

CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Lactobacillus lactis* Y DETERMINACIÓN DEL EFECTO PROBIÓTICO EN CEPAS PATÓGENAS¹

Henry Jurado-Gómez²
Verónica Jarrín-Jarrín³

RESUMEN

Introducción: Las bacterias ácido-lácticas se han estudiado por su capacidad de crecer en ambientes difíciles y generar antagonismos con otros microorganismos. La presente investigación buscó determinar los parámetros de la cinética de crecimiento de *Lactobacillus lactis* y su efecto probiótico sobre *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*. **Materiales y Métodos:** Se evaluó el crecimiento de la cepa láctica a concentraciones de 0,5, 1 y 2% de sales biliares; 1 y 1,5% de bilis; tres niveles de pH (2,5, 4,5 y 7) y dos de temperaturas (38 y 45°C). También se evaluó la susceptibilidad de todas las cepas a los antibióticos Dicloxacilina, Cefepime, Cefalotina, Ciprofloxacina, Pentamicina y Penicilina con la técnica de Kirby-Bauer. Se determinó la inhibición de *L. lactis* y su sobrenadante en *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. perfringens* y *S. aureus* y se estimaron los parámetros de: crecimiento, pH, consumo de azúcar, acidez y consumo de proteína durante la cinética de fermentación en medio MRS. Se determinaron péptidos presentes en el sobrenadante de *L. lactis* mediante HPLC. **Resultados:** Se obtuvo un crecimiento de $1,2 \times 10^9$ y $4,1 \times 10^9$ ufc/ml a 1,2% de bilis y a 0,5% de sales biliares; $1,1 \times 10^{11}$, $2,1 \times 10^{10}$ y $1,0 \times 10^{10}$

ufc/ml para pH 2,5, 4,5 y 7 respectivamente; y $1,7 \times 10^{13}$ y $1,4 \times 10^{13}$ ufc/ml para 45 y 38°C. La cepa láctica presentó resistencia a Dicloxacilina y Cefalotina; *C. perfringens*, a Dicloxacilina y Penicilina; *S. typhimurium* y *E. coli*, a Cefalotina; y *S. aureus*, a Dicloxacilina. *L. lactis* inhibió a *E. coli* y *C. perfringens*, y el sobrenadante incluyó a *S. aureus*. **Conclusión:** Se concluye que *L. lactis* presenta adecuados crecimientos en condiciones *in vitro* e inhibió a *E. coli*, *C. perfringens* y *S. aureus* pero no a *S. typhimurium*.

Palabras clave: probiótico, crecimiento, antagonismo microbiano, bacteria patógena, *Lactobacillus lactis*.

***Lactobacillus lactis* GROWTH KINETICS AND DETERMINATION OF PROBIOTIC EFFECT ON PATHOGEN STRAINS**

ABSTRACT

Introduction: Acid lactic bacteria have been studied for their ability to grow in harsh environments and generate antagonisms with other microorganisms. The present study

¹ Proyecto financiado por la Vicerrectoría de Postgrados y Relaciones Internacionales (VIPRI) de la Universidad de Nariño.

² Ph.D. en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Departamento de Producción y Procesamiento Animal, Programa de Zootecnia - Grupo de Investigación Fise-Probiotec. Pasto, Colombia. Correo electrónico: henryjugam@gmail.com

³ M.Sc. Universidad de Nariño, Facultad de Agroindustria, Programa de Agroindustria. Pasto, Colombia. Correo electrónico: Jarrin.veronica@gmail.com

sought to determine the kinetic parameters of growth of *Lactobacillus lactis* and its effect on *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens* and *Staphylococcus aureus*.

Materials and Methods: The growth of the lactic strain was evaluated at concentrations of 0.5, 1 and 2% bile salts; 1 and 1.5% bile; three levels of pH (2.5, 4.5 and 7) and two temperatures (38 and 45°C). Susceptibility of all strains to Dicloxacillin, Cefepime, Cephalothin, Ciprofloxacin, Gentamicin and Penicillin was also evaluated using Kirby-Bauer technique. Inhibition of *L. lactis* and its supernatant in *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* and *C. perfringens* and the following parameters were determined and estimated: growth, pH, sugar consumption, acidity and protein consumption during the kinetic fermentation in MRS. Peptides present in the *L. lactis* supernatant through HPLC were

determined. **Results:** Growth of 1.2×10^9 and 4.1×10^9 CFU/ml at 1.2% bile and 0.5% bile salt was obtained; 1.1×10^{11} , 2.1×10^{10} and 1.0×10^{10} CFU/ml for 2.5, 4.5 and 7 pH respectively; and 1.7×10^{13} and 1.4×10^{13} CFU/ml for 45 and 38°C. The lactic strain showed resistance to Cephalothin and Dicloxacilin; *C. perfringens*, to Penicillin and Dicloxacillin; *S. typhimurium* and *E. coli* to Cephalothin; and *S. aureus*, to Dicloxacillin. *L. lactis* inhibited *E. coli* and *C. perfringens*, and the supernatant included *S. aureus*. **Conclusion:** It is concluded that *L. lactis* present adequate growth in conditions *in vitro* and inhibited *E. coli*, *C. perfringens* and *S. aureus* but not *S. typhimurium*.

Key words: probiotic, growth, microbial antagonism, pathogenic bacteria, *Lactobacillus lactis*.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido-lácticas son un grupo de bacterias Gram-positivas que tiene como característica común la producción de ácido láctico a través de la fermentación de carbohidratos (1). Además, son microorganismos catalasa negativos y no productores de gas (2). Dentro de este grupo, los más importantes pertenecen al género *Lactobacillus*, conocidos como GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros) y considerados benéficos por su capacidad de digerir proteína, carbohidratos y grasas de los alimentos, cualidad que les permite ayudar al organismo huésped en la absorción de nutrientes esenciales como minerales, aminoácidos y vitaminas (3). Otra característica importante es su capacidad para inhibir otros microorganismos como bacterias patógenas causantes de problemas a nivel agroindustrial y sanitario (4).

Los principales mecanismos antagónicos de las bacterias ácido-lácticas son su capacidad de reducir el pH del medio, la producción de biocinas y la producción de ácidos orgánicos (5). El primero genera un ambiente inadecuado para el crecimiento de otros microorganismos, que necesitan pH cercanos a la neutralidad para sobrevivir en el medio (6). Las biocinas o bacteriocinas son sustancias proteínicas que actúan sobre la pared celular de otras bacterias generando la muerte, estas se han hecho importantes debido a su aplicación en la preservación de alimentos con la consecuente reducción de preservantes químicos (7, 8). Los ácidos orgánicos aumentan la acidez del medio e inhiben el crecimiento de otras bacterias (9).

Las condiciones gastrointestinales de los animales domésticos son un reto para toda bacteria que necesite colonizarlo; los cambios en el pH, los niveles de temperatura y la secreción

de bilis y sales biliares son barreras para un crecimiento adecuado de los microorganismos en el sistema digestivo (10). La evaluación de cepas probióticas requiere demostrar su viabilidad a estas condiciones, ya que la vía principal de administración de estos microorganismos es oral (11). Las evaluaciones *in vitro* permiten tener un primer acercamiento al potencial de la cepa como agente probiótico que pueda dar paso a una investigación a nivel de campo.

Los antibióticos son utilizados en el tratamiento de enfermedades bacterianas, sin embargo, las bacterias son seres vivos con una alta adaptabilidad y pueden desarrollar resistencia a los antibióticos (12). La resistencia es un factor natural de las bacterias, pero este proceso se ha visto acelerado por el uso indiscriminado de los antibióticos, ya sea administrados a humanos o a animales (13). Las bacterias transmiten la resistencia a las siguientes generaciones, de esta manera se ejerce una presión de selección sobre aquellos microorganismos resistentes a los antibióticos, por lo cual, cada vez se hace más difícil el control de bacterias que producen graves enfermedades para el ser humano (14).

Lactobacillus lactis es una bacteria ácido-láctica que se ha estudiado por presentar características adecuadas como probiótico, presenta un antagonismo a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (15). Una de sus principales características es la producción de nisina (bacteriocina), que le permite reducir las poblaciones bacterianas patógenas presentes en alimentos (16). Se encuentra en gran variedad de ambientes, desde el tracto gastrointestinal hasta productos fermentados como el yogurt (17). De igual manera, reduce el pH del medio y produce ácidos orgánicos que también afectan a microorganismos no deseados (18).

El objetivo de la presente investigación fue determinar los parámetros de la cinética de crecimiento de *Lactobacillus lactis* y su efecto probiótico sobre *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*.

METODOLOGÍA

Se usaron cepas de *Lactobacillus lactis* ATCC® 11454, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC® 25241, *Clostridium perfringens* ATCC® 13124 y *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, que fueron reconstituidas de acuerdo con la casa fabricante. Las cepas fueron repicadas, para su conservación, en medio sólido y líquido cada 5 y 8 días respectivamente. Para la cepa láctica se usó medios MRS (sólido y líquido), mientras que las bacterias patógenas se reconstituyeron en caldo BHI como medio líquido y como medio sólido agar MacConkey para *E. coli*, agar XLD para *S. typhimurium*, agar SPS para *C. perfringens* y agar BD Baird-Parker para *S. aureus*. Todas las bacterias fueron incubadas a 37°C durante 24 h y se refrigeraron a 4°C para su posterior uso.

El inóculo de *L. lactis* se obtuvo de la siguiente manera: en un Erlenmeyer con 40 ml de caldo MRS estéril, se depositó una alícuota de la cepa láctica y se incubó a 35°C por 24 h (preparado a). Al terminar el periodo de incubación, se tomaron 4 ml del preparado a y se depositaron en un nuevo Erlenmeyer con otros 40 ml de caldo MRS estéril al cual denominamos preparado b, este se incubó a la misma temperatura y tiempo de la primera incubación.

El ajuste del inóculo fue realizado a 10% v/v mediante la metodología de Crueger y Crueger (19), para ello se prepararon 90 ml de caldo MRS estéril y se añadieron 10 ml del preparado b. Después se realizó el conteo de bacterias por ml. Para el conteo se tomó 1 ml y se realizó lectura directa en espectrofotómetro a 625 nm. En los casos donde la población fue mayor a la establecida, se adicionó caldo estéril mediante cálculo de proporcionalidad, de la siguiente manera:

M_1 = población o densidad celular que se debe ajustar.

M_2 = 0,125 densidad óptica equivalente a $1,50 \times 10^8$ ufc/ml. Densidad utilizada primera fermentación.

$V_1 = 1$ ml volumen proveniente del inóculo total (10/90)l

$X_1 =$ cantidad que contiene M_2 .

$V_2 =$ lo que se agrega a 1 ml para ajustar a $1,50 \times 10^8$ ufc/ml.

$V_3 = 100$ ml cantidad total del inóculo.

$X_2 =$ cantidad de caldo MRS comercial estéril que se agrega a V_3 para ajustar la población al valor de M_2 .

Encontramos entonces X_1

M_1 ----- M_2

M_2 ----- X_1

$$X_1 = \left(\frac{M_2 * V_1}{M_1} \right)$$

Se evaluó el crecimiento *in vitro* de la cepa láctica, bajo tres concentraciones de sales biliares (0,5, 1 y 2%) y dos de bilis bovina (1 y 1,5%). Para cada concentración se cultivó la bacteria en MRS por 24 h, luego se tomaron alícuotas del cultivo y se depositaron en tubo de ensayo con caldo MRS en las concentraciones requeridas. De los tubos, se tomaron muestras, que se trasladaron a cajas de Petri con MRS y azul de anilina y se incubaron a 32°C por 48 h. Al terminar la incubación se realizó recuento de bacterias para cada muestra.

También, se determinó producción de gas para *L. lactis* de acuerdo con la metodología de Dahl et al. (20) y la reacción de catalasa de acuerdo con Cai et al. (21). Se evaluó el crecimiento de *L. lactis* a tres pH (2,5, 4,5 y 7) en medio MRS comercial durante un periodo de 3 h a 32°C. El pH durante la prueba fue ajustado con ácido tartárico.

Se determinó la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos 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) mediante la técnica de Kirby-Bauer (22).

Se evaluó el efecto de inhibición de *L. lactis* en las bacterias patógenas con la metodología propuesta por Tagg y McGiven (23) ajustada

a las condiciones de nuestro laboratorio, de la siguiente manera: se tomó una alícuota de cada bacteria patógena y fue ajustada a 0,5 en escala MacFarland, luego se depositó en cajas de Petri con agar Müeller-Hinton; sobre las cajas de Petri se colocaron discos de agar impregnados con *L. lactis* en concentraciones de 25, 50 y 100 µl. Finalmente, las cajas fueron incubadas a 32°C por 24 h. Transcurrido este tiempo, se midió la distancia del halo producido por la bacteria láctica, se utilizó como criterio de inhibición halos superiores a 2 mm (9).

También, se determinó el efecto de inhibición del sobrenadante de *L. lactis* sobre las bacterias patógenas con la metodología de Kirby-Bauer (22) modificada. Para obtener el sobrenadante se ajustó la bacteria láctica a 1 en escala MacFarland, se tomaron muestras de 1,5 ml y fueron depositadas en tubos Eppendorf para centrifugar a 15000 rpm y 4°C por 15 min. Se separó el sobrenadante y se dividió en dos partes, la primera sin filtrar y la segunda filtrada con papel filtro de 0,25 µm. Para la prueba se utilizaron dos metodologías, la primera usando discos de papel pads, y la segunda cilindros plásticos (24), sobre cada uno (discos y cilindros) se depositaron concentraciones de 50, 75 y 100 µl mediante micropipeta y se llevaron a incubación a 32°C por 24 h.

Se evaluó la cinética de fermentación en un medio no comercial PRO (25) y el medio comercial MRS. El procedimiento fue el mismo para ambos medios: en un Erlenmeyer se colocaron 60 ml de inóculo de *L. lactis* y 540 ml de medio, se incubó a 32°C y 100 rpm, sin control del pH. Se midió el crecimiento cada 2 h 24 min por 24 h (ufc/ml). Para ello se realizó dilución de 1 ml de muestra en 9 ml de agua peptonada al 0,1%, se realizaron diluciones decimales y se transfirieron a caja de Petri con medio MRS y azul de anilina (0,1 ml) para siembra en superficie, las cajas se incubaron a 32°C por 24 h, solo se tuvieron en cuenta los conteos entre 30 y 300 colonias, el número de colonias se multiplicó por el inverso de la dilución y 10 para obtener ufc/ml (26).

Durante la cinética de fermentación, únicamente en el medio MRS, se realizaron mediciones de pH, con un pHmetro digital; azúcar total, con el método de Dubois et al. (27); acidez mediante titulación con hidróxido de sodio (1N) (28) y proteína con el método de Lowry et al. (29). Los datos de crecimiento en el medio MRS se determinaron mediante la metodología de Crueger y Crueger (19) y Rodríguez-León et al. (30). Se estableció la velocidad máxima de crecimiento a través de la siguiente ecuación:

$$v_{\max} = \frac{dLnX}{dt}$$

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

$$td = \frac{Ln2}{v_{\max}}$$

Se determinó la viabilidad de *L. lactis* a dos temperaturas (38 y 45°C). La cepa fue evaluada hasta las 14 h 24 min (se tuvo en cuenta el tiempo necesario para llegar a la fase exponencial en el medio MRS). Se usó el procedimiento descrito por Crueger y Crueger (19), con ajuste del inóculo a 0,125 en escala de McFarland. Luego se hicieron diluciones de 10⁻¹ hasta 10⁻¹² con agua peptonada y se sembró en cajas de Petri con azul de anilina, enseguida se inició en la dilución 10⁻⁸ hasta 10⁻¹² a 37°C y 48 h, finalmente se determinó el número de ufc/ml.

En el sobrenadante de *L. lactis* se determinó el contenido de péptidos mediante espectrofotometría de alta densidad (HPLC), se tomó una alícuota de 25 ml y fue centrifugada a 18000 rpm por 30 min a 4°C; luego se filtraron 2 ml en jeringa de filtrar (0,25 micras) y finalmente fue llevado a lectura en el espectrofotómetro a 650 nm para obtención de los resultados.

Los procedimientos estadísticos se realizaron en el paquete SAS 9.1 (31). Se evaluó el crecimiento de los medios MRS y PRO durante la cinética de fermentación con el uso de medidas repetidas en el tiempo (PROC MIXED de SAS).

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

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.

Los resultados obtenidos en la prueba de inhibición con el sobrenadante (discos y cilindros plásticos) fueron correlacionados (Correlación de Pearson, PROC CORR de SAS), y los parámetros pH, acidez, azúcar y ácido láctico de la cinética de fermentación se relacionaron con el crecimiento (ufc/ml), mediante regresión lineal simple (PROC REG de SAS).

$$Y = \beta_0 + \beta_{x1} + e$$

donde:

y : variable a evaluar.

β_0 : intercepto.

β_{1x} : pendiente.

e : error.

RESULTADOS

Las pruebas de bilis bovina mostraron que *L. lactis* no crece a concentraciones de 1% pero sí a 1,2% con un valor promedio de 1,2 x 10⁹ ufc/ml. Las pruebas de sales biliares mostraron crecimientos únicamente a 0,5% con un valor promedio de 4,1 x 10⁹ ufc/ml. Las pruebas de catalasa y gas fueron negativas. El crecimiento a diferentes pH demostró que la cepa láctica presenta viabilidad al final de las tres horas, con valores de 1,1 x 10¹¹, 2,1 x 10¹⁰ y 1,0 x 10¹⁰ ufc/ml para pH 2,5, 4,5 y 7 respectivamente.

Los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antibióticos se observan en la Tabla 1 y en la Figura 1. La cepa láctica presentó resistencia a la Dicloxacilina y Cefalotina; *C. perfringens*, a Dicloxacilina y Penicilina; *S. typhimurium* y *E. coli*, a Cefalotina; y *S. aureus*, a Dicloxacilina.

Tabla 1. Susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos evaluados.

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. lactis</i>	8	R	10	R	8	R	46	S	26	S	35	S
Bacterias patógenas												
<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	S	NA	-
<i>E. coli</i>	NA	-	30	S	10	R	42	S	22	S	NA	-
<i>S. aureus</i>	6	R	20	S	45	S	NA	-	NA	-	20	S

DCX: Dicloxacilina; FEP: Cefepime; KF: Cefalotina; CIP: Ciprofloxacina; CN: Gentamicina; P 10: Penicilina; NA: No aplica; S: sensible; R: resistente. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011; EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2012).



Figura 1. Halo de inhibición de Dicloxacilina sobre *E. coli*.

La prueba de inhibición de *L. lactis* mostró susceptibilidad de *C. perfringens* y *E. coli* en las tres concentraciones (25, 50 y 100 µl); *S. typhimurium* a 100 µl; y *S. aureus* no fue inhibida en ninguna de las concentraciones (Tabla 2 y Figura 2).

Tabla 2. Efecto de inhibición de *L. lactis* sobre las bacterias patógenas.

CEPAS	25 µl	50 µl	100 µl
<i>S. aureus</i>	0,833	0,667	1,167
<i>C. perfringens</i>	3,333	4,667	5,000
<i>S. typhimurium</i>	1,667	1,500	2,000
<i>E. coli</i>	3,000	2,667	4,500

Valores iguales o superiores a 2 mm muestran susceptibilidad (19).

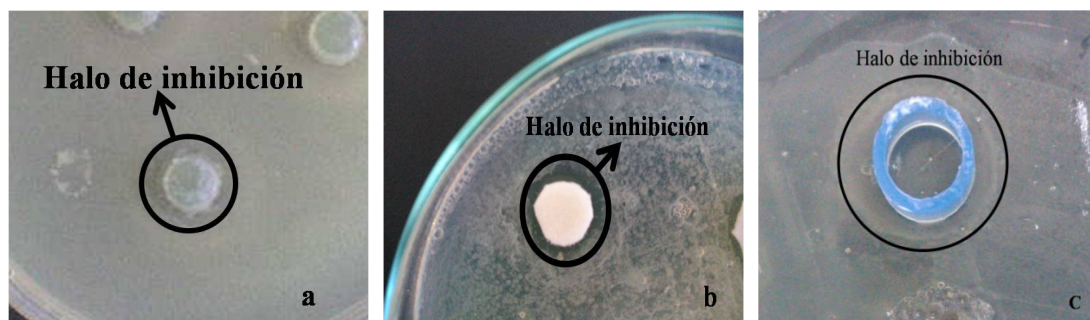


Figura 2. Halos de inhibición de *L. lactis* y su sobrenadante sobre las bacterias patógenas. a: disco de gel con *L. lactis*; b: sobrenadante en sensidisco; c: sobrenadante en cilindro.

La evaluación mediante el sensidisco impregnado de sobrenadante de *L. lactis* inhibió a *S. aureus* en las tres concentraciones (50,75 y 100 μ l); *C. perfringens* y *S. tiphymurium* a 50 μ l; y *E. coli* no fue inhibida (Tabla 3 y Figura 2). Mediante

la metodología de cilindros se encontró que *S. aureus* era susceptible a todas las concentraciones y *S. tiphymurium* a 100 y 50 μ l para el sobrenadante filtrado y sin filtrar respectivamente.

Tabla 3. Halos de inhibición de los discos y cilindros impregnados con sobrenadante de *L. lactis* sobre las bacterias patógenas.

CEPAS	Cilindros					
	Filtrado			Sin filtrar		
	Concentración					
	50 μ l	75 μ l	100 μ l	50 μ l	75 μ l	100 μ l
<i>S. aureus</i>	2,833	4,167	3,167	1,667	2,167	2,333
<i>C. perfringens</i>	0,500	1,167	1,167	0,167	0,000	0,500
<i>S. tiphymurium</i>	0,667	0,500	2,833	2,333	0,000	0,000
<i>E. coli</i>	1,333	0,333	1,167	0,833	0,333	0,833
CEPAS	Sensidiscos					
	Filtrados			Sin filtrar		
	Concentración					
	50 μ l	75 μ l	100 μ l	50 μ l	75 μ l	100 μ l
<i>S. aureus</i>	2,000	2,333	3,167	1,833	2,167	1,833
<i>C. perfringens</i>	2,000	1,750	1,750	0,750	1,750	1,000
<i>S. tiphymurium</i>	2,250	1,500	2,000	2,250	2,750	1,000
<i>E. coli</i>	1,750	1,250	1,500	3,500	2,750	3,500

No se encontró correlación entre los dos métodos usados (sensidisco, cilindro) para evaluar la inhibición del sobrenadante (Corr: 0,2658; p-value: 0,2092).

Los resultados de la cinética de fermentación, el pH, la acidez, el azúcar y proteína medidos durante el tiempo de fermentación se observan en la Figura 3.

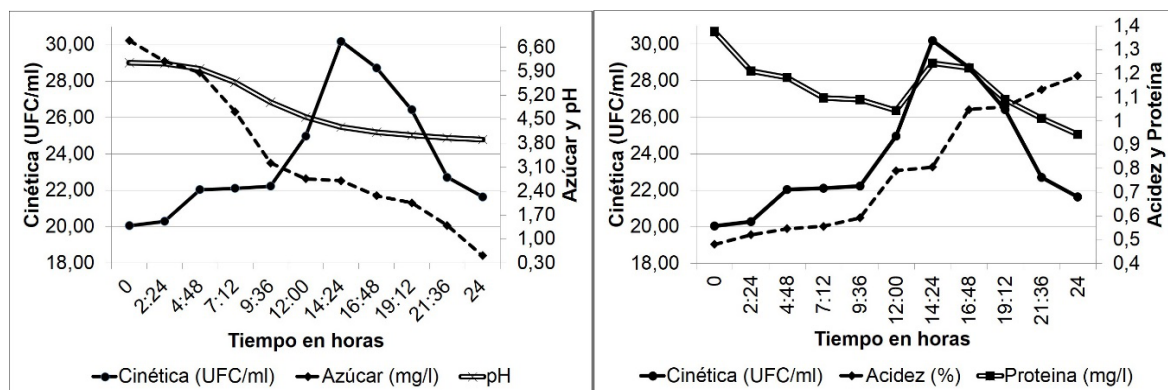


Figura 3. Cinética de fermentación, pH, azúcar, acidez y proteína de *L. lactis* en medio MRS.

La fase exponencial de *L. lactis* se obtuvo a las 14 h 24 min con un crecimiento de $1,3 \times 10^{13}$ ufc/ml en el medio MRS; durante este periodo se observó un valor de 4,26 en el pH; 0,806% en la acidez, 1,24 mg/L de proteína y 2,70 mg/L de azúcar. El análisis de regresión mostró un

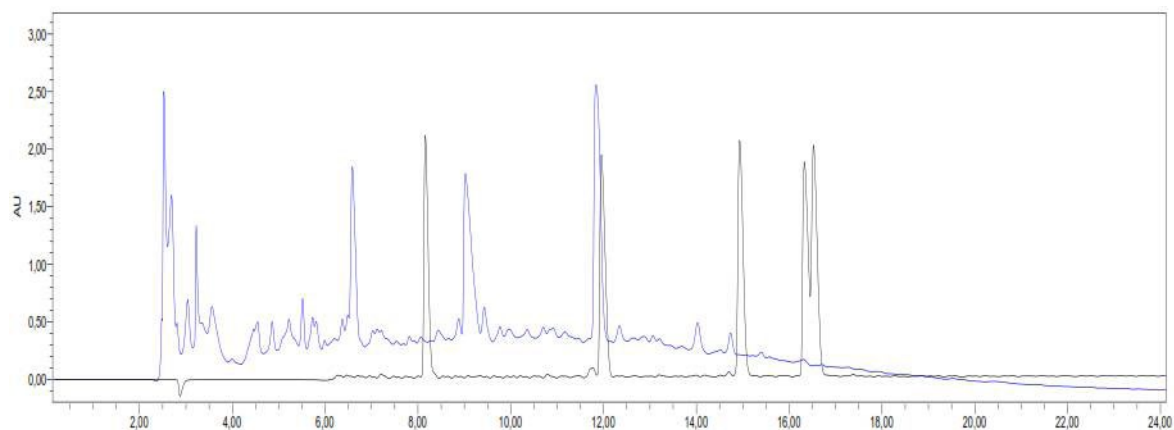
valor de 0,0339 para acidez ($R^2: 0,794$; p-value: 0,00437); -0,3834 para azúcar ($R^2: 0,530$; p-value: 0,03849); -0,1936 para pH ($R^2: 0,735$; p-value: 0,0084); y -0,0050 para proteína ($R^2: 0,023$; p-value: 0,741). Los datos de la cinética de crecimiento se pueden observar en la Tabla 4.

Tabla 4. Datos de la cinética de crecimiento.

Medio MRS	
Fase Lat	0
Vel. Esp. Crec. (μh^{-1})	14,48
Fin Fase Log (h)	14:24
Tiem. Dupl. (min)	2,87
Incr. Cel. Total	2,50E+09
Incr. Cel. Final	3,30E+13
% Azúc. Cons. Total (g/L)	92,41%
% Azúc. Cons. Fin. Total (g/L)	60,26%
% Prot. Cons. Total (g/l)	31,48%
% Prot. Cons. Fase Log (g/l)	9,69%
$r^2 =$	0,772

La prueba de viabilidad de la bacteria láctica a dos temperaturas mostró crecimientos adecuados con valores de $1,7 \times 10^{13}$ y $1,4 \times 10^{13}$ ufc/ml para 45 y 38°C respectivamente, a las 14 h 24 min (fase exponencial).

El análisis del sobrenadante de *L. lactis* por HPLC mostró una cadena de péptidos VAL-TIR-VAL en el tiempo 11,842 con una concentración de 0,66 mg/ml de muestra (figuras 4 y 5; tablas 5 y 6).



Color negro: curva patrón; color azul: muestra de sobrenadante.

Figura 4. Cromatograma del sobrenadante de *Lactobacillus lactis*.

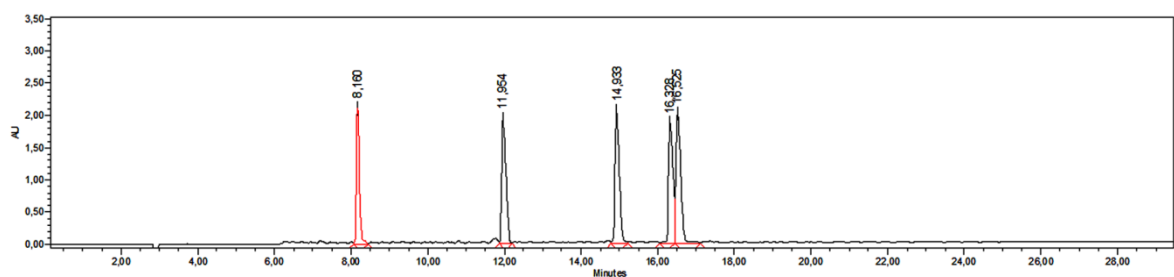


Figura 5. Cromatograma de péptidos estándar.

Tabla 5. Péptidos estándar.

No. Pico	Nombre	Tiempo de retención	Área	Cantidad relativa %
1	GLY-TYR	8,16	13536607	17,32
2	VAL-TYR-VAL	11,954	15409159	19,71
3	Metionine Enkefalin Acetate	14,933	16289583	20,84
4	Leucine Enkefalin	16,328	15163721	19,4
5	Angiotensin II Acetate	16,525	17776696	22,74

Tabla 6. Tiempos de retención encontrados en la muestra a través de HPLC.

No. Pico	Tiempo de retención	Cantidad relativa en % promedio
1	2,526	6,74
2	2,695	5,69
3	3,039	3,43
4	3,567	2,99
5	5,514	2,31
6	6,585	12,38
7	9,021	22,48
8	11,842	30,92
9	12,343	0,99
10	14,026	2,52
11	14,737	1,46
12	15,398	0,33

DISCUSIÓN

Para determinar la viabilidad de cepas probióticas es necesario realizar evaluación de los microorganismos en las condiciones gastrointestinales del animal huésped. Entre los factores que tienen preponderancia para la sobrevivencia de la cepa está su resistencia a la bilis y las sales biliares secretadas por el hígado. Un crecimiento superior a 10^9 ufc/ml es considerado adecuado para una buena colonización del tracto digestivo (25). De acuerdo con lo anterior, la cepa evaluada demostró apropiados crecimientos para bilis en condiciones *in vitro* a la concentración más baja. A pesar de no observarse crecimiento en las concentraciones más altas (1 y 2%), la cepa láctica en condiciones gastrointestinales no se verá expuesta a niveles tan elevados, por lo que los resultados encontrados muestran viabilidad de la cepa. Kumer et al. (32) encontraron que las cepas lácticas presentan tolerancia a las sales biliares, además disminuyen el colesterol en el organismo huésped. Iguales resultados fueron encontrados por Hamon et al. (33) cuando evaluaron a *L. plantarum*. Las sales biliares producen estrés en los microorganismos colonizadores del

sistema digestivo. Sin embargo, las bacterias generan respuestas fisiológicas como protección celular, generalmente modifican la membrana celular que les permiten tolerar estos cambios y adaptarse al medio gastrointestinal (34).

Las bacterias ácido-lácticas se caracterizan por ser catalasa negativa, característica observada en la presente investigación (35). La cepa láctica, al no producir gas, evita en el huésped problemas gastrointestinales como el timpanismo (24).

La evaluación a diferentes pH simula el tránsito de la cepa por el tracto gastrointestinal, los diferentes segmentos del tracto digestivo son afectados por variación en el pH del medio. Así, en el estómago se observan pH cercanos a 2 en especies domésticas, mientras que, en el intestino delgado, entre 5 a 7 como consecuencia de la secreción del hígado (36). Los crecimientos encontrados en la investigación muestran la viabilidad de la cepa láctica a estas condiciones, con poblaciones adecuadas para colonizar el tracto digestivo. Los *Lactobacillus* son considerados acidúricos debido a que crecen a pH inferiores a 5 (37). Su capacidad de resistencia a estos valores se debe a mecanismos

celulares que le permiten mantener el pH interno cerca de la neutralidad como la bomba de extracción de protones (38). Otro de los factores que argumentan este comportamiento se debe a su capacidad de producir ácidos orgánicos como resultado de la fermentación de carbohidratos, que con la acumulación disminuyen el pH del medio (39).

Determinar el efecto de inhibición de una bacteria láctica sobre cepas patógenas es importante para establecer su potencial probiótico. Los mecanismos que usa para generar antagonismo con otros microorganismos son varios, entre los que se encuentran producción de biocinas, reducción del pH, producción de ácidos orgánicos y producción de peróxido (40). Los resultados muestran que la cepa láctica inhibe a *C. perfringens* y *E. coli* en condiciones *in vitro*. Sankar et al. (41) encontraron susceptibilidad de *E. coli* y *S. aureus* por bacteriocinas producidas por *L. plantarum*, mientras que Rajaram et al. (42) encontraron que *L. lactis* inhibió a *E. coli* y *S. aureus*. A pesar de que las cepas *S. aureus* y *S. typhimurium* fueron resistentes a la cepa láctica, el sobrenadante inhibió a *S. aureus*, mostrando un efecto de la cepa en la bacteria patógena. Los resultados encontrados indican que *L. lactis* posee características adecuadas para el control de tres de las bacterias patógenas evaluadas. Los resultados encontrados entre metodologías para evaluar al sobrenadante fueron similares a otros estudios realizados por el autor (24). La metodología de cilindros debe continuar en evaluación con el fin de obtener suficiente información que permita determinar resultados válidos para su estimación.

El crecimiento durante la fase exponencial demostró eficiencia de la cepa láctica en la producción de inóculos, ya sea para su producción a nivel industrial, como para su

crecimiento a nivel gastrointestinal. El pH alcanzado durante la fase exponencial es cercano a 4, sin embargo, se observa que el pH del medio descendió hasta un valor de 3,8 demostrando el efecto de reducción del medio producido por la cepa láctica. Este descenso es importante, ya que permite inhibir el crecimiento de otras bacterias (43). La producción de ácido láctico está estrechamente relacionada con la reducción del pH; entre los productos de la fermentación de *L. lactis* se encuentra el ácido láctico y con ello el aumento de la acidez del medio (44). El porcentaje de consumo de azúcar fue de 92,41% durante todo el periodo de fermentación, esto demuestra el buen uso del nutriente por parte de la cepa láctica y, de manera indirecta, la producción de ácidos orgánicos como productos de la fermentación (45).

La temperatura interna de los animales homeotermos oscila entre los 37 y 41°C, de esta manera con la temperatura de 38°C se evalúa la viabilidad de la cepa a condiciones de temperatura corporal; como los resultados del crecimiento fueron altos, se puede argumentar que la cepa podría resistir la temperatura interna de algunos animales domésticos. La temperatura de 45°C evalúa la viabilidad de la cepa a tratamientos térmicos realizados en los alimentos balanceados que tiene como fin su peletización. Sin embargo, se debe realizar otro tipo de pruebas para determinar si la cepa resiste a los procesos industriales de obtención de alimentos balanceados.

Se concluye que *L. lactis* presenta parámetros de crecimiento adecuados en condiciones *in vitro* que simulan el ambiente del sistema digestivo, puede inhibir el crecimiento de *E. coli*, *C. perfringens* y *S. aureus*, pero no a *S. typhimurium* en condiciones *in vitro* y tolera temperaturas internas de su huésped.

REFERENCIAS

1. Cueto-Vigil MC, Acuña-Monsalve Y, Valenzuela-Riaño J. Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. *Actual Biol* 2010; 32(93):129-138.
2. Rajaram G, Manivasagan P, Thilagavathi B, Saravanakumar A. Purification and characterization of a Bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* isolated from marine environment. *Advance Journal of Food Science and Technology* 2010; 2(2):138-144.
3. Mohankumar A, Murugalatha N. Characterization and Antibacterial Activity of Bactereocin Producing *Lactobacillus* Isolated from Raw Cattle Milk Sample. *Intern. J. Biol.* 2011; 3(3):128-143.
4. González-Olivares LG, Jiménez-Guzmán J, Cruz-Guerrero A, Rodríguez-Serrano G, Gómez-Ruiz L, García-Garibay M. Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 2011; 10(2):179-188.
5. Marguet ER, Vallejo M, Sierralta-Chichisola V, Quispe JL. Actividad antagonista de bacterias lácticas aisladas del medio marino contra cepas de *Listeria*. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 2011; 45(2):305-310.
6. Pérez M, Laurencio M, Rondón AJ, Milian G, Bocourt R, Arteaga F. Actividad antimicrobiana de una mezcla probiótica de exclusión competitiva y su estabilidad en el tiempo. *Rev. Salud Anim.* 2011; 33(3):147-153.
7. Karthikeyan V, Santosh SW. Isolation and parcial characterization of bacteriocin produced from *Lactobacillus plantarum*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2009; 3(5):233-239.
8. Dal Bello B, Cocolin L, Zeppa G, Field D, Cotter PD, Hill C. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *Intern. J. Food Microbiol.* 2012; 153:58-65.
9. Estrada A, Gutiérrez L, Montoya O. Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 2005; 58(1):2601-2609.
10. Cajarville C, Brambillasca S, Zunino P. Utilización de prebióticos en monogástricos: aspectos fisiológicos y productivos relacionados al uso de subproductos de agroindustrias y de pasturas en lechones. *Revista Porcicultura Iberoamericana* 2011; 1-11.
11. Sánchez L, Vichi J, Llanes M, Castro E, Soler DM, Espinosa I, Kociubinski GL, Ferreira CL. Aislamiento y caracterización *in vitro* de cepas de *Lactobacillus* ssp. como candidato a probióticas. *Rev. Salud Anim.* 2011; 33(3):154-160.
12. Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. *Intern. J. Food Microbiol.* 2005; 105(3):281-295.
13. Cabrera CE, Gómez RF, Zúñiga AE. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica* 2007; 38(2):149-158.
14. Junod T, López-Martín J, Gädicke P. Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella enterica* en muestras de origen animal y alimentario. *Rev. Med. Chile.* 2013; 141:298-304.
15. Rajaram G, Manivasagan P, Gunasekaran U, Ramesh S, Ashokkumar S, Thilagavathi B, Saravanakumar A. Isolation, identification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus lactis* and its antimicrobial and cytotoxic properties. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2010; 4(12):895-902.
16. Dimov S, Ivanova P, Harizanova N. Genetics of bacteriocins biosynthesis by lactic acid bacteria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2005; 19(Supl 2):4-10.
17. Eggimann B, Bachmann M. Purification and Partial characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 1980; 40(5):876-882.

18. Lade H, Chitannad M, Gyananath G, Kadam T. Studies On Some Properties of Bacteriocins Produced by *Lactobacillus* Species Isolated from Agro-Based Waste. The Intern. J. Microbiol. 2006; 2(1):1-4.
19. Crueger W, Crueger A. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. 3 ed. España: Ed. Acribia; 1993.
20. Dahl T, Midden W, Hartman P. Killing of Gram-negative and Gram-positive Bacteria by Pure Singlet Oxygen. J Bacteriol 1989; 171(4):2188-2194.
21. Cai Y, Suyanandana P, Saman P, Benno Y. 1999. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. J Gen Appl Microbiol 1999; 45(4):177-184.
22. Bauer A, Kirby J, Sherris T. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 1966; 36:493-496.
23. Tagg J, McGiven A. 1971. Assay system for Bacteriocins. Appl. Environ. Microb. 1971; 21(5):943.
24. Jurado-Gómez H, Calpa-Yama F, Chaspuengal-Tulcán A. Determinación *in vitro* de la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum* sobre *Yersinia pseudotuberculosis* aislada de *Cavia porcellus*. Rev. Fac. Med. Vet. Zoot. 2014; 61(3):241-257.
25. Ramírez M. Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos [tesis]. Pachuca de Soto, México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2005.
26. LANARA, Laboratorio de Referencia Animal. 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.
27. Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal Chem 1956; 28:350-356.
28. Negri L. El pH y la acidez de la leche; 2005. Disponible en: <http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/pH-y-acidez-en-leche2.pdf> [consultado 2 de diciembre de 2013].
29. Lowry O, Rosebroug N, Far A, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193:265-75.
30. Rodríguez-León JA, Bueno G, Rodríguez DE, Delgado G, Serrano P, Brizuela MA. True and apparent yields and maintenance coefficient and their significance on fermentation kinetics. En: S. Roussos et al. (Eds.). New Horizons Biotechnology. Kluwer Academic Publishers; 2003. p. 163-172.
31. SAS Institute Inc. SAS/STAT® 9.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.; 2004.
32. Kumar R, Grover S, Kumar-Batish V. Hypocholesterolaemic effect of dietary inclusion of two putative probiotic bile salt hydrolase-producing *Lactobacillus plantarum* strains in Sprague-Dawley rats. British Journal of Nutrition 2011; 105:561-573.
33. Hamon E, Horvatovich P, Izquierdo E, Bringel F, Marchioni E, Aoudé-Werner D, Ennahar S. Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. BMC Microbiology 2011; 11:63.
34. Wu R, Sun Z, Wu J, Meng H, Zhang H. Effect of bile salts stress on protein synthesis of *Lactobacillus casei* Zhang revealed by 2 -dimensional gel electrophoresis. J. Dairy Sci. 2010; 93:3858-3868.
35. Adebayo-Tayo B, Onilude A. Screening of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Some Nigerian Fermented Food for EPS production. World Applied Science Journal 2008; 4(5):741-747.
36. Teijón-Rivera JM, Garrido-Pertierra A, Blanco-Gaitán D, Villaverde-Gutiérrez C, Mendoza-Oltras C, Ramírez-Rodrigo J. Fundamentos de bioquímica metabólica. Segunda edición. Madrid: Editorial TEBAR, S.L.; 2006.
37. Kandler O, Weiss N. Regular, Nonsporing Gram-positive Rods. En: Sneath PH, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (Eds.). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. Baltimore (USA): Williams & Wilkins; 1986. p. 1208-1235.

38. Piard J, Desmazeaud M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* 1991; 71:525-541.
39. Broadbent J, Larsen R, Deibel V, Steele J. Physiological and Transcriptional Response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to Acid Stress. *J. Bacteriol.* 2010; 192(9):2445-2458.
40. Tambekar D, Buhutada S. Studies on Antimicrobial Activity and Characteristic of Bacteriocins produced by *Lactobacillus* Strains Isolated from Milk of Domestic Animals. *The Internet Journal of Microbiology* 2008; 8(2).
41. Sankar N, Priyanka D, Reddy P, Rajanikanth P, Kumar K, Indira M. Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* Isolated from Cow Milk. *Inter. J. Microbiol. Res.* 2012; 3(2):133-137.
42. Rajaram G, Manivasagan P, Thilagavathi B, Saravanakumar A. Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus lactis* Isolated from Marine Environment. *Advance Journal of Food Science and Technology* 2010; 2(2):138-144.
43. Allende A, Martínez B, Selma V, Gil M, Suárez J, Rodríguez A. Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes in vitro* and in fresh-cut lettuce. *J. Food Microbiol.* 2007; 1-8.
44. Qin J, Zhao B, Wang X, Wang X, Wang L, Yu B, et al. Non-Sterilized Fermentative Production of Polymer-Grade L-Lactic Acid by a Newly Isolated Thermophilic Strain *Bacillus* sp. 2-6. *Plos One* 2009; 4(2):e4359.
45. Batdorj B, Trinetta V, Dalgalarrrondo M, Prévost H, Dousset X, Ivanova I, et al. Isolation, taxonomic identification and hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* T31, isolated from Mongolian yoghurt: inhibitory activity on food-borne pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 2007; 103:584-593.