resumen

Las bacterias ácido lácticas (BAL), son ampliamente utilizadas en la industria alimentos; poseen la capacidad de inhibir el crecimiento y desarrollo de patógenos. El medio de cultivo comúnmente utilizado para el cultivo de BAL es el MRS (Man Rogosa Sharpe), una de las fuentes de nitrógeno: el extracto de levadura está asociado a la producción de compuestos con capacidad antifúngica. En este trabajo se evaluaron 3 concentraciones (2.5, 5 y 7 g/l) de extracto de levadura sobre la capacidad antifúngica de dos cepas de bacterias ácido lácticas (BAL 7 y BAL 031) para inhibir el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* DO162 y DO089 provenientes de Costa de Marfil. El efecto se determinó midiendo el crecimiento radial del hongo en cajas Petri utilizando la técnica de cultivos envenenados empleando agar Czapeck-Extracto de Levadura (CYA).

Se determinó que el extracto de levadura no tiene un efecto significativo sobre la inhibición del crecimiento del hongo, por lo que podría ser retirado del medio de cultivo en la producción de compuestos antifúngicos.

Introducción

Los consumidores son cada vez más conscientes de la calidad sanitaria de sus alimentos y están interesados en las prácticas de producción, transformación y comercialización. Se han reportado pérdidas económicas de hasta el 25% de alimentos [1] con la contaminación por micotoxinas.

Uno de los factores que influyen en la contaminación de alimentos es la presencia de hongos productores de micotoxinas dentro de las cuales se encuentran: aflatoxinas, tricotecenos, fumonisinas, patulina y ocratoxinas [2].

La ocratoxina tipo A (OTA) puede tener efectos nefrotóxicos, embriotóxicos y teratógenicos [3]. y está clasificada dentro del grupo 2B por la Agencia Internacional para la investigación del cáncer como posible carcinógeno humano [4]. La exposición de OTA de un adulto está dado por: 44% cereales, 15% otros, 10% vino, 9% café, 7% cerveza, 5% cacao, 4% frutos secos, 3% carne y 3% especias [5].

Aspergillus carbonarius es el principal responsable de contaminación por OTA de uvas, *Aspergillus alliaceus* en higos, *A. ochraceus* y *A. carbonarius* por contaminación en granos de café verdes [6].

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son productoras de un conservador natural, el ácido láctico y de otros compuestos por lo que han sido usadas como agentes de biocontrol en la industria alimentaria, con el fin de reducir el consumo de sustancias provenientes de la síntesis química [7]; por dicha razón el control biológico de hongos productores de OTA, empleando BAL, es una alternativa para evitar su desarrollo. Se han reportado diversos compuestos antifúngicos (péptidos, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, compuestos de bajo peso molecular) producidos por bacterias ácido lácticas, cada uno de ellos con mecanismos de acción distinta de acuerdo a su naturaleza química.

El medio de cultivo utilizado para el cultivo de bacterias ácido lácticas es el medio MRS (Man Rogosa Sharpe). Se ha reportado que algunos factores nutricionales modulan la producción de compuestos antimicrobianos, variaciones en las concentraciones de extracto de levadura, glucosa, así como CaCl₂ y

NaCl tienen un efecto sobre la capacidad antifúngica [8]. En el caso del extracto de levadura se observa una inhibición óptima en *Lb rhamnosus* y *P. acidilactici* al utilizar una concentración de 1.5% en el medio de cultivo [9].

En el presente trabajo se evaluó la capacidad antifúngica de dos bacterias ácido lácticas: una proveniente de Costa de Marfil (BAL 031) y la otra de México (BAL 007), sobre dos cepas de *Aspergillus carbonarius* (DO089 y DO162) modificando las concentraciones del extracto de levadura en el medio MRS mediante pruebas de inhibición del crecimiento radial del hongo.

Metodología

La activación de las BAL 031 y 007 se realizó a partir de criotubos con las BAL conservadas en glicerol inoculando 50 µl del criotubo en 9 ml de medio MRS incubando 24 h a 30 °C. Posteriormente, se realizó una primera resiembra tomando 1 ml del cultivo de activación y 9 ml de medio MRS estéril con diferentes concentraciones de extracto de levadura (0, 2.5, 5, y 7 g/l) incubando durante 24 h a 30 °C.

Se llevó a cabo una segunda resiembra en botellas serológicas colocando 2.8 ml de la primer resiembra y 25 ml de medio de cultivo con las diferentes concentraciones de extracto de levadura, el cultivo fue incubado durante 96 h a 30 °C en condiciones anaerobias.

Se obtuvieron los extractos libres de células centrifugando los caldos de fermentación en tubos cónicos para centrifuga de 50 ml estériles a 3500 rpm durante 15 min a 10 °C y filtrando en membranas de nylon estériles de 0.45 µm.

Por otro lado, la activación de *Aspergillus carbonarius* DO162 y DO089 se hizo inoculando 50 µl de un conservado de esporas en glicerol en un matraz con 30 ml de Papa Dextrosa Agar (PDA) y se incubó durante 7 días a 30 °C, posteriormente se realizó el raspado de esporas con una solución de Tween 80 al 0.1 % (v/v).

Se realizó una primera resiembra colocando 500 µL de la suspensión de esporas del periodo de activación en un matraz con 30 mL de medio PDA estéril e incubar durante 7 días a 30 °C, después se agregaron 20 ml de solución de Tween 80 al 0.1% v/v estéril y se desprendieron las esporas con un agitador magnético estéril.

El conteo de esporas se realizó con ayuda de una cámara de Neubauer y se ajustó la concentración con Tween 80 al 0.1% (v/v) estéril para obtener una suspensión de 1×10^6 esporas/mL que fue utilizada para realizar las pruebas de inhibición.

Las pruebas de inhibición se realizaron mediante la técnica de cultivos envenenados [10] para ello se preparó medio CYA mezclándolo con 50 % (v/v) del extracto libre de células del cultivo de BAL de cada nivel de la concentración del extracto de levadura y se vertieron 15 ml de la mezcla en cajas Petri de 90x90, una vez solidificado en el centro de las cajas se hicieron perforaciones con puntas para micropipeta estériles de 1 ml formando pozos de 8 mm de diámetro donde se colocaron 100 µl de la suspensión de esporas de *Aspergillus carbonarius* con 1×10^6 esporas/ml.

El halo de crecimiento radial se midió cada 24 h con un vernier y se determinó la actividad fungistática del extracto libre de células conforme a la siguiente fórmula:

$$I = \frac{(K - A)}{K} \times 100$$

Donde:

I: porcentaje de inhibición

K: Diametro de la colonia de hongo en la caja Petri control

A: Diametro de la colonia del tratamiento experimental

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) mediante el software PASW Statistic 18 utilizando prueba de Tuckey con nivel de significancia de 0.05.

Resultados

No se obtuvo diferencia significativa entre los tratamientos (Figura 1), después de realizar el análisis a través de una prueba de ANOVA y comparación de medias con prueba de Tuckey con una significancia de 0.05, los resultados indican que se obtiene una respuesta similar sobre el efecto antifúngico de las diferentes concentraciones de extracto de levadura probadas, indicando que podría ser omitido en el medio de cultivo de las BAL 007 y 031, obteniendo una inhibición de $62.5 \pm 6.2\%$.

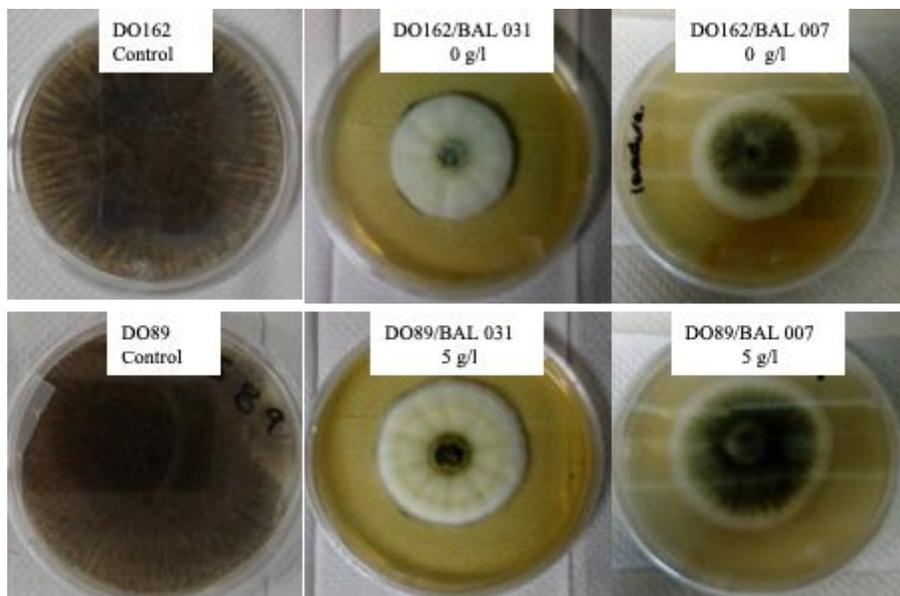


Figura 1. Actividad fungistática del extracto libre de células de BAL 031 y 007 sobre *A. carbonarius* DO162 y DO089

En la Figura 2, se observa que al utilizar 7 g/l se presenta una tendencia de disminución de la capacidad antifúngica, probablemente se deba a que con concentraciones superiores a 5 g/l se produzca una inhibición en el crecimiento de las BAL [11] y de igual manera disminuya la producción de compuestos antifúngicos.

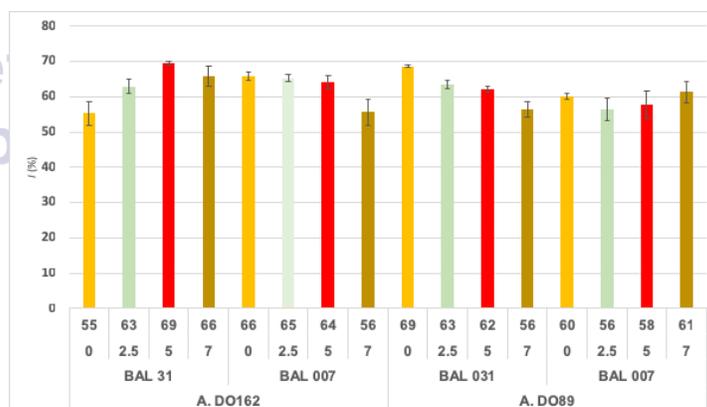


Figura 2. Efecto sobre la inhibición del extracto libre de células de BAL a diferentes concentraciones de extracto de levadura sobre *A. carbonarius* DO162 y DO089.

Conclusiones

La concentración del extracto de levadura no tiene un efecto significativo sobre la inhibición de las dos cepas de *Aspergillus carbonarius* con las cepas de BAL evaluadas, por lo que este compuesto podría ser eliminado o reemplazado del medio de cultivo, debido a su alto costo y a que no afecta la capacidad de inhibición del extracto libre de células.

Agradecimientos. Este trabajo contó con el apoyo de CONACYT a través de la beca No 458769 y el proyecto FONCICYT 273656: "Use of lactic acid bacteria for the control of level of ochratoxin in coffee beans"

Referencias

1. Spadaro, D.; Gullino, M.L. "State of the art and future prospects of biological control of postharvest fruit diseases". *International Journal of Food Microbiology*, v.91, n.2, p.185-194, 2004.
2. Djossou, O., Perraud-Gaime, I., Lakhal, F., Rodriguez-Serrano, G., Karou, G., Niamke, S., Roussos, S., "Anaerobe Robusta coffee beans post-harvest micro flora: *Lactobacillus plantarum* sp as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*", *Anaerobe*, Vol 17 No 6, p. 267-272, 2011.
3. Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Silva, C. F., Cirillo, M., Varga, E. A., & Schwan, R. F. "Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods". *Food control*, 20(9), 784-790, 2009.
4. Bui-Klimke, T. R., & Wu, F. "Ochratoxin A and human health risk: A review of the evidence", *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(13), 1860-1869, 2015.
5. Heussner, A., & Bingle, L. "Comparative ochratoxin toxicity: A review of the available data". *Toxins*, 7(10), 4253-4282, 2015.
6. Abrunhosa, L., Costa, M., Areias, F., Venâncio, A., & Proença, F. "Antifungal activity of a novel chromene dimer", *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(12), 787-792, 2007.
7. Prema, P., Smila, D., Palavesam, A., & Immanuel, G. "Production and characterization of an antifungal compound (3-phenyllactic acid) produced by *Lactobacillus plantarum* strain", *Food and Bioprocess Technology*, 3(3), 379-386, 2010.
8. Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., & Richard-Forget, F., "Lactic acid bacteria–Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review". *Food control*, Vol. 21 No. 4, p. 370-380, 2010.
9. Effat, B. A., Ibrahim, G. A., Tawfik, N. F., & Sharaf, O. M. "Comparison of antifungal activity of metabolites from *Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus acidilactici* and *Propionibacterium thoenii*". *Egyptian Journal of Dairy Sciences*, 29, 251–262, 2001.
10. Abrunhosa, L., Costa, M., Areias, F., Venâncio, A., & Proença, F. "Antifungal activity of a novel chromene dimer". *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 34(12), 787-792, 2007.
11. Oh, S., Rheem, S., Sim, J., Kim, S., & Baek, Y. "Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in tryptone-yeast extract-glucose medium by using response surface methodology". *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(11), 3809-3814, 1995.

Retos de la ingeniería química
para el desarrollo nacional

AMIDIQ

Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.

AVANCES EN INGENIERÍA QUÍMICA

Vol.1, No. 1



**Retos de la ingeniería química
para el desarrollo nacional**

7 al 10 de mayo de 2019, Bahías de Huatulco, Oaxaca, México.

MEMORIAS DEL XL ENCUENTRO NACIONAL DE LA AMIDIQ

AVANCES EN INGENIERÍA QUÍMICA

Vol. 1, No. 1

XL ENCUENTRO NACIONAL
DE LA AMIDIQ



**“RETOS DE LA INGENIERÍA QUÍMICA PARA
EL DESARROLLO NACIONAL”**

Retos de la ingeniería química
para el desarrollo nacional

Memorias del XL Encuentro Nacional de la AMIDIQ

Bahías de Huatulco, Oaxaca, México

07 al 10 de Mayo de 2019

AVANCES EN INGENIERÍA QUÍMICA, Vol. 1. No. 1, octubre 2020, es una publicación anual de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. Canarias 704, Col. Portales, Delegación Benito Juárez, C.P. 03300, Ciudad de México, México. Tel. 3338464060. Página electrónica de la publicación: <https://amidiq.com/avances-en-ingenieria-quimica/> y dirección electrónica: avancesiq@amidiq.com. Editor responsable: Dr. Jorge Ramón Robledo Ortiz. Certificado de Reserva de Derechos al Uso Exclusivo de Título *En Proceso*, ISSN *En Proceso*, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsables de la última actualización de este número: Dr. Miguel Ángel Morales Cabrera, Dra. María del Rosario Enríquez Rosado, Dr. Jorge Ramón Robledo Ortiz, Dra. Nelly Ramírez Corona, Dr. Adrián Bonilla Petriciolet, Dr. Fernando Israel Gómez Castro, Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. Canarias 704, Col. Portales, Delegación Benito Juárez, C.P. 03300, Ciudad de México, México. Fecha de última actualización: 31 de octubre de 2020. Tamaño del archivo: 138 MB.