

## **Cinética de fermentación y acción antimicrobiana de *Weissella confusa* contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae***

### **Kinetic of fermentation and antimicrobial activity of *Weissella confusa* against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae***

Liliana Serna Cock<sup>1\*</sup>, Leidy Johana Valencia Hernández<sup>1</sup>, Rómulo Campos Gaona<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Facultad de Ingeniería y Administración, Carrera 32 vía Candelaria, Palmira, Valle, Colombia.

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera 32 vía Candelaria, Palmira, Valle, Colombia.

(Recibido el 27 de Junio de 2009. Aceptado el 17 de febrero de 2010)

#### **Resumen**

Se evaluaron las cinéticas de producción de biomasa, producción de ácido láctico, consumo de sustrato y actividad antimicrobiana de *Weissella confusa*, una bacteria ácido láctica con actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*, microorganismos productores de mastitis bovina. Las fermentaciones se llevaron a cabo anaeróticamente en discontinuo utilizando como sustratos, sustrato comercial (SC), leche suplementada con extracto levadura (LEL) y leche suplementada con extracto de levadura y glucosa (LELG) y se compararon los parámetros cinéticos. La mayor inhibición de los patógenos, la mayor producción de ácido láctico y el mayor rendimiento de biomasa se presentó en sustrato LELG. En éste último sustrato al cabo de la cuarta hora de fermentación, se presentó un diámetro de inhibición de 36,33 mm para *Staphylococcus aureus* y a la octava hora de fermentación 39 mm de diámetro para *Streptococcus agalactiae*; la producción máxima de ácido láctico fue 13,12 gL<sup>-1</sup> (a las 48 h) y la máxima concentración de biomasa fue 3,07 gL<sup>-1</sup> (a las 48 h). Estos resultados fueron superiores a los obtenidos en SC donde, para el mismo tiempo de fermentación, se obtuvieron 24,38 mm para *Staphylococcus aureus* y 30,58 mm de diámetro de inhibición para *Streptococcus agalactiae*; la mayor producción de ácido láctico fue 11,6 gL<sup>-1</sup> (a las 12 h) y la mayor concentración de biomasa fue 1,18 gL<sup>-1</sup> (a las 24 h). Los resultados sugieren que el LELG puede convertirse en una alternativa

---

\* Autor de correspondencia: tel: + 57 + 2 + 271 70 00, fax: 57 + 2 + 271 70 45, correo electrónico: lsernac@palmira.unal.edu.co. (L. Serna)

a bajo costo para la producción de *Weissella confusa*, microorganismo con gran potencial para el control y el tratamiento de mastitis bovina.

----- **Palabras clave:** Actividad antimicrobial, *Weissella confusa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*

### Abstract

The kinetics of biomass and lactic acid production, substrate consumption, antimicrobial activity of *Weissella confusa*, a lactic acid bacteria with antimicrobial activity against *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus*, bovine-mastitis producing microorganisms, were evaluated. The fermentations were carried out anaerobically in batch using as substrate, commercial substrate (SC), milk supplemented with yeast extract (LEL) and milk supplemented with yeast extract and glucose (LELG) and the kinetic parameters were compared. The greater the inhibition of pathogens, the greater production of lactic acid and the higher yield of biomass is presented on substrate LELG. This substrate presented a diameter of inhibition of 36.33 mm for *Staphylococcus aureus* after the fourth hour of fermentation and 39 mm of diameter for *Streptococcus agalactiae* at the eighth hour of fermentation; maximum production of lactic acid was 13.12 gL<sup>-1</sup> (at 48 h) and maximum concentration of biomass was 3.07 gL<sup>-1</sup> (at 48 h). These results were superior to those obtained on SC where, for the same fermentation time 24.38 mm for *Staphylococcus aureus* and 30.58 mm diameter of inhibition for *Streptococcus agalactiae* were obtained; the highest lactic acid production was 11,6 gL<sup>-1</sup> (at 12h) and the highest concentration of biomass was 1.18 gL<sup>-1</sup> (at 24 h). The results suggest that LELG may become a low cost alternative for the production of *Weissella confusa*, microorganism with great potential for control and treatment of bovine mastitis.

-----**Keywords:** Antimicrobial activity, *Weissella confusa*, *Saphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*

### Introducción

Las especies de *Weissella*, son bacterias gram-positivas, no esporuladas, productoras de ácido láctico, que al igual que el resto de bacterias ácidas lácticas (BAL) forman parte de nichos naturales [1], como vegetales frescos [2], productos cárnicos [3], y tracto vaginal de mujeres [4]. Las BAL ejercen efecto inhibitorio debido a que además de ácido láctico, estas bacterias producen compuestos antimicrobianos, como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas [5]. La producción de bacteriocinas en BAL es regulado por un mecanismo de *quórum sensing* mediado por un péptido autoinductor (histidina-quinasa)

y un regulador de respuesta (RR); el péptido autoinductor es el que detecta la densidad celular y consecuentemente se activa el RR, conduciendo a la expresión de todos los operones que da como resultado la síntesis, transporte y regulación de bacteriocinas, es decir que la producción de bacteriocinas es dependiente del péptido autoinductor secretado por la producción de BAL y en consecuencia es dependiente de la densidad celular [6]. Existen pocos reportes científicos de la producción de bacteriocinas por las especies del género *Weissella*. Srionnual y col. [7] purificaron una bacteriocina producida por *Weissella cibaria* 110, microorganismo aislado de productos pesqueros tailandeses, activa contra *Lactobacillus*

*sakei* y *Weissella paramesenteroides*. Lee [4], encontró que *Weissella kimchii* PL9023, aislada del tracto vaginal de humanos, produjo una sustancia parecida a bacteriocinas (bacteriocin like inhibitory substances, BLIS), la cual presentó efecto antimicrobiano contra patógenos vaginales, como *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*; Espeche y col. [8] aislaron de muestras de leche de bovinos sanos, especies de *Weissella paramesenteroides* con efecto antagónico contra *Streptococcus dysgalactiae* ATCC 27957 y *Escherichia coli*. Pal y Ramana [9] encontraron compuestos antimicrobianos no asociados a bacteriocinas, secretados por *Weissella paramesenteroides* DFR-8; microorganismo aislado a partir de material vegetal. Los resultados de estas investigaciones muestran el gran potencial que podría tener este género bacteriano como biopreservante alimentario ó para la prevención y control de enfermedades en animales y humanos.

En cuanto a enfermedades en animales, hasta la fecha solamente una bacteriocina, la nisina, producida por *Lactococcus lactis* se ha propuesto como un ingrediente activo en productos comerciales y ha sido empleada en el tratamiento de mastitis bovina [10, 11]. También se han descubierto otras bacteriocinas que no son utilizadas comercialmente y que poseen actividad antimicrobiana frente a patógenos productores de mastitis bovina [12, 13], sin embargo, los compuestos antimicrobianos producidos por *Weissella confusa* no han sido evaluados contra los principales agentes patógenos de mastitis bovina (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*). El objetivo de este trabajo fue evaluar la cinética de fermentación de *Weissella confusa* y su cinética de actividad antimicrobiana contra cepas comerciales de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, en sustrato comercial puro y en sustratos lácteos. En las cinéticas de fermentación se midieron la producción de ácido láctico, la formación de biomasa, el consumo de sustrato, los rendimientos de sustrato y de producto y la velocidad de crecimiento específica del microorganismo.

## Experimentación

### Microorganismo

Se utilizó una cepa de *Weissella confusa*, con actividad antimicrobiana, la cual se aisló de líquido ruminal bovino. Esta bacteria se seleccionó de un grupo de bacterias ácido-lácticas aisladas de hembras bovinas de raza Hartón del Valle, con un peso aproximado de 400 kg. A los bovinos, con el fin de promover la producción de bacterias ácido lácticas, se les indujo acidosis ruminal mediante el protocolo de Krause y Oetzel [14], hasta observar los primeros síntomas de disminución de consumo y parálisis ruminal; seis días después se recolectaron muestras de líquido ruminal mediante sonda esofágica. A partir de estas muestras se realizaron diluciones seriadas, se sembraron en agar De-Man Rogosa y Sharpe (MRS) adicionado de azul de anilina al 0,3 %, y se incubaron a 33 °C por 48 horas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas [15]. Las colonias presuntivas de ser ácido-láctica (que asimilaron el azul de anilina) se repicaron hasta obtener cultivos puros. A las cepas puras se les determinó su capacidad para producir ácido láctico mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC (Agilent 1100, USA, con integrador HP Chemstation, equipada con una columna Aminex HPX 87H, 300 mm, utilizando como fase móvil ácido sulfúrico 0,05 M, temperatura de trabajo para la columna 25 °C y velocidad de flujo de 0,5 mLs<sup>-1</sup>. Se aislaron 10 cepas productoras de ácido láctico, las cuales se identificaron bioquímicamente de acuerdo a su patrón de fermentación de carbohidratos utilizando el kit API 50 CHL. La cepa que más produjo ácido láctico se identificó como *Weissella confusa* (Véase identificación bioquímica en tabla 1). Se encontró además que éste microorganismo a una concentración de 10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup> es capaz de inhibir el crecimiento de 10<sup>7</sup> UFC g<sup>-1</sup> de *Staphylococcus aureus* y de *Streptococcus agalactiae* (resultados en proceso de publicación), por lo anterior *Weissella confusa* fue la cepa seleccionada para la investigación que se reporta en este artículo.

**Tabla 1** Identificación bioquímica de *Weissella confusa* con sistema “API 50 CHL”

<i>Prueba</i>	<i>Resultado</i>	<i>Prueba</i>	<i>Resultado</i>	<i>Prueba</i>	<i>Resultado</i>
Testigo	-	Manitol	-	Rafinosa	-
Glycerol	-	Sorbitol	-	Almidón	-
Erytriol	-	Metil-D-manopiranosida	-	Glycógeno	-
D-Arabinosa	+	Metil-D-glucopiranosida	-	Xilitol	-
Ribosa	-	N.acetil-glucosamina	+	Gentibiosa	-
D-xilosa	+	Amygdalina	+	Turanosa	-
L-xylosa	+	Arbutina	+	Lyxosa	-
Adonitol	-	Esculina	+	Tagatosa	-
Metil-D-xilopiranosida	-	Salicina	+	D-fucosa	-
Galactosa	+	Celobiosa	+	L-fucosa	-
Glucosa	+	Maltosa	+	D-arabitol	-
Fructuosa	+	Lactosa	-	L-arabitol	-
MNE	+	Melibiosa	-	Gluconato	-
SBE	-	Sacarosa	+	2-cetogluconato potásico	-
Ramnosa	-	Trehalosa	-	5-cetogluconato potásico	-
Dulcitol	-	Inulina	-		
Inocitol	-	Melizitosa	-		

(+) = Positivo a la prueba, (-) = negativo a la prueba.

### **Cinéticas de fermentación**

Las cinéticas se llevaron a cabo en 9 fermentaciones en discontinuo, usando como sustrato, leche suplementada con extracto de levadura (LEL), leche suplementada con extracto de levadura y glucosa hasta 70 gL<sup>-1</sup> (LELG) y sustrato comercial puro (SC). Como SC se utilizó caldo MRS, el cual provee las exigencias nutricionales de esta bacteria ácido láctica[15]. Los sustratos LEL y LELG se prepararon con 11% m/v de leche descremada y 1% m/v de extracto de levadura, la glucosa se añadió hasta completar la concentración de azúcar mencionada. La leche se seleccionó como sustrato debido a que provee buena fuente de nitrógeno y de vitaminas, necesarias para el crecimiento

de *Weissella confusa*, además porque podría ser un sustrato de bajo costo para la producción y comercialización del microorganismo. Las fermentaciones se realizaron en erlenmeyer de 500 mL, con un volumen de trabajo de 250 mL, los cuales permanecieron agitados elipsoidalmente sin aireación, a 100 rpm (Corning, modelo PC-420, USA) por 48 horas y a 33 °C. La cepa se adaptó a las condiciones de fermentación por tres generaciones, en cada caso se utilizó 10 % de inóculo con respecto al volumen del sustrato. La fermentación se ajustó a pH 6,0 utilizando NaOH 4M.

Para realizar las cinéticas se tomaron aseptícamente 20 mL de sustrato a las 0, 2, 4, 8, 12, 24 y 48 horas de fermentación (el tiempo 0 correspondió a las

condiciones iniciales del sustrato). Para determinar el ácido láctico y el consumo de sustrato, en cada uno de los tiempos y para cada uno de los sustratos, las muestras de sustrato se centrifugaron a 5000 x g por 10 minutos; posteriormente se filtraron (filtros millipore HVLPO 2500) y los sobrenadantes de las muestras filtradas se inyectaron en equipo HPLC. La producción de ácido láctico se determinó en las condiciones anotadas anteriormente y los azúcares se midieron en un equipo HPLC Hewlett Packard HP1050, (USA), con integrador HP Chemstation, equipado con una columna Aminex HPX 87H, 300 mm, utilizando como fase móvil ácido sulfúrico 0,0025 M, temperatura de trabajo para la columna de 65 °C y velocidad de flujo de 0,5 mL s<sup>-1</sup>. La cinética de formación de biomasa se determinó en cada tiempo de fermentación acorde a los métodos estándar de la A.O.A.C (934,01) [16]. Los resultados se calcularon en gL<sup>-1</sup> de biomasa, mediante la determinación de su peso seco.

A partir de las cinéticas se calculó para *Weissella confusa*, la velocidad de crecimiento específica,  $\mu$  y los rendimientos de biomasa ( $Y_{x/s}$ ) y de producto ( $Y_{p/s}$ ) (ácido láctico) mediante las Ecuaciones 1 y 2.

$$Y_{p/s} = \frac{P}{S_0 - S} \quad \text{gg}^{-1} \quad (\text{Ec } 1)$$

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad \text{gg}^{-1} \quad (\text{Ec } 2)$$

Donde,  $S_0$ : concentración inicial de azúcares totales (gL<sup>-1</sup>),  $S$ : concentración final de azúcares totales (gL<sup>-1</sup>), hasta el tiempo en que  $P$  es máximo;  $P$ : concentración máxima de ácido láctico (gL<sup>-1</sup>),  $X$ : concentración inicial de biomasa (gL<sup>-1</sup>),  $X_0$ : concentración final de biomasa (gL<sup>-1</sup>).

### Cinética de actividad antimicrobiana de *Weissella confusa*

Se utilizó *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923<sup>TM</sup>\* y *Streptococcus agalactiae* ATCC® 13813<sup>TM</sup>\* y se emplearon los mismos sustratos

de fermentación descritos arriba. Las pruebas de actividad antimicrobiana se realizaron en cada tiempo de fermentación y para cada sustrato evaluado, para ello se utilizó una modificación de la técnica de difusión en superficie de agar usada por Ryan y col. [17]. Se utilizaron placas de agar de 5 mm de espesor, las cuales contenían los nutrientes específicos para el crecimiento de cada uno de los patógenos; agar Baird Parker (BP) para *Staphylococcus aureus* y Agar M-17 para *Streptococcus agalactiae*. A estas placas se les realizaron orificios utilizando un sacabocado estéril de 17 mm de diámetro. Las placas se sembraron por separado con los patógenos en prueba, utilizando 1 x 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> de cada patógeno. De igual manera, para cada tiempo de fermentación y para cada sustrato evaluado, se tomaron en forma aséptica, círculos de agar MRS estéril de 5 mm de espesor y de 17 mm de diámetro, los cuales se inocularon con 0,1 mL de *Weissella confusa* (a diferentes concentraciones dependiendo del tiempo de fermentación), obtenida de cada uno de los tiempos y de cada uno de los sustratos de fermentación evaluados. Los círculos de agar inoculados se introdujeron en los orificios realizados en las cajas con agar BP y M-17. Las cajas se incubaron a 33 °C por 48 horas, transcurrido éste tiempo de incubación se midieron los halos de inhibición del crecimiento de ambos patógenos, utilizando regla milimétrica. Las pruebas de inhibición frente a patógenos se realizaron por triplicado en cada uno de los tiempos de fermentación y para cada uno de los sustratos de fermentación.

### Análisis estadístico

Se uso un diseño factorial de 3\*7 con dos factores así: Factor sustrato de fermentación, con tres niveles, LEL, LELG y SC. Factor tiempo de fermentación, con 7 niveles: 0, 2, 4, 8, 12, 24 y 48 horas de fermentación, donde el tiempo 0 corresponde a las condiciones iniciales de fermentación. Es de anotar que se realizaron 9 fermentaciones correspondientes al triplicado de los tres sustratos de fermentación, a partir de éstas fermentaciones se tomaron muestras en los dife-

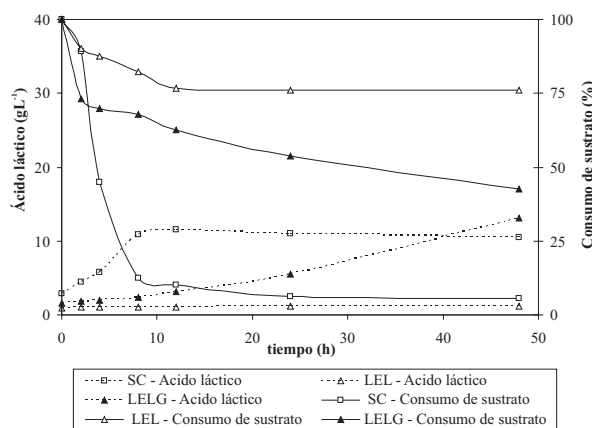
rentes tiempos. Los resultados se analizaron con el paquete estadístico SPSS 15,0 para Windows (SPSS Inc, Chicago IL, USA) [18]. La comparación entre promedios se llevó a cabo a través de la prueba *Tukey* y *Duncan* con una probabilidad de  $P < 0,05$ . La prueba *T* se utilizó para encontrar las diferencias significativas entre patógenos. Las variables de respuesta fueron: cinética de producción de ácido láctico, cinética de producción de biomasa, cinética de consumo de sustrato, velocidad específica de crecimiento, rendimiento en sustrato y rendimiento en biomasa para *Weissella confusa* y se midió la actividad antimicrobiana de *Weissella confusa* frente a *Staphylococcus aureus* y frente a *Streptococcus agalactiae*.

## Resultados

### Cinéticas de fermentación

La figura 1 muestra las curvas de producción de ácido láctico y consumo de sustrato obtenidas en fermentaciones en discontinuo con sustratos SC, LEL y LELG. La producción de ácido láctico presentó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $P < 0,05$ ), la máxima producción se obtuvo en sustrato LELG ( $13,12 \text{ gL}^{-1}$ ) a 48 horas de fermentación, consumiendo 57,21 % del sustrato. En SC se obtuvo  $11,6 \text{ gL}^{-1}$  a 12 horas de fermentación con un consumo de sustrato de 94,59 %. En sustrato LEL se produjo  $1,22 \text{ gL}^{-1}$  a 48 horas de fermentación consumiendo un mínimo de sustrato de 24 %. El sustrato residual fue de 5,41 %, 42,79 % y 76 % para los sustratos SC, LELG y LEL, respectivamente. Como era lo esperado, el consumo de sustrato mostró diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes sustratos y entre los diferentes tiempos de evaluación ( $P < 0,05$ ). Se presentó además efecto de interacción entre el factor tipo de sustrato y el factor tiempo de fermentación lo que indica que la producción de ácido láctico está influenciada por ambos factores. Las velocidades promedio de producción de ácido láctico en SC, LEL Y LELG fueron  $1,11 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ,  $0,18 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  y  $0,41 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ , res-

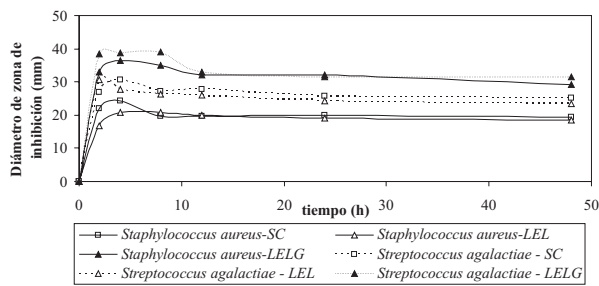
pectivamente. A pesar que *Weissella confusa* en LELG, produjo la mayor cantidad de ácido láctico, la velocidad de formación de ácido láctico fue menor comparada con SC, en donde se observa una rápida formación de ácido láctico a 12 horas de fermentación.



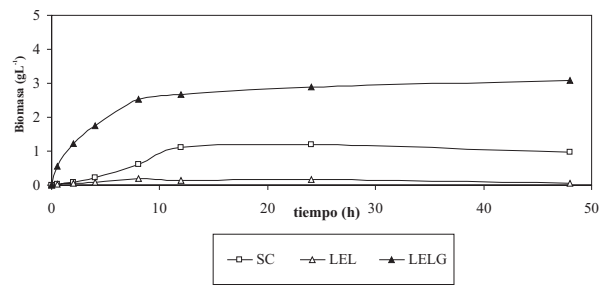
**Figura 1** Cinética de producción de ácido láctico y consumo sustrato de *Weissella confusa* en leche suplementada con extracto de levadura (LEL), leche suplementada con extracto de levadura y glucosa hasta  $70 \text{ gL}^{-1}$  (LELG) y sustrato comercial puro, caldo MRS (SC)

### Cinética de actividad antimicrobiana

En las figuras 2 y 3 se muestra las curvas de las cinéticas de actividad antimicrobiana y de formación de biomasa, respectivamente, en SC, LEL y LELG. Los diámetros de inhibición contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes sustratos y entre los diferentes tiempos de fermentación ( $P < 0,05$ ) y se presentó efecto de interacción. Lo anterior sugiere que la concentración de nutrientes y el tiempo de fermentación estimularon la actividad antimicrobiana de *Weissella confusa*. En la tabla 2 se presenta el Anova para actividad antimicrobiana de *Weissella confusa*.



**Figura 2** Cinética de actividad antimicrobiana de *Weissella confusa* frente a *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* en leche suplementada con extracto de levadura (LEL), leche suplementada con extracto de levadura y glucosa hasta 70 gL<sup>-1</sup> (LELG) y sustrato comercial puro, caldo MRS (SC)



**Figura 3** Cinética de formación de biomasa de *Weissella confusa* en leche suplementada con extracto de levadura (LEL), leche suplementada con extracto de levadura y glucosa hasta 70 gL<sup>-1</sup> (LELG) y sustrato comercial puro, caldo MRS (SC)

**Tabla 2** ANOVA para la actividad antimicrobiana de *Weissella confusa* contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl <sup>-1</sup>	Cuadrado medio del error	F	Significación
Modelo corregido	20237,030(a)	55	367,946	403,499	,000
Intersección	92259,574	1	92259,574	101174,107	,000
Patógeno	927,668	1	927,668	1017,304	,000
Concentración o medio de cultivo	2420,345	3	806,782	884,737	,000
Horas * Patógeno * Concentración o medio de cultivo	179,997	18	10,000	10,966	,000
Horas * Concentración o medio de cultivo	570,435	18	31,691	34,753	,000
Patógeno * Concentración o medio de cultivo	100,287	3	33,429	36,659	,000
Horas * Patógeno	231,461	6	38,577	42,304	,000
Horas	15806,835	6	2634,473	2889,027	,000
Error	102,132	112	,912		
Total	112598,735	168			
Total corregida	20339,161	167			

<sup>a</sup> R cuadrado = ,995 (R cuadrado corregida = ,993)

En SC, la máxima actividad antimicrobiana de *Weissella confusa* contra *Staphylococcus aureus*, y *Streptococcus agalactiae* se presentó

a la cuarta hora de fermentación, obteniéndose 24,38 mm y 30,58 mm de diámetro de inhibición, respectivamente. La concentración de biomasa

de *Weissella confusa*, para el tiempo en el cual se lograron los mayores diámetros de inhibición contra los patógenos fue  $0,22 \text{ gL}^{-1}$ . En SC, *Weissella confusa* presentó crecimiento exponencial hasta 12 horas de fermentación, con formación de  $1,11 \text{ gL}^{-1}$  de biomasa, a partir de este tiempo el microorganismo entró en fase de crecimiento estacionaria, y en 24 horas de fermentación se obtuvo una concentración de biomasa de  $1,19 \text{ gL}^{-1}$ . La velocidad específica de crecimiento  $\mu$ , el rendimiento celular ( $Y_{x/s}$ ) y el rendimiento en producto ( $Y_{p/s}$ ) de *Weissella confusa* en SC fue  $0,0811 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,062 \text{ gg}^{-1}$  y  $0,46 \text{ gg}^{-1}$ , respectivamente.

En LEL, la máxima actividad antimicrobiana de *Weissella confusa* contra *Staphylococcus aureus* se presentó a la cuarta hora de fermentación, y contra *Streptococcus agalactiae* a 2 horas de fermentación, obteniéndose  $20,88 \text{ mm}$  y  $30,5 \text{ mm}$  de diámetro de inhibición, respectivamente. En éste sustrato la mayor concentración de biomasa de *Weissella confusa* se alcanzó al finalizar la octava hora de fermentación ( $0,185 \text{ gL}^{-1}$ );  $\mu$ ,  $Y_{x/s}$  y  $Y_{p/s}$  presentaron valores correspondientes a  $0,0165 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,004 \text{ gg}^{-1}$  y  $0,29 \text{ gg}^{-1}$ , respectivamente. En LELG, la máxima actividad antimicrobiana de *Weissella confusa* contra *Staphylococcus aureus* se presentó a la cuarta hora de fermentación, y contra *Streptococcus agalactiae* a 8 horas de fermentación, obteniéndose  $36,33 \text{ mm}$  y  $39 \text{ mm}$  de diámetro de inhibición, respectivamente. La máxima concentración de biomasa se presentó a las 48 horas de fermentación ( $3,07 \text{ gL}^{-1}$ ),  $\mu$ ,  $Y_{x/s}$  y  $Y_{p/s}$  presentaron valores de  $0,34 \text{ h}^{-1}$ ,  $5,98 \text{ gg}^{-1}$  y  $0,73 \text{ gg}^{-1}$ , respectivamente.

En todos los sustratos de fermentación, la producción de ácido láctico estuvo asociada al crecimiento microbiano, sin embargo, la mayor cantidad de biomasa no estuvo asociada al mayor diámetro de inhibición. Los rendimientos de biomasa presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $P < 0,05$ ) y se presentó efecto de interacción entre los factores tipo de sustrato y tiempo de fermentación; lo anterior indica que ambos factores están implicados en la formación de biomasa.

## Discusión

A pesar que es bien conocido que *Weissella confusa* es una BAL, ningún estudio científico reporta la cantidad de ácido láctico producida por especies de este género. Espeche y col. [8] aislaron BAL de muestras de leche provenientes de bovinos sanos, donde preseleccionaron 39 cepas, de las cuales encontraron 6 cepas de *Weissella paramesenteroides* y solo una de ellas fue capaz de inhibir *Streptococcus dysgalactiae* ATCC 27957 y *Escherichia coli*.

Los resultados en producción de ácido láctico en LEL pueden asociarse al bajo consumo de sustrato, lo cual indica que *Weissella confusa* no tuvo los requerimientos nutricionales necesarios para convertir la fuente de carbono en ácido láctico. *Weissella confusa* al igual que las BAL son exigentes nutricionalmente debido a que no son capaces de metabolizar todas las proteínas y requieren de micronutrientes para las reacciones enzimáticas, síntesis de pared, síntesis de membrana celular y producción de ácido láctico [19]. Para suplir la exigencia nutricional de estos microorganismos se ha evaluado la suplementación de sustratos con extracto de levadura y se han adicionado otros nutrientes como vitaminas, aminoácidos, lactosa, minerales, jugo de caña y suplementos inorgánicos que han incrementado la producción de ácido láctico [20, 21].

Los resultados de actividad antimicrobiana de *Weissella confusa* pueden deberse a la producción de bacteriocinas, producción de BLIS [22] ó al efecto combinado de elementos antimicrobiales. La acción antimicrobiana no se atribuyó a la producción de ácido láctico, dado que los picos de producción del ácido no estuvieron asociados a la mayor actividad antimicrobiana y además porque los sustratos se ajustaron a pH 6,0 durante el tiempo de fermentación. El mayor poder de inhibición de *Weissella confusa* ocurrió durante la fase exponencial de crecimiento microbiano, es decir que el compuesto antimicrobiano estaba asociado a su crecimiento, lo cual sugiere que podría ser sintetizado como metabolito primario.



*Weissella confusa* inhibió ambos patógenos y los mayores halos de inhibición se presentaron contra *Streptococcus agalactiae*. Los resultados indican que la actividad antimicrobiana de éste microorganismo depende de la composición del medio de fermentación; la mayor actividad antimicrobiana se presentó cuando el microorganismo crece en sustrato LELG.

Striannual y col. [7], descubrieron una bacteriocina de *Weissella cibaria*, que la llamaron Weissellicin 110; hasta la fecha es la única bacteriocina de especies de *Weissella* que ha sido definida. Weissellicin 110 es estable al calor y mostró solamente un estrecho espectro de inhibición contra BAL, entre las cuales están *Lactobacillus sakei* JCM 1157 y *Weissella paramesenteroides* JCM 9890.

La literatura reporta ampliamente bacteriocinas producidas por otros microorganismos, con efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, pero son pocos los estudios que reportan efecto antimicrobiano contra los dos patógenos al mismo tiempo, este detalle muestra la relevancia de esta investigación, además la actividad antimicrobiana de *Weissella confusa* supera el doble de la actividad antimicrobiana de otras bacterias ácido lácticas reportadas en otras investigaciones [23, 24]. Varella Coelho y col. [13] lograron un diámetro de inhibición de 37 mm contra cepas Streptococcales y Staphylococcales cuando emplearon una combinación de bacteriocinas (aureocina A70 y A53). Otros autores encontraron que bacteriocinas sintetizadas por *Bacillus thuringiensis* ejercieron efecto inhibitorio contra cepas de *S. aureus*, asociadas a mastitis bovina [12]. Recientemente, se demostró que 5 bacteriocinas producidas por *Bacillus thuringiensis* mostraron actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, entre otros [25].

*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* son dos de los principales patógenos asociados a mastitis bovina, los resultados de la actividad

inhibitoria de *Weissella confusa* contra cepas comerciales de éstos microorganismos, muestran el uso potencial que podría tener esta cepa para el control de infecciones intramamarias en bovinos, por ello se deben emprender estudios *in vivo* para evaluar la capacidad antibacteriana de esta BAL en el control de mastitis bovina; además se deben adelantar estudios de purificación e identificación de los compuestos antimicrobianos.

Es bien conocido que el sustrato utilizado para la producción de biomasa representa hasta el 80% de los costos de producción [26]; éste microorganismo presentó la mayor actividad antimicrobiana cuando creció en sustrato lácteo suplementado con extracto de levadura y glucosa, a pesar de la necesidad de adicionar glucosa y extracto de levadura al sustrato lácteo, el costo de LELG es 6,3 veces menor que el costo del SC.

## Conclusiones

En este estudio se encontró que *Weissella confusa* es una bacteria que produce hasta 13,12 gL<sup>-1</sup> de ácido láctico y produce compuestos BLIS que ejercen efecto inhibitorio contra cepas comerciales de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, lo cual podría despertar el interés de investigadores hacia la evaluación *in vivo* de la acción antimicrobiana de esta BAL en bovinos mastíticos. Las cinéticas de producción de ácido láctico, consumo de sustrato, formación de biomasa, actividad antimicrobiana y velocidad específica de crecimiento dependen significativamente del sustrato de fermentación y del tiempo de fermentación. En sustrato LELG, el rendimiento en biomasa y la actividad antimicrobiana de *Weissella confusa* son considerables, por lo cual este sustrato podría ser utilizado para la producción comercial del microorganismo, dado su bajo costo comparado con SC. El descubrimiento sobre sustancias antibacterianas como bacteriocinas provenientes de esta especie de *Weissella* es de gran impacto científico ya que hasta la fecha esta especie no se ha asociado a la producción de compuestos antimicrobianos.

## Agradecimientos

Los autores expresamos los agradecimientos a la División de investigación de la Universidad Nacional de Colombia y al Grupo de Investigación “Conservación mejoramiento y utilización de ganado criollo Hartón del Valle” por la financiación de ésta investigación.

## Referencias

1. K. J. Björkroth, U. Schillinger, R. Geisen, N. Weiss, B. Hoste, W. H. Holzapfel, H. J. Korkeala, P. Vandamme. “Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples.” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* Vol. 52. 2002. pp. 141-148.
2. F. Dellaglio, S. Torriani. “DNA-DNA homology, physiological characteristics and distribution of lactic acid bacteria from maize silage.” *J. Appl. Bacteriol.* Vol. 60. 1986. pp. 83-93.
3. M. D. Collins, J. Samelis, J. Metaxopoulos, S. Wallbanks. “Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species.” *J. Appl. Bacteriol.* Vol. 75. 1993. pp. 595-603.
4. Y. Lee. “Characterization of *Weissella kimchii* PL9023 as a potential probiotic for women.” *FEMS Microbiol. Lett.* Vol. 250. 2005. pp. 157-162.
5. S. Matamoros, M. F. Pilet, F. Gigout, H. Prévost, F. Leroi. “Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria.” *Food Microbiol.* Vol. 26. 2009. pp. 638-644.
6. I. F. Nes, V. G. H. Eijsink. “Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum sensing mechanisms. Dunny, G.M., Winans, S.C. (Eds.). *Cell-Cell Signaling in Bacteria*. Ed. American Society for Microbiology Press. Washington DC. 1999. pp. 175-192.
7. S. Sriornual, F. Yanagida, L. H. Lin, K. N. Hsiao, Y. S. Chen. “Weissellicin 110, a Newly Discovered Bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, Isolated from Plaa-Som, a Fermented Fish Product from Thailand.” *Appl Environ. Microb.* Vol. 73. 2007. pp. 2247-2250.
8. M. C. Espeche, M. C. Otero, F. Sesma, M. E. F. Nader-Macias. “Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows.” *Vet. Microbiol.* Vol. 135. 2009. pp. 346-357.
9. A. Pal, K. V. Ramana. “Isolation and preliminary characterization of a nonbacteriocin antimicrobial compound from *Weissella paramesenteroides* DFR-8 isolated from cucumber (*Cucumis sativus*).” *Process Biochem.* Vol. 44. 2009. pp. 499-503.
10. P. M. Sears, B. S. Smith, W. K. Stewart, R. N. Gonzalez, S. D. Rubino, S. A. Gusik, E.S. Kulisek, S. J. Projan, P. Blackburn. “Evaluation of a Nisin-Based Germicidal Formulation on Teat Skin of Live Cows.” *J. Dairy Sci.* Vol. 75. 1992. pp. 3185-3190.
11. J. Wu, S. Hu, L. Cao. “Therapeutic Effect of Nisin Z on Subclinical Mastitis in Lactating Cows,” *Antimicrob Agents Chemother.* Vol. 51. 2007. pp. 3131-3135.
12. J. E. Barboza-Corona, N. de la Fuente-Salcido, N. Alva-Murillo, A. Ochoa-Zarzosa, J. E. López-Meza. “Activity of bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis* against *Staphylococcus aureus* isolates associated to bovine mastitis,” *Vet. Microbiol.* Vol. 138. 2009. pp. 179-183.
13. M. L. Varella Coelho, J. S. Nascimento, P. C. Fagundes, D. J. Madureira, S. S. Oliveira, M. A. V. Brito, M. C. F. Bastos. “Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis.” *Res. Microbiol.* Vol. 158. 2007. pp. 625-630.
14. K. M. Krause, G. R. Oetzel. “Inducing Subacute Ruminant Acidosis in Lactating Dairy Cows.” *J. Dairy Sci.* Vol. 88. 2005. pp. 3633-3639.
15. J. C. De Man, M. Rogosa, M. E. Sharpe. “A medium for the cultivation of *Lactobacilli*.” *J. Appl. Bacteriol.* Vol. 23. 1960. pp. 130-135.
16. AOAC. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington. D.C. 1990. pp 69.
17. M. P. Ryan, M. C. Rea, C. Hill, R. P. Ross. “An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147.” *Appl. Environ. Microb.* Vol. 62. 1996. pp. 612-619.
18. SPSS para Windows. Version 15 Chicago: SPSS Inc. [programa informático en CD-ROM]. Disponible en SPSS Inc. Página web de SPSS disponible en: <<http://www.spss.com/>>. Consultada el 20 de Febrero de 2009.
19. E. W. J. van Niel, B. Hahn-Hägerdal. “Nutrient requirements of *Lactococci* in defined growth media.” *Appl. Microbiol. Biot.* Vol. 52. 1999. pp. 617-627.
20. P. S. Panesar, J. F. Kennedy, D. N. Gandhi, K. Bunko. “Bioutilisation of whey for lactic acid production.” *Food Chem.* Vol. 105. 2007. pp.1-14.

21. C. L. Serna, A. Rodríguez. "Producción económica de ácido láctico utilizando residuos de cosecha y jugos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.)." *Agricultura Técnica*. Vol. 67. 2007. pp. 29-38.
22. L. González, H. Sandoval, N. Sacristán, J. M. Castro, J. M. Fresno, M. E. Tornadijo. "Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity." *Food Control*. Vol. 18. 2007. pp. 716-722.
23. L. Topisirovic, M. Kojic, D. Fira, N. Golic, I. Strahinic, J. Lozo. "Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation." *Int. J. Food Microbiol.* Vol. 112. 2006. pp. 230-235.
24. A. Muñoz, S. Ananou, A. Gálvez, M. Martínez-Bueno, A. Rodríguez, M. Maqueda, E. Valdivia. "Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat." *Int. Dairy J.* Vol. 17. 2007. pp. 760-769.
25. N. De la Fuente-Salcido, M. G. Alanís-Guzmán, D. K. Bideshi, R. Salcedo-Hernández, M. Bautista-Justo, J. E. Barboza-Corona. "Enhanced synthesis and antimicrobial activities of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*." *Arch. Microbiol.* Vol. 190. 2008. pp. 633-640.
26. C. Akerberg, G. Zacchi. "An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour." *Bioresource Technol.* Vol. 75. 2000. pp. 119-126.