

DOI:10.18684/BSAA(13)57-66

## CRECIMIENTO DE *L. plantarum* y EFECTO SOBRE *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. perfringens*, y *S. aureus*

## GROWTH OF *L. plantarum* AND EFFECT ON *E.* *coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* AND *C. perfringens*

## CRESCIMENTO DO *L. plantarum* E EFEITO SOBRE *E.coli*, *S.typhimurium*, *S.aureus* *C.perfringens*

HENRY JURADO-GÁMEZ<sup>1</sup>, VERÓNICA JARRÍN-JARRÍN<sup>2</sup>, JOHN PARREÑO-SALAS<sup>3</sup>

### RESUMEN

*El objetivo fue determinar el efecto probiótico de Lactobacillus plantarum sobre Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Clostridium perfringens y Staphylococcus aureus. Se realizó antibiograma; inhibición in vitro y su sobrenadante; viabilidad a bilis y sales biliares, pH (2,5; 4,5 y 7) y temperatura (38 y 45°C); cinética de crecimiento de L. plantarum; además, análisis de péptidos y ácidos orgánicos por HPLC. Se observó susceptibilidad de Dicloxacilina, Ciprofloxacina y Penicilina para L. plantarum; Cefalotina para C. perfringens; Cefepime y Ciprofloxacina para S. typhimurium; Cefepime para E. coli; y Cefepime y Cefalotina para S. aureus. La bacteria láctica inhibió las cepas patógenas pero su sobrenadante no inhibió a C. perfringens. L. plantarum mostró crecimientos de 32,25 y 32,38 LN UFC/mL para 1 y 1,2% de bilis. 28,73, 28,59 y 28,02 LN UFC/mL para pH 2,5; 4,5 y 7. 31,58 y 31,03 UFC/mL para 38 y 45°C. La fase logarítmica se observó a las 12:00 horas (32,04 UFC/mL, 4,85 pH, 0,84 acidez, 4,79 mg/L de azúcares, 1,59 mg/L de proteína); identificándose los péptidos VAR-TIR-VAL y Metionina Enkefalina Acetato,*

**Recibido para evaluación:** 9 de marzo de 2015. **Aprobado para publicación:** 10 de agosto de 2015

- 1 Universidad de Nariño, Facultad de ciencias pecuarias, Departamento de producción y procesamiento animal, Programa de Zootecnia, Grupo de investigación FISE-PROBIOTEC. Ph. D. Ingeniería de alimentos. Pasto, Colombia.
- 2 Universidad de Nariño, Facultad de Agroindustria, Programa de Agroindustria. M. Sc. Producción animal. Pasto, Colombia.
- 3 Universidad de Nariño; Grupo de investigación FISE-PROBIOTEC. Zootecnista. Pasto, Colombia.

**Correspondencia:** henryjugam@gmail.com

y 74,20% de ácido láctico en sobrenadante. Se concluye que *L. plantarum* posee características probióticas.

## ABSTRACT

*The objective was to determine the effect of probiotic Lactobacillus plantarum on Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Clostridium perfringens and Staphylococcus aureus. Susceptibility testing was performed; inhibition in vitro and supernatant; viability bile and bile salts, pH (2,5; 4,5 and 7) and temperature (38 and 45°C); growth kinetics of L. plantarum; Additional analysis of peptides and organic acids by HPLC. Dicloxacillin, ciprofloxacin and penicillin susceptibility was observed for L. plantarum; Cephalothin to C. perfringens; Cefepime and ciprofloxacin for S. typhimurium; Cefepime for E. coli; and Cefepime and Cephalothin for S. aureus. Lactic bacteria inhibited pathogenic strains but did not inhibit supernatant C. perfringens. L. plantarum showed growth of 32,25 and 32,38 LN CFU/mL for 1 to 1,2% bile. 28,73, 28,59 and 28,02 LN CFU/mL to pH 2,5; 7. 4,5 and 31,58 and 31,03 CFU/mL for 38 and 45°C. The logarithmic phase was observed at 12:00 hours (32,04 CFU/mL, 4,85 pH, acidity 0,84, 4,79 mg/L of sugar, 1,59 mg/L of protein); identifying the VAR-TIR-VAL and methionine enkephalin Acetate peptides, and 74,20% of lactic acid in supernatant. We conclude that L. plantarum has probiotic characteristics.*

## RESUMO

*O objetivo foi determinar o efeito de Lactobacillus plantarum, na Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Clostridium perfringens e Staphylococcus aureus. Foi realizado teste de sensibilidade; inibição vitro e no sobrenadante; biliar viabilidade e sais de biliar, do pH (2,5; 4,5 e 7) e temperatura (38 e 45°C); cinética de crescimento de L. Plantarum; Análise adicional dos péptidos e ácidos orgânicos por HPLC. E observou susceptibilidade dicloxacilina, ciprofloxacina e penicilina para L. plantarum; Cefalotina para C. perfringens; Cefepime e ciprofloxacina para S. typhimurium; cefepime por E. coli; e cefepime e cefalotina para S. aureus. As bactérias lácticas inibida estirpes patogênicas mas não inibiu sobrenadante C. Perfringens. L. plantarum mostrou crescimento de 32,25 e 32,38 LN CFU/mL para 1 a 1,2% biliar. 28,73, 28,59 e 28,02 LN CFU/mL a pH 2,5, 4,5 e 7. E 31,58 e 31,03 UFC/mL para 38 e 45°C. A fase logarítmica foi observada às 12:00 horas (32,04 UFC/mL, 4,85 de pH, acidez 0,84, 4,79 mg/L de açúcar, 1,59 mg/L de proteína); identificar o VAR-TIR-VAL e péptidos de metionina encefalina etilo, e 74.20% de ácido láctico no sobrenadante. Conclui-se que o L. plantarum tem características probióticas.*

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) se conocen como agentes que previenen trastornos digestivos y enfermedades; y su administración por vía oral es efectiva en el control de microorganismos gran negativos [1]. El efecto de inhibición de la bacteria se debe a factores como: reducción del pH, producción

## PALABRAS CLAVE:

Probiótico, Crecimiento, Antagonismo, Patógeno.

## KEYWORDS:

Probiotic, Growth, Pathogenic, Bacterium.

## PALAVRAS-CHAVE:

Probiótico, Crecimiento, Patógeno. Antagonismo.

de ácidos orgánicos, producción de biocinas y buena capacidad de adherencia a la mucosa intestinal de los mamíferos que le permite competir por espacio [2].

La principal biocina producida por *L. plantarum* es la plantaricina, este compuesto proteínico ha demostrado reducir poblaciones bacterianas presentes en el medio, especialmente bacterias patógenas como *Listeria sp.* Además, la bacteria láctica muestra otros beneficios en el huésped, como es el descenso de los niveles de colesterol [3, 4].

*E. coli*, *S. typhimurium*, *C. perfringens* y *S. aureus* son bacterias que producen cuadros clínicos complicados en el hombre y otros mamíferos [5]. Algunos de ellos son importantes transmisores de enfermedades a nivel alimentario, con gran variedad de síntomas clínicos y grados de severidad [6]. El tratamiento de enfermedades producidas por estos microorganismos se realiza mediante antibióticos; sin embargo, el uso indiscriminado ha generado resistencia bacterial que dificulta el control de estos microorganismos [7].

La presente investigación busca determinar el efecto probiótico de *L. plantarum* sobre *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. perfringens* y *S. aureus* en condiciones *in vitro*.

## MÉTODO

Las cepas utilizadas fueron *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC® 25241, *Clostridium perfringens* ATCC® 13124 y *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923.

La reconstitución de cada cepa se efectuó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para su conservación se realizó repique en medio sólido y líquido cada 5 y 8 días respectivamente, se usaron medios MRS para la cepa láctica, mientras que para las cepas patógenas se usó caldo BHI como medio líquido y como medio sólido agar McConkey para *E. coli*, agar XLD para *S. typhimurium*, agar SPS para *C. perfringens* y agar Baird Parker para *S. aureus*. Las cepas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas, luego, refrigeradas a 4°C hasta su utilización.

Para obtener el inóculo de *L. plantarum* se tomó un Erlenmeyer y se depositaron 40 mL de caldo MRS estéril, en este se colocó una alícuota de la cepa láctica y se incubó a 35°C por 24 horas, al terminar el periodo

de incubación se tomaron 4 mL del Erlenmeyer y se depositaron en otros 40 mL de caldo MRS, este último se incubó en las condiciones mencionadas anteriormente. El ajuste del inóculo se realizó mediante la metodología propuesta por Crueger y Crueger [8], para ello se tomó 90 mL de caldo MRS estéril y se adicionó 10 mL de *L. plantarum* de acuerdo con la regla; luego de incubado se tomó 1 mL y se realizó lectura directa en espectrofotómetro a 625 nm. En los casos donde la población fue superior a la establecida se adicionó caldo estéril [9,10].

Los cálculos realizados fueron:

Escala MacFarland 0,125 lectura = 0,800

$$V1 * C1 = V2 * C2 \quad (\text{Ec. 1})$$

$$V1 * 0,800 = 100 \text{ mL} * 0,125$$

$$V1 = 15,625$$

Para 100 mL se necesita:

Se realizó antibiograma a las cepas con Dicloxacilina (DCX 1 µg), Cefepime (FEP 30 µg), Cefalotina (KF 30 µg), Ciprofloxacina (CIP 5 µg), Gentamicina (CN 10 µg) y Penicilina (P 10 IU) con la técnica de Kirby Bauer [11] modificada, para ello se tomaron tubos con 1 mL de agua destilada y se depositó alícuotas de la bacteria, se incubaron a 35°C hasta encontrar el estándar 0,5 de MacFarland, cuando se ajustó las muestras, el contenido fue depositado en cajas de Petri con agar Mueller Hilton. Enseguida se tomaron discos impregnados con cada antibiótico y se colocaron en las cajas de petri, se incubaron a 35°C durante 18 horas, al final de la incubación se midió la distancia entre el borde del disco y el borde de inhibición.

Se determinó la inhibición de *L. plantarum* sobre las bacterias patógenas mediante la metodología propuesta por Tagg y McGiven [12] adecuada a las condiciones de nuestro laboratorio. Se tomaron alícuotas de cada bacteria patógena y fueron ajustadas a escala MacFarland 0,5, se colocaron en cajas de petri con agar MuellerHinton; en cada caja se depositaron discos impregnados con *L. plantarum* a concentraciones de 25, 50 y 100 µL, las cajas fueron incubadas a 32°C por 24 horas, halos iguales o superiores a 2 mm se consideraron como indicio de susceptibilidad [13]. Para obtener los discos de la bacteria láctica se ajustó a 0,5 en escala McFarland y se colocó en cajas de Petri que contenían agar MRS con azul de anilina en

las concentraciones requeridas y se incubaron a 32°C durante 24 horas.

El efecto *in vitro* del sobrenadante de *L. plantarum* sobre las bacterias patógenas fue determinado por el método de Kirby Bauer [11]. Se realizó el ajuste de la bacteria láctica a 1 en la escala MacFarland, se tomaron muestras de 1,5 mL y se depositaron en tubos Eppendorf, finalmente se centrifugaron a 15000 rpm y 4°C de temperatura, por 15 minutos. El centrifugado se obtuvo de dos formas, el primero sin filtrar y el segundo filtrado (papel filtro 0,25 µm), enseguida se conservaron en refrigeración (4°C) hasta su análisis. La evaluación del sobrenadante se realizó utilizando dos metodologías: discos de papel pads y cilindros plásticos que se colocaron sobre las cajas de petri y se incubaron en las mismas condiciones propuestas para inhibición con *L. plantarum*. Las concentraciones evaluadas fueron de 50, 75 y 100 µL para cada método (estas se determinaron mediante micropipeta, en el sobrenadante de la bacteria láctica) [14].

Para el primer método, se recortó discos de 6 mm de papel pads y fueron esterilizados por 15 minutos, se esperó a que secaran, y en cámara de flujo laminar se depositó cada concentración evaluada. Para el segundo método, se cortó puntas de pipeta de 6 mm de diámetro y en cada cilindro se depositó la cantidad de sobrenadante evaluado.

Se determinó la viabilidad de *L. plantarum* concentraciones de 0,5, 1 y 2% de sales biliares bovinas y 1 y 1,2% de bilis bovina; para ello se cultivó en caldo MRS durante 24 horas, se tomaron muestras y se colocaron en tubos con MRS y las concentraciones de bilis y sales biliares a evaluar, de los tubos se tomaron alícuotas y se depositaron en cajas de petri con MRS y azul de anilina, estas fueron incubadas a 32°C durante 48 horas. Al finalizar el periodo de incubación se hizo recuento de bacterias en cada muestra.

Se determinó la producción de gas [15] y reacción de catalasa en la bacteria láctica [16,17]. Además, se evaluó la viabilidad de la cepa láctica a pH 2,5, 4,5 y 7 por un periodo de 3 horas, con mediciones cada hora. Para ello, se usó medio MRS comercial y el pH fue ajustado con ácido tartárico, las condiciones de incubación fueron de 32°C y 48 horas.

Los parámetros cinéticos de *L. plantarum* se determinaron en los medio MRS (comercial) y PRO[18] (propuesto por Ramirez *et al.* 2005). Para ambos medios

se siguió el mismo procedimiento: se tomó un Erlenmeyer, se adicionó 60 mL de inóculo de *L. plantarum* y 540 mL de medio, se llevaron a incubación (incubadora shaker) con agitación constante a 32°C y 100 rpm, el pH no fue controlado debido a la resistencia de la cepa a bajos niveles, se realizaron mediciones cada 2 h 24 min durante 24 horas. En cada medición se determinó conteo de microorganismos viables en placa (UFC/mL), pH, azúcar total, producción de ácido láctico y proteína.

El conteo de microorganismos viables en placa se determinó mediante la disolución de 1 mL de muestra en 9 mL de agua peptonada al 0,1%, se realizó diluciones decimales que fueron transferidas a cajas de Petri, que contenían medio MRS con azul de anilina (0,1 mL) para siembra en superficie. Las cajas fueron incubadas a 32°C y se observaron entre 24 y 48 horas. Se tuvo en cuenta únicamente las cajas de Petri con conteos entre 30 y 300 colonias. El número de colonias fue multiplicado por el inverso de la dilución y por 10 para obtener UFC/mL [19].

El pH se determinó con un pHmetro digital (JENCO® VisionPlus).

El método de Dubois *et al.* [20] fue usado para determinar el azúcar total, se preparó diferentes concentraciones de glucosa para crear una curva patrón mediante los valores obtenidos de las muestras observadas a una densidad óptica de 625 nm. Los valores se graficaron contra la concentración en mg/L, finalmente se obtuvo los valores de la línea recta.

El ácido láctico fue determinado mediante titulación con hidróxido de sodio (1N) [20]. La biomasa se determinó por los métodos de Crueger y Crueger [8] y Rodríguez *et al.* [22], para ello se estableció la velocidad máxima de crecimiento mediante la ecuación 2:

$$V_{max} = \frac{dLnX}{dt} \quad (\text{Ec. 2})$$

Y el tiempo de duplicación celular (td), se determinó teniendo en cuenta la ecuación 3:

$$td = \frac{Ln2}{v_{max}} \quad (\text{Ec. 3})$$

La proteína se determinó con el método de Lowry *et al.* [23] modificado, se obtuvo una curva patrón a partir de seroalbúmina bovina, luego se midió la absorbancia

en espectrofotómetro a 625 nm. La concentración fue graficada contra los valores para obtener la ecuación de la línea recta.

Se determinó la viabilidad de *L. plantarum* a dos temperaturas (38 y 45°C), el tiempo de evaluación se llevó hasta la fase exponencial encontrada en la cinética de fermentación en el medio MRS (12:00 horas). Se usó el procedimiento descrito por Crueger y Crueger[8], para ello se ajustó el inóculo a 0,125 en escala de McFarland y se incubó hasta las 12:00 horas, luego se hicieron diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-12}$  con agua peptonada y se sembró en cajas de petri con azul de anilina y se inició en la dilución  $10^{-8}$  hasta  $10^{-12}$  a 37°C y 48 horas, determinando el recuento de UFC/mL.

Se tomó una muestra de sobrenadante de *L. plantarum* se determinó el contenido de péptidos mediante espectrofotometría de alta densidad (HPLC), se usó una alícuota de 25 mL de sobrenadante, la cual fue centrifugada a 18000 rpm, por 30 minutos y 4°C; luego se filtró 2 mL en jeringa de filtrar (0,25 micras) y finalmente fue llevado a lectura en el espectrofotómetro a 650 nm y se obtuvo los resultados.

Para determinar la producción de ácidos orgánicos se tomó caldo de crecimiento y se centrifugó a 8500 rpm, enseguida se filtró en membrana de 0,45  $\mu$ m y se determinó la producción mediante HPLC de la siguiente manera: solvente de fase móvil, ácido sulfúrico a pH 1,5; presión 800-900 PSI; volumen inyectado: 20 L; temperatura del horno: 65°C; columna BIORAD aminex HPX87 H con soporte de resina trasplantada H+ (copolímero de estireno y bisulfato dedivinilbenzeno) [24].

Los datos fueron evaluados mediante el paquete estadístico SAS 9.1 [25]. Para comparar la cinética de fer-

mentación de los medios, se usó medidas repetidas en el tiempo, con el procedimiento PROC MIXED de SAS.

## RESULTADOS

A continuación se muestran los datos reportados para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana mediante el método de Kirby Bauer (Cuadro 1, figura 1).

Las bacterias evaluadas presentaron susceptibilidad a los siguientes antibióticos: Dicloxacilina, Ciprofloxacina y Penicilina para *L. plantarum*; Cefalotina para *C. perfringens*; Cefepime y Ciprofloxacina para *S. typhimurium*; Cefepime para *E. coli*; y Cefepime y Cefalotina para *S. aureus*. En la actualidad algunos microorganismos presentan resistencia a los antibióticos como consecuencia del uso indiscriminado de estos. Este antagonismo es un mecanismo natural de supervivencia, que se produce por mutaciones y la adquisición de plásmidos (replicación del ADN extracromosómico) [26, 27]. Para la presente investigación los casos más evidentes se pueden observar en *C. perfringens* y *E. coli*.

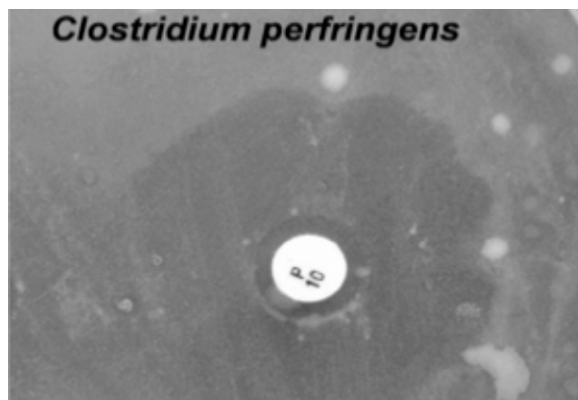
Las pruebas *in vitro* con *L. plantarum* indicaron mayor susceptibilidad de *S. aureus*, *C. perfringens* y *E. coli*, y menor efecto en *S. typhimurium* (cuadro 2, figura 2a). Por otra parte, se observó mayor inhibición en las bacterias con el incremento de la concentración de la BAL. Al respecto León [28] y Vegas *et al.* [29], mencionan que las BAL compiten por espacio gastrointestinal con otros microorganismos, evitando su crecimiento, este fenómeno se produce por la generación de compuestos antimicrobianos (bacteriocinas) y la reducción del pH del medio. Los resultados encontrados indican que una baja concentración de la bacteria láctica resulta efectiva en el control de *S. aureus*, mientras que *S.*

**Cuadro 1.** Poder antagonico de antibióticos comerciales frente a cepas de estudio.

Cepas de estudio ATCC	Diámetros del halo de inhibición (mm)											
	Antibióticos											
	DCX 1		FEP 30		KF 30		CIP 5		CN 10		P 10	
<i>L. plantarum</i>	10	S	7	R	8	R	40	S	28	R	8	S
<i>C. perfringens</i>	6	R	10	R	30	S	NA	-	NA	-	8	R
<i>S. typhimurium</i>	NA	-	32	S	12	R	45	S	23	R	NA	-
<i>E. coli</i>	NA	-	30	S	10	R	42	S	22	R	NA	-
<i>S. aureus</i>	6	R	20	S	45	S	NA	-	NA	-	20	R

DCX: Dicloxacilina; FEP: Cefepime; KF: Cefalotina; CIP: Ciprofloxacina; CN: Gentamicina; P 10: Penicilina; NA: No aplica; S: sensible; R: resistente



**Figura 1.** Antibiograma de *Clostridium perfringens*.

*tiphymurium* necesita mayores concentraciones, ya que fue únicamente susceptible a 100  $\mu$ L.

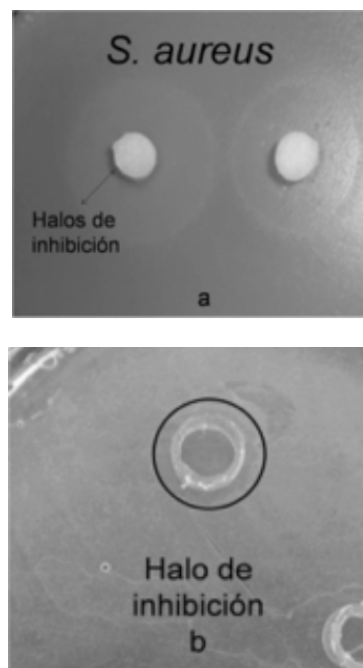
Los resultados del sobrenadante se muestran en la cuadro 3 y figura 2b. Se observa que las cepas presentan mayor susceptibilidad en el método de sensidisco que en el método de cilindros; a pesar de ello, el sobrenadante no inhibió a *C. perfringens* ninguno de los métodos, pero sí a *S. aureus*, con mayor susceptibilidad al sobrenadante en el método del sensidisco filtrado. *S. tiphymurium* y *E. coli* mostraron susceptibilidad al sobrenadante únicamente con el método de sensidisco.

Al respecto Jurado-Gómez *et al.* [30] indican que la inhibición se debe a la producción de compuestos antimicrobianos (bacteriocinas) y productos de la fermentación (ácido láctico, acético y propiónico) presentes en el sobrenadante. De esta manera se observó mejor inhibición de la bacteria láctica en comparación con su sobrenadante.

Las pruebas de gas y catalasa para *L. plantarum* fueron negativas. Estas características son importantes en la evaluación de microorganismos probióticos, dado que la primera indica que la cepa no produce gas, que altere las funciones del tracto gastrointestinal del huésped, mientras que la segunda indica que la cepa pertenece al género de los *Lactobacillus* [14,31].

**Cuadro 2.** Prueba *in vitro* de *Lactobacillus plantarum*.

Cepas	25 $\mu$ l	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l
<i>S. aureus</i>	3	3	5
<i>C. perfringens</i>	1,33	3,17	2
<i>S. tiphymurium</i>	1,33	1,67	3,33
<i>E. coli</i>	1,5	2,33	2,5

**Figura 2.** Inhibición de *L. plantarum* y su sobrenadante sobre *S. aureus*.a: disco gel de *L. plantarum*; b: Cilindros con sobrenadante.

La evaluación con bilis y sales biliares mostró un crecimiento adecuado de la cepa láctica con valores de 23,03 y 17,75 LN UFC/mL para concentraciones de 1 y 1,2% de bilis bovina; y 16,81, 20,72 y 19,52 LN UFC/mL para concentraciones de 0,5, 1 y 2% de sales biliares bovinas. Esta característica es importante en la identificación de cepas probióticas. Cuando los probióticos son administrados de forma oral, la cepa no solamente debe resistir el pH ácido del estómago, sino también las condiciones presentes a nivel de intestino delgado, lugar donde se secretan las sales biliares y la bilis [14].

La prueba de viabilidad a diferentes pH indicó que la cepa es resistente a modificaciones de la acidez del medio, ya que se observaron crecimientos de 28,73, 28,59 y 28,02 LN UFC/mL para pH 2,5, 4,5 y 7 respectivamente. Los valores de crecimiento son adecuados para garantizar la viabilidad de una cepa probiótica suministrada por vía oral ( $> 26,4$  LN UFC/mL [14]). *L. plantarum* mostró tolerancia a pH bajo debido a su capacidad de fermentar diferentes carbohidratos (pentosas y hexosas) y obtener como producto final ácido láctico que disminuye el pH del medio [32]. Esta característica es fundamental para la producción de inóculos durante los procesos de fermentación a escala industrial [33].

**Cuadro 3.** Halos de inhibición de *L. plantarum* en bacterias patógenas.

	50 μL	75 μL	100 μL	50 μL	75 μL	100 μL
Sensidiscos						
<i>S. aureus</i>	2,5	2,5	4,5	2	0	1
<i>C. perfringens</i>	0	0,5	1	0	0	0
<i>S. tiphymurium</i>	3,5	5	4,3	1,5	0,5	3,5
<i>E. coli</i>	2	2	2,3	1,5	1,8	1,8
Cilindro						
<i>S. aureus</i>	1	2	1,7	1,8	3	0
<i>C. perfringens</i>	0	0	0	0	0	0
<i>S. tiphymurium</i>	0,7	0	1	0	0,7	0,3
<i>E. coli</i>	1	0,7	1,3	0,5	1,3	0,7

La fase exponencial de la cinética de crecimiento se presentó a las 12:00 horas de iniciada la fermentación con un pH de 4,8 y una acidez de 0,84%; durante este tiempo el pH descendió en 1,276 y la acidez aumentó en 0,331% (figura 3). La cantidad de bacterias viables encontradas durante la fase exponencial es adecuada para la producción de inóculos ( $8,2 \times 10^{13}$  UFC/mL) [34]. El crecimiento bacteriano nuevamente demostró la resistencia de *L. plantarum* a bajas concentraciones de pH y el aumento de la acidez evidencia el proceso fermentativo de los carbohidratos presentes en el medio de cultivo. Todas estas características confirman que *L. plantarum* es un buen candidato para el manejo a nivel industrial.

*L. plantarum* mostró valores de 0,329 mg/L de azúcar y 0,211 mg/L de proteína durante la fase exponencial, con un consumo de 0,176 mg/L de azúcar y 0,155 mg/L de proteína durante las primeras 12 horas de fermentación (figura 4). La disminución del azúcar durante la cinética se debe a su empleo en los procesos

metabólicos de la bacteria láctica; de esta manera se garantiza que la cepa obtenga energía para su normal desarrollo y genere ácidos orgánicos que permitan un descenso del pH y la inhibición de otros microorganismos presentes en el medio [35].

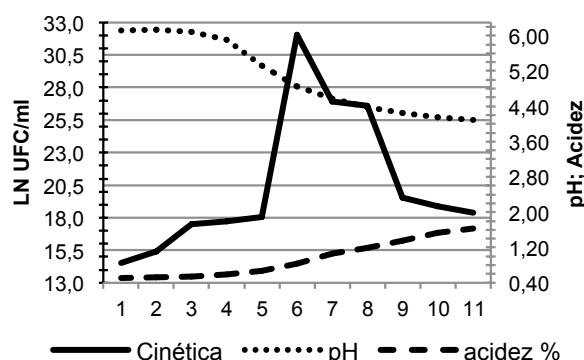
El consumo de proteína muestra un descenso durante las primeras cuatro horas de fermentación, debido posiblemente a su utilización en la formación de nuevas células [36], sin embargo, se observa un incremento durante la fase exponencial, lo cual indica la formación de sustancias proteicas en el medio como biocinas y aminoácidos libres, siendo importantes las primeras en la inhibición de microorganismos [37].

El análisis de medidas repetidas en el tiempo no encontró diferencias entre los medios ( $p < 0,05$ ), además, el efecto del tiempo no fue significativo ( $p > 0,05$ ), por lo cual se determina que el medio PRO puede usarse como medio en el crecimiento de *L. plantarum*.

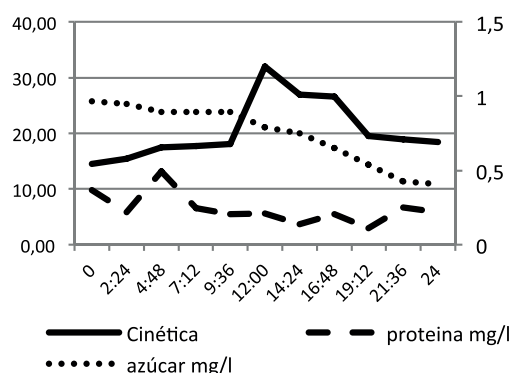
El crecimiento de *L. plantarum* a temperaturas de 45 y 38°C fue de  $5,2 \times 10^{13}$  y  $3,0 \times 10^{13}$  UFC/mL respectivamente. Estos valores evidencian la viabilidad de la cepa en condiciones gastrointestinales (38°C) cuando se suministra por vía oral y la viabilidad durante el procesamiento de fabricación de alimentos balanceados (45°C) [34].

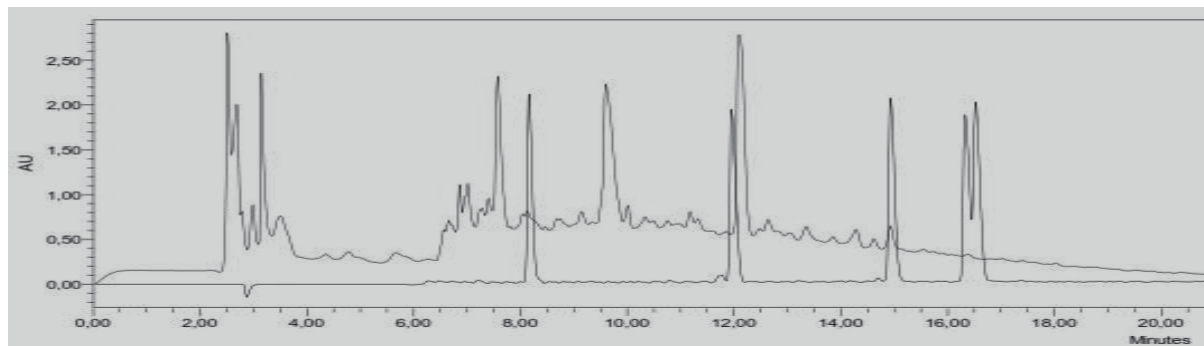
El sobrenadante presentó una cadena de péptidos de VAL-TIR-VAL en el pico número 9 de la muestra con una concentración de 0,68 mg/mL y el péptido Metionina Enkefalina acetato (TIR-GLI-GLI-FA-MET) en el pico número 12 con una concentración de 0,02 mg/mL (Figura 5).

**Figura 3.** Cinética de crecimiento de *L. plantarum*, pH y acidez en el medio MRS.



**Figura 4.** Cinética de fermentación de *L. plantarum* y consumo de azúcar y proteína.



**Figura 5.** Cromatograma sobrenadante de *L. plantarum*.

Línea superior curva patrón, línea inferior muestra

Se determinó que la bacteria es homofermentadora, dado que presenta un nivel superior al 70% de ácido láctico (cuadro 4 y 5).

**Cuadro 4.** Ácidos orgánicos presentes en el sobrenadante de *L. plantarum*.

Producto	Concentración	Porcentaje
Ácido cítrico	2,71 (g/L)	10,20%
Glucosa	3,95(g/L)	
Ácido succínico	0,68 (g/L)	7,30%
Ácido láctico	26,1 (g/L)	74,20%
Ácido acético	1,38 (g/L)	6,02%
Etanol	0,88 (g/L)	2,28%

**Cuadro 5.** Datos de cinética de crecimiento de *L. plantarum*.

Fase lat	0
Vel. Esp. Crec. ( $\mu$ h <sup>-1</sup> )	0,9803
Fin Fase Log (h)	12
Tiem. Dupl. (min)	42,42
Incr. Cel. Total.	9,80 E + 09
Incr. Cel. Final.	2 E + 12
% Azúc. Cons. Total. (g/L)	57,93%
% Azúc. Cons. Fin. Total (g/L)	18,24%
% Prot. Cons. Total. (g/L)	36,36%
% Prot. Cons. Fin. Total (g/L)	3,52%
r <sup>2</sup> =	98,45

## CONCLUSIONES

*Lactobacillus plantarum* mostró buen potencial para inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas evaluadas; sin embargo, su sobrenadante no inhibió a *C. perfringens* y *S. typhimorium*. La fermentación de la cepa láctica demostró un crecimiento adecuado a si-

mulación *in vitro* de las condiciones gastrointestinales. De esta manera, *L. plantarum* tiene características adecuadas para ser evaluada en condiciones *in vivo* en especies como los bovinos.

## REFERENCIAS

- [1] BELKACEM-HANFI, N., FHOULA, I., SEMMAR, N., GUESMI, A., PERRAUD-GAIME, I., OUZARI, H., BOUDABOUS, A. and ROUSSOS, S. Lactic acid bacteria against post-harvest moulds and ochratoxina isolated from stored wheat. *Biological Control*, 76, 2014, p. 52-59.
- [2] VÉLEZ, J., GUTIÉRREZ, L. y MONTOYA, O. Evaluación de la actividad bactericida de bacterias ácido lácticas aisladas en calostro de cerdas frente a *Salmonella typhimurium*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 68(1), 2015, p. 7481-7486.
- [3] MENAD, M., CHERIGUENE, A., BELARDI, F., HAMMOUNI, R. and MOGHTET, S. The antibacterial activity of *Lactococcus lactis* sbsp. *cremoris* against *Salmonella* Sp. *Journal of Medical Microbiology and Diagnosis*, 3 (1), 2014, p. 129.
- [4] ALDUNATE, M., SRBINOVSKI, D., HEARPS, A., LATHAM, C., RAMSLAND, P. GUGASYAN, R., CONE, R. and TACHEDJIAN, G. Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Frontiers in Physiology*, 6, 2015, p. 164.
- [5] SAND, S., NISSEN, J., SAND, O. and HAUG, T. Plantaricin A, a cationic peptide produced by *Lactobacillus plantarum*, permeabilizes eukaryotic cell membranes by a mechanism dependent on negative surface charge linked to glycosylated



- membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828, 2013, p. 249-259.
- [6] SAE, Y., YOUNG, K., DO, P., UN, J., SEON, J., YOUNG, A., CHUL, H., ROBIN, M. and MYUNG, C. Probiotics *L. plantarum* and *L. curvatus* in combination alter hepatic lipid metabolism and suppress diet-induced obesity. *Obesity*, 21, 2013, p. 2571-2578.
- [7] KHARE, R., ESPY, M., CEBELINSKI, E., BOXRUD, D., SLOAN, L., CUNNINGHAM, S., PRITT, R., and BINNICKER, M. Comparative evaluation of two commercial multiplex panels for detection of gastrointestinal pathogens by use of clinical stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(10), 2014, p. 3667-3673.
- [8] STEDT, J., BONNEDHAL, J., HERNÁNDEZ, J., MACMAHON, B., HASAN, B., OLSEN, B., DROBNÍ, M. and WALDENSTRÖM. Antibiotic resistance patterns in *Escherichia coli* from gulls in nine European country. *Infection Ecology and Epidemiology*, 4, 2014, p. 21565.
- [9] SOLIMAN, R., SALAMA, S., SAYED, R., GALAL, H. and TAWFEK, A. Preparation of combined inactivated vaccine against *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* and *Clostridium perfringens* type A and C toxins. *World Applied Science Journal*, 33(3), 2015, p. 472-478.
- [10] CHANDRASEKARAN, D., NAMBI, A., THIRUNAVU-VUKKARASU, P., VAIRAMUTHU, P., VENKATESAN, P. and TIRUMURUGAAN, K. A study on treatment of resistant mastitis in dairy cow. *Journal of Applied and Natural Science*, 6(2), 2014, p. 786-791.
- [11] CRUEGER, W. y CRUEGER, A. *Biotechnología: Manual de Microbiología Industrial*. 1 ed. Madrid (España): Acirbia, 1993, 650 p.
- [12] JURADO-GÁMEZ, H., MARTÍNEZ-BENAVIDES, J., CHASPUENGAL-TULCÁN, A. y CALPA-YAMA, F. Evaluación *in vitro* de la acción de *Lactobacillus plantarum* con características probióticas sobre *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(2), 2014, p. 49-59.
- [13] BAUR, A. and KIRBY, J. Antibiotic susceptibility testing by a standardize single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 36, 1966, p. 493-496.
- [14] TAGG, J. and MCGIVEN, A. Assay system for Bacteriocins. *Applied Environment Microbiology*, 21(5), 1971, p. 943.
- [15] ESTRADA, A., GUTIÉRREZ, L. y MONTAYO, O. Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. Contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 58(1), 2005, p. 2601-2609.
- [16] JURADO-GÁMEZ, H. Evaluación *in vivo* de *Lactobacillus plantarum* como alternativa al uso de antibióticos en lechones. *Revista MVZ Córdoba*, 18(supl), 2013, p. 3648-3657.
- [17] DAHL, T., MIDDEN, W. and HARTMAN, P. Of Killing of Gram-negative and Gram-positive Bacteria by Pure Singlet Oxygen. *Journal of Bacteriology*, 171(4), 1989, p. 2188-2194.
- [18] CAI, Y., SUYANANDANA, P., SAMAN, P. and BENNO, Y. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *Journal of General and Applied Microbiology*, 45(4), 1999, p. 177-184.
- [19] RAMÍREZ, M. Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos [Tesis Licenciado Químico en Alimentos]. Pachuca de Soto (México): Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 2005, 89 p.
- [20] LABORATORIO DE REFERENCIA ANIMAL (LARNARA). Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. li- Métodos físico e químicos. Brasília (Brasil): Ministério da Agricultura, 2(25), 1981, p. 1-15.
- [21] DUBOIS, M., GILLES, K., HAMILTON, J., REBERS, P. and SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 1956, p. 350-356.
- [22] RODRÍGUEZ, L., BUENO, G., RODRÍGUEZ, D., SERRANO, P. and BRIZUELA, M. True and apparent maintenance coefficient and their significance on fermentation kinetics. *New Horizons Biotechnology*, 2003, p. 163-162.
- [23] LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., FAR, A. and RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 1951, p. 265-75.
- [24] HEMAISWARYA, S., RAJA, R., RAVIKUMAR, R. and CARVALHO, I. Mechanism of action of probiotics. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(1), 2013, p. 113-119.
- [25] SAS Institute Inc. SAS/STAT® 9.1 User's Guide. Cary (USA): SAS Institute Inc., 2004, p. 5136.
- [26] AHMAND-BHAT, J. and AHMAND, S. Drug resistance and international issue. *International Journal of Advanced Research*, 3(2), 2015, p. 905-915.
- [27] MARTÍN-POZO, A., ARANA, D., FUENTES, M. y ALÓS, J. Sensibilidad a azitromicina y otros antibióticos en aislados recientes de *Salmonella*,

- Shigella* y *Yersinia*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 32(6), 2014, p. 369-371.
- [28] PÉREZ-GUERRA, N. Modeling the batch bacteriocin production system by lactic acid bacteria by using modified three-dimensional Lotka-Volterra. Biochemical Engineering Journal, 88, 2014, p. 115-130.
- [29] VEGAS, C., PICHUHA, B., PEÑA, C. y ZAVALA, A. Efecto simbiótico del extracto de *Smalanthus son chifolius*(yacón) y *Lactobacillus plantarum* frente a *Escherichia coli*. Ciencia e Investigación, 16(2), 2013, p. 77-82.
- [30] JURADO-GÁMEZ, H., CALPA-YAMA, F. and CHASPUENGAL-TULCÁN, A. Determinación in vitro de la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum* sobre *Yersinia pseudotuberculosis* aislada de *Cavia porcellus*. Revista Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia, 61(3), 2014, p. 241-257.
- [31] FONTANA, C., COCCONCELLI, P., VIGNOLO, G. and SAAVEDRA, L. Occurrence of antilisterial structural bacteriocin genes in meat borne lactic acid bacteria. Food Control, 47, 2015, p. 53-59.
- [32] AKABANDA, F., OWUSO, J., TANO, K., GLOVE, R., NIELSEN, D. and JESPERSEN, L. Taxonomic and molecular characterization of lactic acid bacteria and yeasts in nunu, a Ghanaian fermented milk product. Food Microbiology, 34, 2013, p. 277-283.
- [33] KARLSKAS, I., MAUDAL, K., AXELSSON, L., RUD, I., EIJSINK, V. and MATHIESEN. Heterologous protein secretion in lactobacilli with modified pSIP vectors. PLOS one, 9 (3), 2013, p. e91125.
- [34] GÄNZLE, M. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentation and food spoilage. Current Opinion in Food Science, 2, 2015, p. 106-117.
- [35] VISIKILI, A., GROUTA, A., TASSOU, C., NYCHAS, G. and PANAGO, E. Inoculated fermentation of green olives with potential probiotic *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures isolated from industrially fermented olives. Food Microbiology, 38, 2014, p.208-218.
- [36] CALPA-YAMA, F. y CHASPUENGAL-TULCÁN, A. Evaluación in vitro de *Lactobacillus casei* con características probióticas sobre *Yersinia pseudotuberculosis* [Tesis Zootecnista]. San Juan de Pasto (Colombia): Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, 2013, 98 p.
- [37] FAOUZI, L., KHOUADJA, S., AMINA, B. and FRANCOIS, G. Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics and in vivo test on *Artemia nauplii*. Aquaculture Environment Interactions, 22(2), 2014, p. 699-709.
- [38] JURADO-GÁMEZ, H., RAMÍREZ, C. y AGUIRRE, D. Cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico. Veterinaria y Zootecnia, 7(2), 2013, p. 37-53.
- [39] SAEZ-LARA, M., GÓMEZ-LLORENTE, C., PLAZA-DÍAZ, J. and GIL, A. The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases. BioMed Research International, 2015, p. 1-15.
- [40] PARK, H., YEO, S., JI, Y., LEE, J., YANG, J., PARK, S., SHIN, H. and HOLZAPFEL. Autoinducer-2 associated inhibit by *Lactobacillus sake* NR28 reduce virulence of entero haemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Food Control, 45, 2014, p. 62-69.