

Caracterización del proceso de fermentación y del efecto de inhibición de *Lactobacillus lactis* en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis**

Henry Jurado-Gómez¹ / Javier Martínez-Benavides² / Cristian Paz³

Resumen

Se evaluó el proceso fermentativo e inhibición *in vitro* de *L. lactis* en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*; así mismo, el crecimiento de *L. lactis* a tres pH (2,5, 4,5 y 7), sales biliares (0,5, 1 y 2%), bilis bovina (1 y 1,2%) y dos temperaturas (38 y 45 °C). Se determinaron péptidos y ácidos orgánicos en sobrenadante de *L. lactis* por HPLC. Se hizo cinética de fermentación en la que se evaluó: pH, azúcar total, proteína y ácido láctico. Se realizó antibiograma de dicloxacilina, cefepime, penicilina y cefalotina. Se definió la inhibición de *L. lactis* y su sobrenadante en cepas patógenas. El mejor crecimiento fue a pH de 2,5 (3×10^{12} UFC/ml); de 1×10^{10} y 4×10^9 UFC/ml para 0,5% de sales biliares y 1,2% de bilis bovina, respectivamente; de $3,5 \times 10^{13}$ y $3,4 \times 10^{13}$ UFC/ml para 38 y 45 °C, respectivamente. El HPLC determinó los péptidos VAR-TIR-VAR y ácido láctico (83,11%). La cinética de fermentación determinó la fase exponencial a 14:24 h con un valor 77×10^{10} UFC/ml, valores de pH de 4,284, azúcar 2,33 mg/ml, proteína 1,44 mg/ml y acidez de 0,79%. Se encontró que *S. aureus* y *S. epidermidis* fueron sensibles a todos los antibióticos. Las bacterias patógenas fueron resistentes a la cepa láctica, pero *S. epidermidis* fue sensible al sobrenadante de *L. lactis*. Se concluye que *Lactobacillus lactis* mostró adecuada capacidad de crecimiento, buenos parámetros de fermentación y efecto inhibitorio en cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* en condiciones *in vitro*.

Palabras clave: antagonismo microbiano, crecimiento, *Lactobacillus lactis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

Characterization of the Fermentation Process and the Inhibition Effect of *Lactobacillus lactis* in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*

Abstract

The fermentative process and *in vitro* inhibition of *L. lactis* in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* were assessed. The growth of *L. lactis* at three pH (2.5, 4.5 and 7), bile salts (0.5, 1 and 2%), bovine bile (1 and 1.2%) and two temperatures (38 and 45 °C) were evaluated. Peptides and organic acids in supernatant of *L. lactis* by HPLC were determined. Fermentation kinetics was carried out, evaluating: pH, total sugar, protein and lactic acid. An antibiogram of dicloxacilin, cefepime, penicilin and cefalotin was made. The inhibition of *L. lactis* and its supernatant were defined in pathogenic strains. The best growth was at a pH of 2.5 (3×10^{12} UFC/ml); of 1×10^{10} and 4×10^9 UFC/ml for 0.5% of bile salts and 1.2% of bovine bile, respectively; of 3.5×10^{13} and 3.4×10^{13} UFC/ml for 38 and 45 °C, respectively. The HPLC determined the peptides VAR-TIR-VAR and lactic acid (83.11%). The fermentation kinetics determined the exponential phase at 14:24 h with a value of 77×10^{10} UFC/ml, pH values of 4.284, 2.33 mg/ml sugar, 1.44 mg/ml protein and acidity of 0.79%. It was

* Proyecto financiado por la Vicerrectoría de Posgrados y Relaciones Internacionales (VI-PRI), Universidad de Nariño.

1 Zootecnista, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia. PhD en Ingeniería de Alimentos. Profesor asociado tiempo completo, Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Departamento de Producción y Procesamiento Animal, Programa de Zootecnia. Grupo de investigación Fise-Probiotec, Pasto, Colombia.

✉ henryjugam@gmail.com

2 Zootecnista, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia. MSc. Profesor asistente tiempo completo, Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Pecuarias, Departamento de Producción y Procesamiento Animal, Programa de Zootecnia. Grupo de investigación Fise-Probiotec, Pasto, Colombia.

✉ javimabe@gmail.com

3 Zootecnista, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia. Grupo de investigación Fise-Probiotec, Pasto, Colombia.

✉ henryjugam@gmail.com

Cómo citar este artículo: Jurado-Gómez H, Martínez-Benavides J, Paz C. Caracterización del proceso de fermentación y del efecto de inhibición de *Lactobacillus lactis* en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Rev Med Vet. 2015;(30):15-29.

found that *S. aureus* and *S. epidermidis* were sensitive to all antibiotics. The pathogenic bacteria were resistant to the lactic strain, but *S. epidermidis* was sensitive to the supernatant of *L. lactis*. The conclusion is that *Lactobacillus lactis* showed adequate growth capacity, good fermentation parameters and inhibitory effect in strains of *S. aureus* and *S. epidermidis* in *in vitro* conditions.

Keywords: microbial antagonism, growth, *Lactobacillus lactis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

Caracterización do proceso de fermentación e do efecto de inibição de *Lactobacillus lactis* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*

Resumo

Avaliou-se o processo fermentativo e a inibição *in vitro* de *L. lactis* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Avaliou-se o crescimento de *L. lactis* a três pH (2,5, 4,5 e 7), sais biliares (0,5, 1 e 2 %), bílis bovina (1 e 1,2 %) e duas temperaturas (38 e 45 °C). Determinaram-se peptídeos e ácidos orgânicos em sobrenadante de *L. lactis* por HPLC. Fez-se cinética de fermentação, avaliando: pH, açúcar total, proteína e ácido láctico. Realizou-se antibiograma de dicloxacilina, cefepime, penicilina e cefalotina. Definiu-se a inibição de *L. lactis* e seu sobrenadante em cepas patogênicas. o melhor crescimento foi a pH de 2,5 (3×10^{12} UFC/ml); de 1×10^{10} e 4×10^9 UFC/ml para 0,5 % de sais biliares e 1,2 % de bílis bovina, respectivamente; de $3,5 \times 10^{13}$ e $3,4 \times 10^{13}$ UFC/ml para 38 e 45 °C, respectivamente. O HPLC determinou os peptídeos VAR-TIR-VAR e ácido láctico (83,11 %). A cinética de fermentação determinou a fase exponencial a 14h: 24m com um valor 77×10^{10} UFC/ml, valores de pH de 4,284, açúcar 2,33 mg/ml, proteína 1,44 mg/ml e acidez de 0,79 %. Constatou-se que *S. aureus* e *S. epidermidis* foram sensíveis a todos os antibióticos. As bactérias patogênicas foram resistentes à cepa láctica, mas *S. epidermidis* foi sensível ao sobrenadante de *L. lactis*. Conclui-se que *Lactobacillus lactis* mostrou uma adequada capacidade de crescimento, bons parâmetros de fermentação e efeito inibitório em cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* em condições *in vitro*.

Palavras chave: antagonismo microbiano, crescimento, *Lactobacillus lactis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son microorganismos presentes en la naturaleza; se caracterizan por desarrollarse en múltiples sustratos con diversas condiciones biológicas y medioambientales. La producción de ácido láctico y bacteriocinas por las BAL son tecnológicamente interesantes en la conservación de alimentos y la prevención de enfermedades, ya que tienen la capacidad de inhibir a otros microorganismos (1,2). La Organización

Mundial de Gastroenterología (WGO) (3) menciona que las BAL estimulan el sistema inmune, reducen el cáncer de colon, fagocitan radicales peróxido, entre otros, que mejoran la salud intestinal del huésped.

Las pérdidas causadas por enfermedades bacterianas en la producción de leche especializada son elevadas; entre las de mayor importancia se encuentra la mastitis. La enfermedad se manifiesta de dos formas: la mastitis clínica, con signos claros

y observables en la ubre, y subclínica, con ausencia de signos visibles, detectable por determinación de enzimas inflamatorias o recuento de células somáticas (RCS) (4). La mastitis subclínica es causada por agentes patógenos que permanecen en la ubre por periodos largos, siendo los microorganismos más usuales *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (5).

El uso de microorganismos probióticos (BAL) en el control de enfermedades microbianas como la mastitis se debe a su capacidad de inhibir y regular el crecimiento de bacterias patógenas, sin causar efectos colaterales en el organismo. Sin embargo, las cepas evaluadas deben tener características determinadas que garanticen su viabilidad y su capacidad antagonista e inocuidad: la primera determina el crecimiento adecuado de la bacteria en condiciones gastrointestinales (pH bajo, temperatura, bilis y sales biliares); mientras que la segunda, el poder antagonista de la cepa evaluada sobre los microorganismos causante de la enfermedad.

De acuerdo con lo anterior, en el presente estudio se buscó caracterizar el proceso de fermentación y el efecto de inhibición de *Lactobacillus lactis* en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología del grupo Fise-Probiotec, de la sección de Microbiología de la Facultad de Ciencias Pecuarias y la sección de Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño.

Las cepas usadas fueron *L. lactis* ATCC 11454, *S. aureus* ATCC 25923 y *S. epidermidis* ATCC 12228. Su reconstitución se hizo de acuerdo con las recomendaciones del proveedor (instrucciones para

microorganismos KWIK-STIK™). Veinticuatro horas después de reconstituidas se verificó el crecimiento y desarrollo de las cepas. A continuación se hizo repique de las bacterias en cajas con agar MRS (De Man, Roca und Sharpe Broth Microbiology 02-135 Scharlau 500 g) y agar Baird Parker (CM 0275 Oxoid 500 g) para la bacteria láctica y las patógenas, respectivamente; para ello se tomó una alícuota con el método de estrías y se incubó por 24 h a 35 °C para *L. lactis* y 42 °C para *S. aureus* y *S. epidermidis*. Transcurrido este tiempo, se constató el crecimiento de las bacterias y se evaluó su morfología tanto macroscópica como microscópica. Finalmente se confirmó la pureza del cultivo mediante tinción de Gram.

La cepa de *L. lactis* fue conservada mediante repique cada cinco días en cajas de Petri con agar MRS (medio sólido) y cada ocho días en tubos con caldo MRS (medio líquido). Las cepas patógenas se conservaron mediante agar Baird Parker y caldo BHI cada cinco y ocho días respectivamente. Las muestras obtenidas se refrigeraron a 4 °C en tubos Eppendorf que contenían 1 ml con una relación v/v de 75 % de glicerina y 25 % de la cepa, para su posterior utilización.

Luego se tomó un Erlenmeyer con 40 ml de caldo MRS comercial y se inoculó con la cepa de *L. lactis* para incubar por 24 h a 37 °C. Después de la incubación se realizó un repique de 4 ml del anterior preparado y se transfirió a 40 ml de caldo MRS comercial, para incubar nuevamente en las condiciones anteriores. El inóculo se ajustó de acuerdo con la metodología propuesta por Crueger y Crueger (6); para ello se preparó 90 ml de caldo MRS estéril, el cual se inoculó con 10 ml de la cepa láctica para ser incubada de nuevo. Al terminar la incubación se tomó 1 ml de muestra y se observó en el espectrofotómetro a 625 nm con el fin de determinar el número de bacterias por mililitro. En los casos

en los que la población fue superior a la establecida, se ajustó mediante la metodología propuesta por Guerrero citado por Montes, Santacruz y Sañudo (7) y Jurado-Gómez (8).

Se evaluó la viabilidad de *L. lactis* a tres concentraciones de sales biliares bovinas (0,5, 1 y 2 %) y a dos concentraciones de bilis bovina sigma (1 y 1,2 %) mediante la metodología propuesta por Cai, Suyanandana, Saman y Benno (9). Inicialmente la cepa se cultivó en caldo MRS durante 24 h; luego se tomaron muestras del anterior cultivo y se sembraron en caldo MRS con las concentraciones de sales biliares y bilis bovina, cada concentración de manera separada. De la anterior preparación se tomaron alícuotas y se cultivaron en agar MRS con azul de anilina a 32 °C durante 48 h. Finalmente, se determinó el crecimiento de la bacteria, se tuvieron en cuenta valores iguales o superiores a 10^9 UFC/ml como conteos viables de la bacteria. El criterio de selección de las concentraciones respondió a valores similares a los encontrados en especies domésticas como los bovinos.

La cepa láctica se evaluó a tres pH (2,5; 4,5 y 7). Para ello se realizó siembra de la bacteria láctica en agar MRS y se incubó por 3 h (periodo de evaluación). Durante este tiempo se realizaron mediciones del pH cada hora. Se ajustó el pH con la adición de ácido tartárico con el fin de inhibir el efecto del ácido láctico (9).

Se efectuó la prueba de catalasa en *L. lactis* (9). Para ello se tomó una alícuota de la bacteria y se colocó en una lámina portaobjetos. Después se adicionaron dos gotas de peróxido de hidrógeno y se determinó la producción de burbujas en la muestra.

También se realizó la prueba de producción de gas (10). Para ello se depositó 5 % de glucosa anhidra en tubos con caldo MRS, con una previa inclusión

de tubos Durham invertidos. En cada tubo de ensayo se cultivó la bacteria y se incubó a 37 °C por 24 h. Finalmente, se determinó la presencia de gas en los tubos Durham. La presencia de gas en los tubos se definió como positiva y en caso contrario negativa.

Se evaluó la viabilidad de *L. lactis* a temperaturas de 38 y 45 °C, tomando como referencia la fase exponencial de crecimiento (14:24 h). El procedimiento se basó en lo propuesto por Crueger y Crueger (6); para ello se ajustó el inóculo de acuerdo con la escala de MacFarland 0,125. La incubación duró 16:48 h luego de iniciada la prueba. Enseguida se hicieron diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-12} en agua peptonada y se sembraron en cajas de Petri con azul de anilina comenzando en la disolución de 10^{-8} hasta la máxima disolución. Las cajas se incubaron por 48 h a 37 °C para determinar el recuento de colonias en UFC/ml.

Se tomó una muestra de sobrenadante y se identificó el contenido de péptidos mediante HPLC. Para ello se tomó 1 ml de muestra; se pasó por filtros de jeringa PVDF, Pall de 0,25 μ m. La muestra se conservó en congelación (-20 °C), protegida de la luz hasta su análisis. La identificación de péptidos se realizó mediante el análisis de los espectros UV de los picos integrados que se detectaron mediante el sistema de detección PDA. Se empleó como patrón de referencia una mezcla de péptidos (Sigma H2016). Se realizaron cuatro repeticiones para la muestra.

Se determinó la producción de ácidos orgánicos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) (11). Para ello se tomó caldo de crecimiento y se centrifugó a 8500 rpm; luego se filtró el sobrenadante a través de membrana de 0,25 μ m y se determinaron los ácidos orgánicos presentes 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. La columna es BIORAD aminex HPX87 H con soporte de resina trasplantada H+ (copolímero de estireno y bisulfato de divinilbenzeno).

La cinética de fermentación de *L. lactis* se efectuó en los medios MRS y Pro; este último es un medio de cultivo no comercial desarrollado por Ramírez (12). Para cada cinética se tomó un erlenmeyer con 600 ml del medio y la bacteria ajustada (540 ml del medio y 60 ml de inóculo) a 32 °C, según lo recomendado por Guerrero citado por Montes, Santacruz y Sañudo (7), en agitación constante a 100 rpm. Las variables evaluadas durante la cinética fueron: conteo de microorganismos viables (UFC/ml), determinación de pH, determinación de azúcar total, proteína y producción de ácido láctico. Las mediciones se realizaron cada 2 h y 24 min durante un periodo de 24 h.

Para el conteo de viables se diluyó 1 ml de muestra en 9 ml de agua peptonada al 0,1 % y se hicieron diluciones decimales para transferir a cajas de Petri con medio MRS con azul de anilina (0,1 ml) para siembra en superficie. Las cajas se incubaron a 32 °C y se observaron entre 24 y 48 h. Solo se consideraron las cajas de Petri con conteos de UFC/ml entre 30 y 300 colonias. El número de colonias se multiplicó por el inverso de la dilución y por 10 para obtener las UFC/ml formadas (13).

El pH se determinó con la toma de una muestra de inóculo y se midió con pH metrodigital JENCO® VisionPlus. La determinación de azúcar total se realizó por el método de Dubois y colaboradores (14); se preparó previamente una curva patrón con diferentes concentraciones de la solución patrón (glucosa). Los valores obtenidos en densidad óptica (D. O.) a 625 nm se graficaron contra la concentración en mg/l y se obtuvieron los valores de la ecuación de la línea recta.

La proteína se determinó con el método de Lowry y colaboradores, con modificación de Malara y Charra (15). Para ello se usó una curva de calibración a partir de seroalbúmina bovina. La muestra obtenida se cuantificó mediante la absorbancia en espectrofotómetro a 625 nm. Los valores obtenidos se graficaron contra la concentración y se obtuvo la ecuación de la línea recta.

$$y = mX + b$$

y = absorbancia

m = pendiente

X = concentración de proteína

b = ordenada al origen

Se determinó el ácido láctico mediante titulación con hidróxido de sodio en concentración de 1N (11). La producción de biomasa se determinó mediante el procedimiento propuesto por Crueger y Crueger (6) y Rodríguez y colaboradores (16). La velocidad específica de crecimiento μ_{max} se determinó así:

$$\mu_{max} = \frac{(d \ln x)}{dt}$$

Donde:

μ_{max} = velocidad específica de crecimiento en la fase logarítmica.

El tiempo de duplicación celular (t_d) se determinó teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

$$t_d = \frac{(\ln 2)}{\mu_{max}}$$

Se evaluó la susceptibilidad de las cepas *L. lactis*, *S. aureus* y *S. epidermidis* mediante discos impregnados con los antibióticos dicloxacilina (DCX 1 µg), cefepime (FEP 30 µg), penicilina (P 10 IU) y cefalotina (KF 30 µg), por medio de la metodología propuesta por Bauer, Kirby y Sherris (17). Se tomó

una muestra de las cepas y se transfirieron a un tubo con 1 ml de agua destilada (1 tubo por cepa). Se incubó a 35 °C hasta obtener la turbidez ópticamente comparable del estándar de 0,5 MacFarland, una densidad óptica de 0,125 equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Luego de ajustados los inóculos, los microorganismos fueron transferidos en cajas de Petri con agar Müeller-Hilton. Sobre el medio se colocaron los discos de antibiótico con el uso de una pinza estéril, utilizando una caja por antibiótico evaluado; las cajas fueron incubadas por 18 h a 35 °C para posteriormente medir el diámetro de halo producido alrededor de los sensidiscos.

Se realizaron pruebas de inhibición *in vitro* de *L. lactis* sobre *S. aureus* y *S. epidermidis* mediante la metodología propuesta por Tagg y McGiven (18) modificada. Para ello se tomaron discos de agar MRS con azul de anilina cultivados previamente con *L. lactis* a concentraciones de 25, 50 y 100 µl, realizado el ajuste a escala MacFarland 0,5. Los discos se colocaron en cajas de Petri con agar Müeller Hilton previamente incubadas con las bacterias patógenas en forma separada. Las cajas se incubaron por 18 h a 32 °C. Al terminar el tiempo de incubación, se midió en milímetros el halo de inhibición producido alrededor de los discos de agar.

Se evaluó el sobrenadante de *L. lactis*. Para ello se sembró la bacteria de acuerdo con Crueger y Crueger (6) y se ajustó a patrón 1 en la escala de MacFarland (concentración $3,0 \times 10^8$). Se tomó 1,5 ml del sembrado y se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min a 4 °C en tubos Eppendorf de 1,5 ml. El sobrenadante obtenido se utilizó de dos maneras: la primera sin filtrar y la segunda filtrado con membrana de 0,20 µm. La actividad bactericida se observó con dos métodos de difusión modificados: discos y cilindros de plástico.

Para el primero se tomaron discos de papel Pads de 6 mm preesterilizados a 121 °C y 15 PSI por

15 min, los cuales se impregnaron en cantidades de 50, 75 y 100 µl del sobrenadante de *L. lactis* en cámara de flujo laminar tipo II; estos se colocaron en cajas de Petri previamente cultivadas con las bacterias patógenas en agar Müeller-Hilton, para incubarse a 35 °C por 18 h. En el segundo método se utilizaron puntas de pipeta esterilizadas cortadas a 6 mm de diámetro; adentro se adicionaron las mismas cantidades de sobrenadante y se incubaron en las condiciones anteriormente mencionadas. Para determinar el grado de inhibición se tomó la distancia entre el borde del disco o pozo hasta el borde del halo producido. Distancias iguales o superiores a 2 mm (19) se consideraron como sensibles para la bacteria.

El análisis de los datos se realizó mediante el paquete estadístico SAS 9.1 (20). Para evaluar la cinética de crecimiento en los dos medios (MRS y Pro), se usó un diseño de medidas repetidas en el tiempo (procedimiento PROG MIXED).

$$y_{ijk} = \mu + A_i + B_k + (A*B)_{ik} + \varepsilon_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

- y_{ijk} = observación *ijk*
- μ = media general
- A_i = efecto de tratamiento
- B_k = efecto del tiempo
- $(A*B)_{ik}$ = efecto de interacción entre los tratamientos *i* y el tiempo *k*
- ε_{ij} = error aleatorio y covarianza entre medidas repetidas
- ε_{ijk} = error aleatorio

Se obtuvieron ecuaciones de regresión para las variables, consumo de azúcar, pH, acidez y proteína usando como variable dependiente las UFC/ml (procedimiento PROC REG).

$$Y = \beta_0 + \beta_{x_i} + e$$

Donde:

y = variable por evaluar

β_0 = intercepto

β_{1x} = pendiente

e = error

RESULTADOS

La prueba de resistencia de la cepa a diferentes concentraciones de bilis bovina y sales biliares mostró viabilidad a concentraciones de 1,2% de bilis bovina y 0,5% de sales biliares, con valores de $4,0 \times 10^9$ y $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml, respectivamente. Sin embargo, se observa que la cepa láctica es susceptible a una concentración de 1% de bilis bovina y concentraciones de 1 y 2% de sales biliares, dado que no se encontró crecimiento en estas concentraciones.

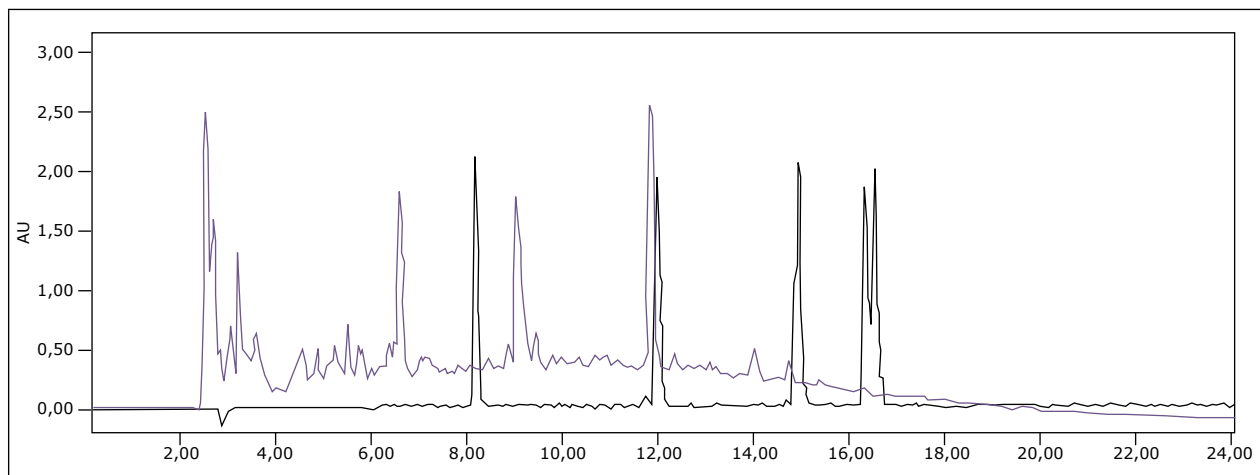
La evaluación del crecimiento de *L. lactis* a tres pH mostró que el crecimiento de la cepa láctica no se

vio afectado, con lo cual se observaron crecimientos de 3×10^{12} , $3,4 \times 10^{11}$ y 3×10^7 UFC/ml, para pH de 2,5, 4,5 y 7, respectivamente. La prueba de catalasa y la de producción de gas fueron negativas.

Se estableció la fase exponencial de la bacteria láctica a 14:24 h; por ello, el periodo de evaluación de la temperatura fue llevado a este tiempo. Se observó alta viabilidad a temperaturas de 38 y 45 °C, de lo cual se obtuvieron valores de $3,5 \times 10^{13}$ y $3,4 \times 10^{13}$ UFC/ml respectivamente.

El análisis de HPLC muestra en el pico número 8 del sobrenadante de *L. lactis* (tiempo 11,842 min), un tiempo de retención similar al pico número 2 de los péptidos estándar de calibración (figura 1). Esto permite inferir que existe la presencia de una cadena de aminoácidos VAL-TIR-VAL (PM: 379,5), con una concentración de 0,66 mg/ml (figura 1).

Figura 1. Cromatograma de *Lactobacillus lactis* (color azul) y estándar de péptidos (color negro) a 240 nm



La determinación de ácidos orgánicos mostró la presencia de ácido cítrico, ácido succínico, ácido láctico, ácido acético y etanol (tabla 1).

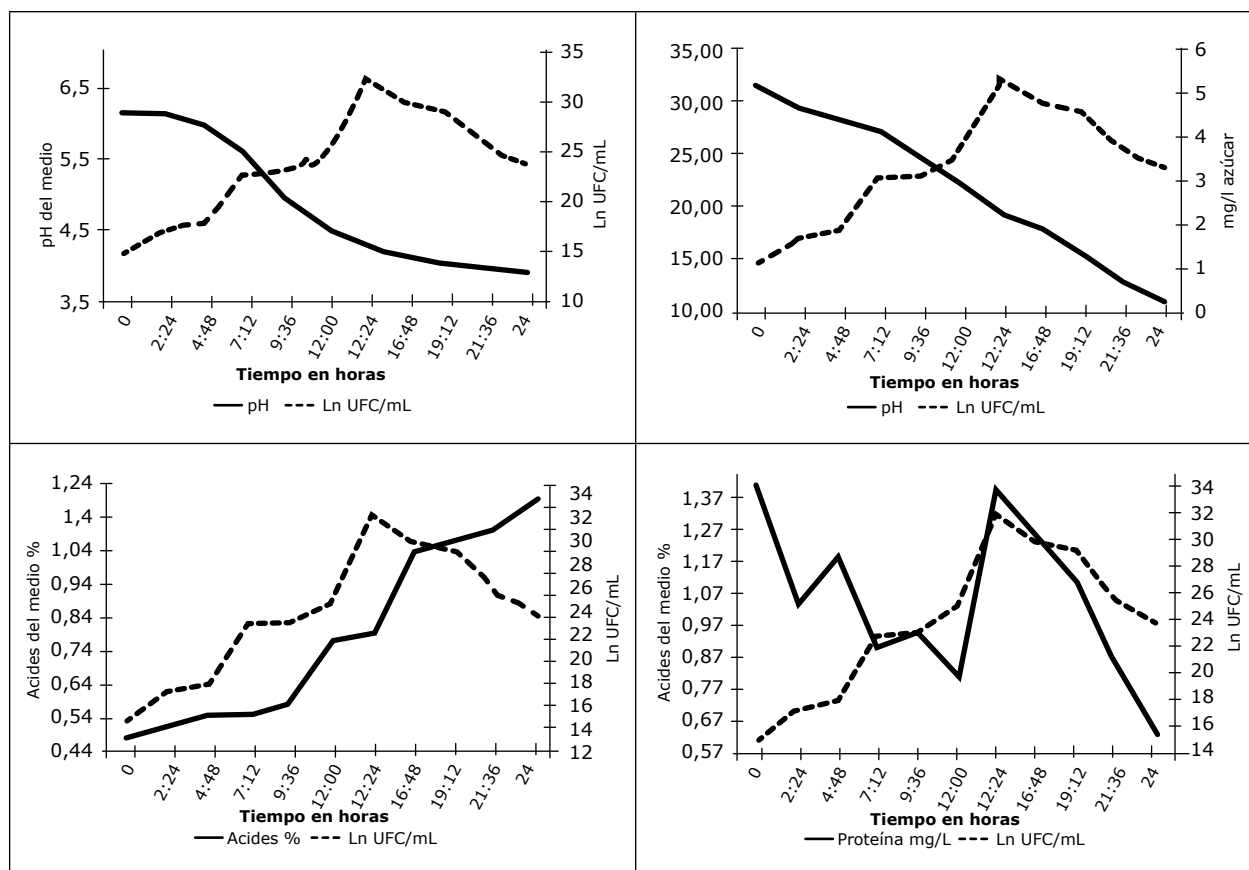
La cinética de crecimiento (UFC/ml), el pH, la acidez (%), el azúcar (mg/l) y la proteína se observan en la figura 2; se determinó que la fase exponencial de la cepa láctica se presentó a las 14:24 h de iniciado el proceso de fermentación (medio MRS), con un valor de 77×10^{10} UFC/ml, pH de 4,284, azúcar de 2,33 mg/l, acidez de 0,79 %

y 1,24 mg/l de proteína. El análisis de regresión indicó un descenso del pH de 0,123 ($p < 0,05$, $R^2 = 0,877$), una reducción de 0,172 mg/l de azúcar ($p < 0,05$, $R^2: 0,93$) y un incremento de 0,05 % de acidez ($p < 0,05$; $R^2: 0,80$). La proteína no presentó relación con las UFC/ml ($p > 0,05$, $R^2 = 0,14$).

Tabla 1. Perfil característico de la producción de ácidos orgánicos, concentración gramos/litro para *L. lactis*

Bacteria	Ácido cítrico	Glucosa	Ácido succínico	Ácido láctico	Ácido acético	Etol
<i>L. lactis</i>	2,71 (g/l)	3,95 (g/l)	0,68 (g/l)	26,1 (g/l)	1,38 (g/l)	0,88 (g/l)
	8,50 %		2,26 %	83,11 %	3,55 %	2,58 %

Figura 2. Determinación del pH, azúcar, acidez y proteína durante el crecimiento de *L. lactis*



La prueba de susceptibilidad antimicrobiana determinó el efecto inhibitorio de los antibióticos sobre las cepas de *L. lactis* y *S. aureus*; mientras que *S.*

epidermidis mostró resistencia a la penicilina, con susceptibilidad a los demás antibióticos (tabla 2 y figura 3).

La prueba de inhibición, mediante discos impregnado con *L. lactis* sobre *S. aureus* y *S. epidermidis*, mostró que la primera es resistente a la cepa lácti-

ca en las tres concentraciones evaluadas, mientras que se observa susceptibilidad de la segunda (figuras 4 y 6).

Tabla 2. Resultados del antibiograma sobre *L. lactis*, *S. aureus* y *S. epidermidis*

Cepa	Promedio de diámetros del halo de inhibición (mm)							
	DCX 1		FEP 30		P 10		KF 30	
<i>L. lactis</i>	15,0	S	35	S	34	S	24	S
<i>S. aureus</i>	32,5	S	37	S	47	S	46	S
<i>S. epidermidis</i>	32,5	S	42	S	23	R	40	S

DCX 1: dicloxacilina; FEP 30: cefepime; P 10: penicilina; KF 30: cefalotina; S: sensible, R: resistente.

Figura 3. Prueba de antibiograma de *Lactobacillus lactis*

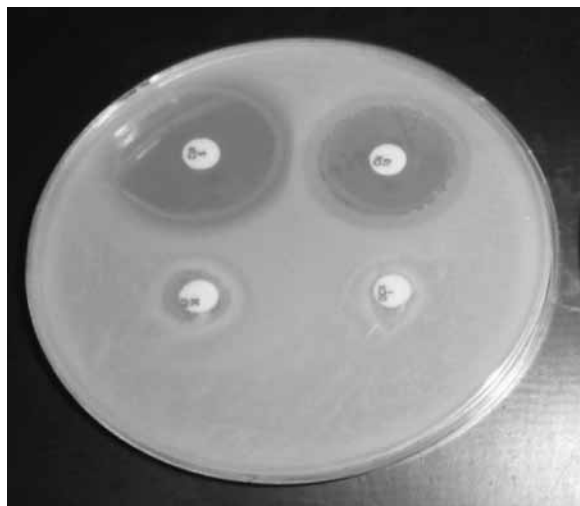
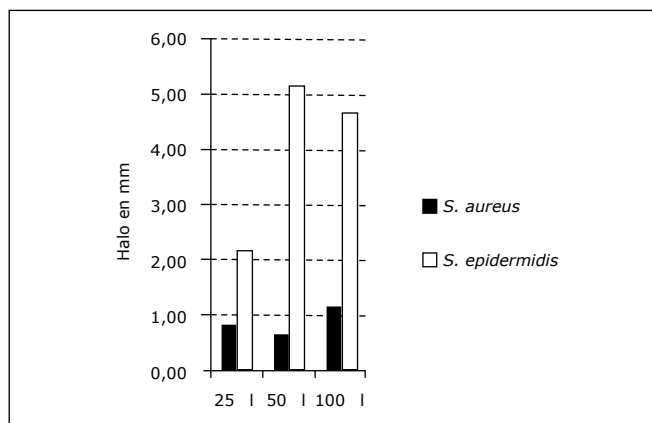


Figura 4. Acción inhibitoria de *Lactobacillus lactis* sobre *S. aureus* y *S. epidermidis* medido en mililitros



La prueba de inhibición usando el sobrenadante de *L. lactis* a través del método de sensidisco mostró que *S. aureus* presentó resistencia a 50 y 75 μl (halo < 2 mm) con el sobrenadante filtrado y sin filtrar respectivamente, con sensibilidad a las demás concentraciones (figuras 5 y 6). Por otra parte, *S. epidermidis* mostró susceptibilidad al sobrenadante únicamente a concentraciones

de 100 y 75 μl , para el sobrenadante filtrado y sin filtrar respectivamente. La prueba con el método de difusión en cilindro encontró susceptibilidad de *S. aureus* al sobrenadante filtrado y sin filtrar en todas las concentraciones, mientras que *S. epidermidis* mostró susceptibilidad a 50 y 100 μl para filtrado y sin filtrar respectivamente (figuras 5 y 6).

Figura 5. Inhibición por sobrenadante de *L. lactis* usando el método de sensidisco y cilindros, medido en mm: a) sobrenadante con sensidisco filtrado; b) sobrenadante con sensidisco sin filtrar; c) sobrenadante con cilindro filtrado; d) sobrenadante con cilindro sin filtrar

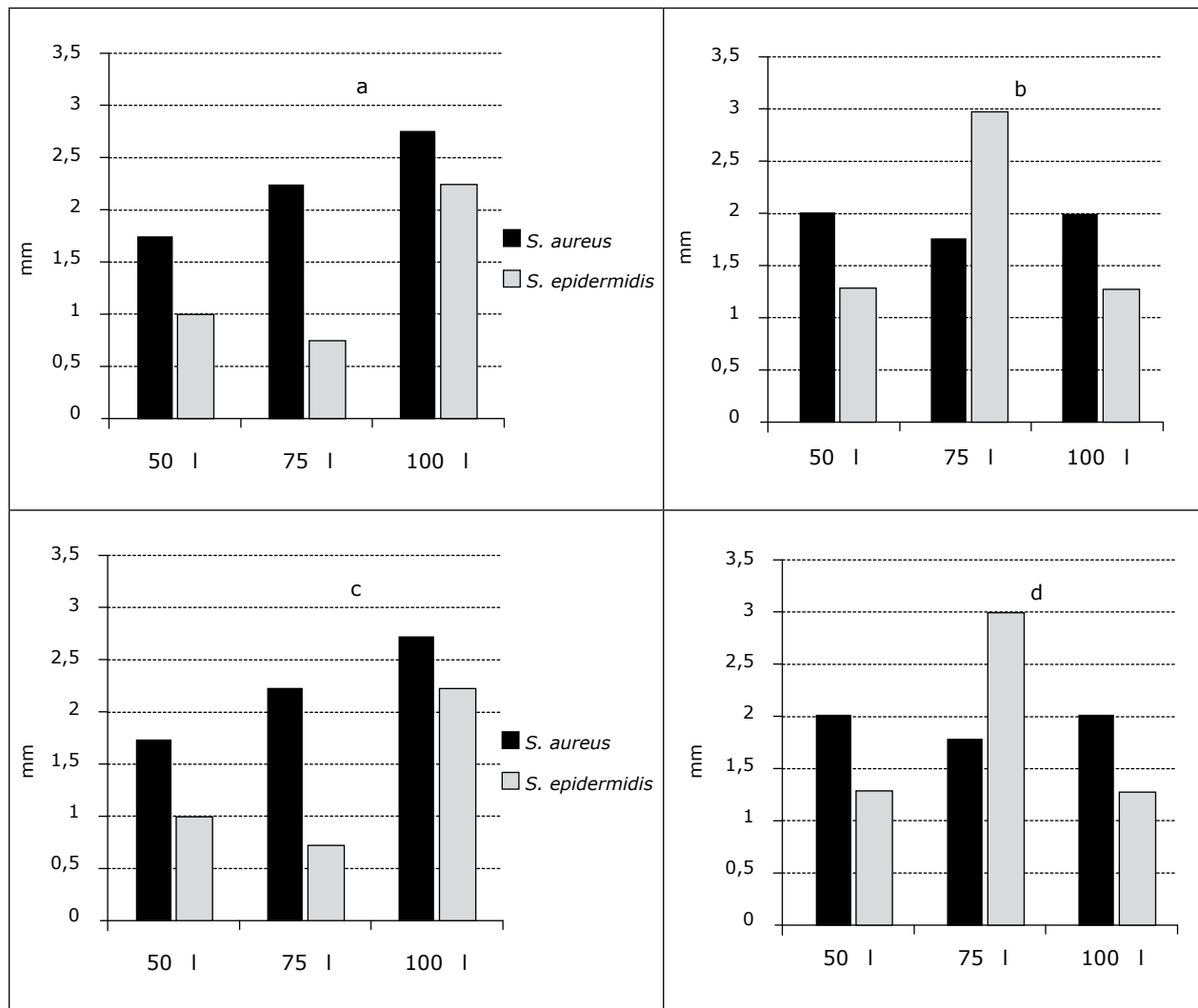


Figura 6. Halos de inhibición de *Lactobacillus lactis* (a) y su sobrenadante mediante sensibilizadores (b) y cilindros (c) sobre *S. aureus*



El resumen de la cinética de crecimiento en medio MRS se puede observar en la tabla 3.

Tabla 3. Datos de la cinética de crecimiento de *L. lactis* en el medio MRS

Variable	Valor
Fase latencia	0
Velocidad específica de crecimiento (μh^{-1})	0,657
Fin fase log (h)	14:24
Tiempo de duplicación (min)	49
Incremento celular total	2,50E + 09
Incremento celular final fase log	1,30E + 013
% azúcares consumidos totales	64,24
% azúcares consumidos fin fase log	42,34
Coefficiente de determinación R ²	0,86

DISCUSIÓN

Las pruebas a diferentes pH y diferentes temperaturas muestran un adecuado crecimiento de la bacteria láctica en condiciones *in vitro* similares a aquellas que puedan encontrarse en el medio ambiente gastrointestinal de algunos animales (21). Sin embargo, se debe tener en cuenta que la cepa láctica no tuvo crecimiento a concentraciones de 1 y 2 % de sales biliares. Al respecto, Iñíguez, Pérez y Acedo (22) y Carr, Chill y Maida (23) indican que la cepa probiótica, administrada de forma oral, debe resis-

tir el paso por el tracto gastrointestinal, de manera que pueda colonizar la mucosa. Las cepas deben ser tolerantes a cambios en el pH, bilis y sales biliares presentes (8-24).

Las bacterias lácticas no poseen enzima de catalasa, por lo cual la prueba generalmente es negativa, siendo esta una característica importante de las BAL, como se observó en la presente investigación. No obstante, se encuentran estudios en los que algunas cepas presentan resultados positivos (22,23).

Los resultados de producción de gas indican que la cepa podría usarse en animales, sin que ello produzca problemas de timpanismo o incluso en casos más severos la muerte del animal (24). Por su parte, los resultados de HPCL para ácidos orgánicos muestran que el porcentaje de ácido láctico presente en la muestra fue superior al 80 %. Esto determina que la bacteria evaluada es homofermentadora (11). Al respecto, Pérez-Chabela y Ramírez (25) mencionan que *L. lactis* se caracteriza por tener una elevada producción de ácido láctico; este metabolito genera una reducción del pH del medio y como consecuencia inhibe el crecimiento de otros microorganismos. Esta característica es importante debido a que una alta producción de ácido láctico demuestra un gran antagonismo de la cepa (12-30).

La fase exponencial de la cepa láctica mostró un alto crecimiento en el medio MRS, con valores superiores a 3×10^9 UFC/ml, lo cual garantiza una buena producción de inóculos industriales y de campo (11). El tiempo para alcanzar la fase exponencial fue similar al encontrado por Jurado-Gómez (8) en *L. plantarum*. De esta manera, el crecimiento de la bacteria láctica indica una adecuada competencia con bacterias patógenas, lo cual reduce la translocación y la inflamación intestinal producidas por estas (31,32) y la estimulación de mucina en las células HT-29 del huésped (33,34).

Los resultados para pH muestran que *L. lactis* tiene capacidad de crecimiento a pH bajo (4,28). El valor encontrado indica que favorece procesos de fermentación, en la producción de inóculos, lo cual muestra una excelente cualidad para resistir el ambiente estomacal e intestinal de algunos animales (35). Lo anterior demuestra que la cepa láctica es acidúrica, con crecimiento por debajo de un pH 5 (11). Los factores que permiten la resistencia a bajos pH son mecanismos celulares que lo mantienen cerca de la neutralidad, como es el caso de la bomba de extracción de protones (36).

Los valores encontrados para azúcar indican un adecuado aprovechamiento de los nutrientes presentes en el medio, lo que favorece su crecimiento. De esta manera, el medio posee las condiciones necesarias para producir inóculos industriales. Las BAL utilizan oligosacáridos como estaquirosa y rafinosa para su crecimiento.

La producción de ácido láctico indica que la bacteria tiene capacidad de alterar su medio; de esta manera favorece la inhibición de otros microorganismos (16). La fermentación de hexosas, a través de la vía de Embden-Meyerhoff, trae como resultado la producción de ácido láctico, ácido acético, etanol y ácido fórmico, dependiendo de la cepa, si

es homofermentadora o heterofermentadora (26). La acción del ácido láctico y la del acético se relacionan con la estructura no disociada de estas moléculas, que tiene la capacidad de difundirse en la membrana celular de las bacterias patógenas y provocar su muerte (27-37).

De acuerdo con el Clinical and Laboratory Standards Institute (28), una cepa bacteriana caracterizada como sensible a los antibióticos indica que puede ser tratada de forma apropiada con las dosis recomendadas para el tipo de infección que estas provocan. Los resultados indican que con la técnica *in vitro* la mayoría de las cepas evaluadas pueden ser tratadas con este tipo de antibióticos; sin embargo, los resultados obtenidos en *S. epidermidis* mostraron que las concentraciones de penicilina normalmente usadas no fueron suficientes para contrarrestar el crecimiento del microorganismo, con lo cual se observa el desarrollo de resistencia de la cepa al antibiótico, lo que indicaría que este no sería adecuado para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales. Estos productos al ser suministrados a los animales podrían mejorar el estado sanitario de estos, con la consiguiente mejora en el crecimiento y conversión alimenticia. Sin embargo, la preocupación actual se centra en el uso indiscriminado de este tipo de productos, que trae como consecuencia la resistencia cruzada de organismos patógenos que normalmente son tratados con antibióticos en los seres humanos (12-28).

Dado que *L. lactis* fue efectiva contra *S. epidermidis* podría ser una buena alternativa para su evaluación *in vivo*. De acuerdo con Ramírez (12), el efecto inhibitorio de estas bacterias se debe a la generación de compuestos microbianos que afectan el crecimiento de otros microorganismos; estos compuestos son bacteriocinas (compuesto de bajo peso molecular) y diferentes ácidos (láctico, acético, propiónico). Los resultados para *S. aureus* indican

que la cepa ha desarrollado mecanismos de defensa contra las sustancias secretadas por la bacteria láctica; al respecto, Aarestrup (29) indica que los microorganismos cambian en el tiempo, generando adaptaciones de acuerdo con las necesidades que les imponga el medio, factor que influye en su resistencia.

El sobrenadante de *L. lactis* posee características inhibitorias que posiblemente indican la presencia de enzimas, bacteriocinas y otros compuestos de bajo peso molecular, lo que demuestra que son efectivos en el control de *S. aureus* en condiciones *in vitro* (25, 26). Sin embargo, *S. epidermidis* es resistente a concentraciones menores de 75 µl; este fenómeno se produce como alteración de las características de la cepa patógena, que producen resistencia a los metabolitos lácticos, por lo cual no sería adecuado su uso en el control de este microorganismo. Resultados similares fueron encontrados por Pérez-Chabela y Ramírez (25), cuando se evaluó cepas de *L. lactis* aisladas de leche materna.

Entre las dos metodologías (sensidisco y cilindro) evaluadas se encuentra discrepancia sobre el tipo de halo producido, ya que el coeficiente de correlación fue bajo (0,24). Esto hace pensar que es necesario evaluar las metodologías a través de un mayor número de ensayos que permitan un mejor análisis e interpretación de los resultados. En otras investigaciones realizadas por Jurado-Gámez, se encontraron similitudes entre metodología, caso contrario a lo registrado en la presente investigación (8).

Lactobacillus lactis mostró adecuada capacidad de crecimiento, buenos parámetros de fermentación y efecto inhibitorio en cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* en condiciones *in vitro*. Con esto se muestran las características probióticas para su evaluación *in vivo*.

REFERENCIAS

1. Vásquez S, Suárez H, Zapata S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Rev Chil Nutr.* 2009;36(1):64-71.
2. Simova ED, Beshkoba DB, Dimitrov ZhP. Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. *J Appl Microbiol.* 2009;106(2):692-701.
3. Guía práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología. Probióticos y prebióticos. s. l.: s. e; 2011.
4. Segundo-Zaragoza C, Cervantes-Olivares RA, Ducoing-Watty AE, de la Peña-Montezuma A, Villa-Tanaca L. Yeast isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. *Rev Iberoam de Micol.* 2011;28(2):79-82.
5. Osteras O, Solverod L, Reksen O. Milk culture results in a Large Norwegian survey-effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering. *J Dairy Sci.* 2006;89(2):1010-23.
6. Crueger W, Crueger A. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Traducido por Paloma Liras Padín. España: Acribia; 1993.
7. Montes A, Santacruz A, Sañudo J. Efecto *in vitro* de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* sobre el crecimiento de un aislado de *Helicobacter pylori* [tesis de pregrado]. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño; 2003.
8. Jurado-Gámez H. Evaluación de bacterias ácido lácticas con características probióticas en la alimentación de lechones en la fase de precebo como alternativa al uso de antibióticos [tesis de doctorado]. Santiago de Cali: Universidad del Valle; 2010.
9. Cai Y, Suyanandana P, Saman P, Benno Y. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *J Gen Appl Microbiol.* 1999;45(4):177-84.

10. Dahl T, Midden W, Hartman P. Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *J Bacteriol.* 1989;171(2):4-5.
11. Brizuela M. Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos [tesis de doctorado]. La Habana: Cuba; 2003.
12. Ramírez C. Uso de bacterias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microorganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune [tesis de doctorado]. Curitiba: Universidad Federal do Paraná; 2005.
13. Laboratorio de Referencia Animal (LANARA). Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Ii-Métodos físico e químicos. Mel. Ministério da Agricultura. Brasília. 1981;2(25):1-15.
14. DuBois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem.* 1956;28(3):350-6.
15. Lowry O, Rosebroug N, Far L, Randall R. Proteine asurement with the folinphenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
16. Rodríguez L, Bueno G, Rodríguez D, Delgado G, Serrano P, Brizuela M. True and apparent yields and maintenance coefficient and their significance on fermentation kinetics. En: Roussos S, Soccol CR, Pandey A, Augur C, editors. *New Horizons Biotechnology.* Kluwer Academic Publishers; 2003. p. 163-172.
17. Bauer A, Kirby J, Sherris T. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45(4):493-6.
18. Tagg J, Mcgiven A. Assay system for Bacteriocins. *Appl Environ Microb.* 1971;21(5):943.
19. Estrada A, Gutiérrez L, Montoya O. Evaluación *in vitro* del efecto bacteriocida de cepas nativas de *Lactobacillus ssp.* contra *Salmonella sp.* y *Escherichia coli.* *Rev Fac Nal Agr Medellín.* 2005;58(1):2601-9.
20. SAS Institute Inc. SAS/STAT® 9.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc; 2004.
21. Calpa F, Chaspuengal A. Evaluación *in vitro* de *Lactobacillus casei* con características probióticas sobre *Yersinia pseudotuberculosis* [tesis de pregrado]. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño; 2013.
22. Iñiguez-Palomares C, Pérez-Morales R, Acedo-Felix E. Evaluation of probiotics properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Rev Latinoamer Microbiol.* 2007;49(3-4):46-54.
23. Carr F, Chill D, Maida N. The lactic acid bacteria: a literatura. *Critic Rev Microbiol.* 2001;28(4):281-370.
24. Puupponen-Pimiä R, Aura A, Osman-Caldentey K, Myllärinen P, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Poutanen K. Development of functional ingredients for gut health. *Trens Food Sci Technol.* 2002;13(1):3-11.
25. Pérez-Chabela M, Ramírez N. Utilización de bacterias lácticas termoresistentes como probióticos en productos cárnicos cocidos. *NACAMEH.* 2007;1(1):87-96.
26. De Roissart H, Luquet FM. Bacteries lactiques aspects fondamentaux et technologiques. France: Loriga; 1994.
27. Negri, L. El pH y la acidez de la leche [internet]. 2005 [citado 2013 dic 2]. Manual de referencias técnicas para el logro de leche de calidad. Disponible en: <http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/pH-y-acidez-en-leche2.pdf>
28. Clinical and Laboratory Standars Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Information Supplement. 2012;31(1):1-172.
29. Aarestrup, FM. Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark. *APMIS Suppl.* 2000;101:1-48.
30. Mishra C, Lambert J. Production of antimicrobial substances by probiotics. *Asia Pac J Clinic Nutr.* 1996;5(1):20-4.

31. Zamudio K, Zavaleta A. Estudio del potencial probiótico de lactobacilos aislados de fuentes naturales. *Cienc Investig*. 2003;6(1):30-5.
32. Pérez-Luyo A. Probióticos: Una alternativa en la prevención de la caries dental? *Rev Estomatol Herediana*. 2008;18(1):65-8.
33. Mack DR, Ahrné S, Hyde L, Wei S, Hollingsworth MA. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut*. 2003;52(6):827-33.
34. Johansson ML, Quednau M, Molin G, Ahrné S. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. *Lett Appl Microbiol*. 1995;21(3):155-9.
35. Prescott L, Harley J, Klein D. Normal microbiota and nonspecific host resistance in *Microbiology*. 5a ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, SAU; 2002.
36. Piard J, Desmazeaud M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*. 1991;71(5):525-41.
37. Brul S, Coote P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int J Food Microbiol*. 1999;50(1-2):1-17.

