

DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA, PRUEBAS DE CRECIMIENTO Y EFECTO DE INHIBICIÓN *IN VITRO* DE *Lactobacillus lactis* EN *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* Y *Escherichia coli*

H. Jurado-Gómez^{*1}, M. Gúzman-Insuasty², V. Jarrín-Jarrín³,

Artículo recibido: 27 de noviembre de 2014. Aprobado: 14 de abril de 2015

RESUMEN

Se determinó la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición *in vitro* de *L. lactis* sobre *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae* y *E. coli*. Los análisis se realizaron en el laboratorio de microbiología de la Universidad de Nariño. Se usó cepas de referencia y cepas aisladas en Pasto Colombia. Se estimó la inhibición de Gentamicina, Penicilina, Ciprofloxacina, Dicloxacilina, Cefepime, Cefalotina, Trimetropin Sulfa y Ampicilina. Se determinó la inhibición por *L. lactis* y su sobrenadante en las cepas patógenas. Se evaluó el crecimiento de *L. lactis* a diferentes condiciones gastrointestinales, además, del crecimiento en medio MRS y las variables pH, azúcar, acidez y proteína. Se determinaron los péptidos y ácidos orgánicos en el sobrenadante por HPLC. Se encontró resistencia a los antibióticos de las cepas aisladas, pero no de las cepas de referencia. Únicamente *S. aureus* (cepa referencia) fue resistente a *L. lactis*; las cepas de *S. agalactiae* presentaron resistencia; mientras que *S. epidermidis* y *E. coli* fueron susceptibilidad. El sobrenadante inhibió más a las bacterias de referencia, que a las aisladas. Se observó un crecimiento de 0 a $1,4 \times 10^{12}$ UFC/ml en las pruebas gastrointestinales. La fase exponencial fue a las 14:48 h (2×10^{11} UFC/ml), con un pH de 4,29; acidez de 0,62%; azúcar de 2,18 mg/l y 0,279 mg/l de proteína. Se encontró el péptido VAL-TIRL-VAL y 82,9% de ácido láctico. *L. lactis* inhibe las cepas patógenas en condiciones *in vitro* presentes en leche con mastitis subclínica de Nariño (Colombia).

Palabras claves: antibióticos, biomasa, funcionales, salud animal.

¹ Departamento de Producción y Procesamiento Animal, Programa de Zootecnia, Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño. Ciudad Universitaria Torobajo - Cllé 18 Cr 50, Pasto (Colombia).

² Grupo de investigación Fise-Probiotec, Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño. Ciudad Universitaria Torobajo - Cllé 18 Cr 50, Pasto (Colombia).

³ Programa de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Universidad de Nariño. Ciudad Universitaria Torobajo - Cllé 18 Cr 50, Pasto (Colombia).

* Autor para correspondencia: henryjugam@gmail.com

DETERMINATION OF KINETIC, TESTS AND GROWTH INHIBITION EFFECT OF *Lactobacillus lactis* IN VITRO IN *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* AND *Escherichia coli* IN HOLSTEIN COWS

ABSTRACT

The kinetics, growth tests and *in vitro* inhibition effect of *L. lactis* on *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae* and *E. coli* was determined. Analyses were performed in the laboratory of microbiology at the University of Nariño. Reference strains and strains isolated in Pasto Colombia was used. Inhibition of gentamicin, penicillin, ciprofloxacin, Dicloxacillin, Cefepime, cephalothin, ampicillin and trimethoprim sulfa estimated. Inhibition *L. lactis* strains pathogenic and supernatant was determined. *L. lactis* growth of various gastrointestinal conditions to further growth in MRS medium and varying pH, sugar, acidity and protein was assessed. Peptides and organic acids in the supernatant were determined by HPLC. Antibiotic resistance of the isolated strains was found, but no reference strains. Only *S. aureus* (reference strain) were resistant to *L. lactis*; *S. agalactiae* strains were resistant; while *S. epidermidis* and *E. coli* were susceptible. The supernatant inhibited more reference bacteria, which isolated. growth was observed 0 to 1.4×10^{12} CFU/ml in the gastrointestinal tests. Exponential phase was at 14:48 h (2×10^{11} CFU/ml), pH 4.29; acidity 0.62%; sugar 2.18 mg/l and 0.279 mg/l of protein. Peptide-VAL-TIR-VAL and 82.9% lactic acid was found. *L. lactis* inhibits pathogenic strains *in vitro* present in milk with subclinical mastitis from Nariño (Colombia) conditions.

Key words: antibiotics, biomass, functional, animal health.

INTRODUCCIÓN

Lactobacillus lactis pertenece al grupo de las bacterias ácido lácticas que son denominadas GRAS (generalmente reconocida como segura). Habitualmente es utilizada en la industria de alimentos fermentados, principalmente en la industria lechera desde hace muchas décadas (Norren *et al.* 2011). Este microorganismo se encuentra en la leche y algunos productos lácteos y se caracteriza por producir nisina; la cual tiene efecto antimicrobiano. Debido a esta característica, su aislamiento permite utilizarlo en la conservación de alimentos que tienen compromiso con bacterias patógenas responsables de las EDTA (Zhou *et al.* 2010).

Durante su evolución, las bacterias han adquirido diversos mecanismos de

adaptación que les permiten tener éxito en la competencia por nutrientes y espacio en su hábitat. Estos mecanismos incluyen desde el mejoramiento de los sistemas de quimiotaxis hasta el desarrollo de sistemas de defensa como la producción de péptidos antimicrobianos o bacteriocinas (López *et al.* 2008). Este tipo de sustancias son importantes para la industria alimentaria dado que inhiben el crecimiento de determinados microorganismos, catalogados como peligrosos para la salud humana y animal.

Uno de los principales problemas para la industria lechera es la mastitis, para la cual se han reportado más de 100 microorganismos causantes de infección intramamaria. La mayoría de las infecciones, incluidas las de importancia

económica, son ocasionadas por especies de estafilococos, estreptococos y bacterias Gram-negativas; estas últimas son esencialmente coliformes. Este tipo de microorganismos causan serias pérdidas a la industria, por lo cual la investigación se encuentra encaminada a la búsqueda de nuevas soluciones (Bedolla y Ponce de León 2008).

La presente investigación determinó la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición *in vitro* de *L. lactis* sobre las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Pecuarias, de la Universidad de Nariño, ubicada en la ciudad de Pasto (Colombia) con una temperatura promedio de 14°C, a 2540 msnm, 1084 mm de precipitación anual promedio y 76% de humedad relativa.

La cepa láctica usada en la investigación fue *Lactobacillus lactis* (ATCC 11454). Por su parte, se usaron cepas patógenas aisladas de la zona de estudio y cepas adquiridas mediante casa comercial de referencia: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813) y *Escherichia coli* (ATCC 25922).

La reconstitución de las cepas comerciales se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (patógenas y láctica). Posteriormente, para la conservación de la bacteria láctica se realizó repique en medio sólido (cajas con agar MRS) cada 5 días y en medio líquido (tubos con caldo MRS) cada 8 días; mientras que para las bacterias patógenas se usó caldo

BHI como medio líquido y como medio sólido, agar manitol para *Staphylococcus*, agar base sangre para *Streptococcus* y agar McConkey para *Escherichia coli*. Todos los preservados fueron incubados a 37°C y 24 horas, y llevados a refrigeración (4°C) hasta su utilización.

Para realizar el cultivo del inóculo de *L. lactis* se tomó un Erlenmeyer con 40 ml de caldo MRS estéril y se depositó una alícuota de la bacteria conservada; enseguida se incubó por un periodo de 24 horas a 35°C, al cabo del cual, se tomaron 4 ml del incubado y se depositaron en otros 40 ml de caldo MRS comercial que a su vez fueron incubados en las condiciones anteriormente mencionadas. Para ajustar el inóculo se tuvo en cuenta la metodología propuesta por Crueger y Crueger (1993) y Jurado-Gómez (2014). Por último, cuando se encontró una población superior a la establecida se adicionó caldo estéril teniendo en cuenta la propuesta de Montes *et al.* (2003) mostrada en Jurado-Gómez 2014.

Por su parte, para la obtención de bacterias patógenas aisladas, se tomaron varias muestras de leche con mastitis subclínica en la vereda Victoria, corregimiento de Catambuco, Municipio de San Juan de Pasto (Colombia) con temperatura promedio de 10°C, 3000 msnm y precipitación promedio anual de 1200 mm. Las muestras con grado 2 o 3 según el test de CMT (California Mastitis Test) (Valencia, *et al.* 2003) fueron llevadas al laboratorio para el aislamiento y caracterización.

Posteriormente, el aislamiento de las cepas patógenas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* presentes en leche de vacas con mastitis subclínica se realizó mediante el protocolo propuesto por la Clínica Veterinaria de la Universidad de Nariño para aislamiento de cocos

Gram positivos y bacilos Gram negativos (Rodríguez 2009).

Por otro lado, se determinó el crecimiento de la cepa láctica a concentraciones de 0,5; 1 y 2% de sales biliares bovinas y concentraciones de 1 y 1,2% de bilis bovina. Para ello, previamente la cepa se cultivó en caldo MRS durante 24 horas luego de lo cual, de este cultivo se realizó una nueva inoculación en caldo MRS con las diferentes concentraciones de sales biliares y bilis bovina de manera separada, luego se tomaron muestras y se cultivaron en agar MRS con azul de anilina, permaneciendo 48 horas a 32°C.

Más adelante, se realizaron pruebas de producción de gas (Dahl *et al.* 1989) y catalasa (Cai *et al.* 1999) a la bacteria láctica; también se evaluó el crecimiento de la cepa a tres niveles de pH (2; 4,5 y 7), registro realizado durante tres horas, con toma de muestras cada hora. Para ello, la cepa fue sembrada en medio MRS comercial y el pH se ajustó con la adición de ácido tartárico, para inhibir el efecto de la producción de ácido láctico. Las condiciones de incubación fueron de 32°C por 48 h.

Por otro lado, se evaluó la cinética de fermentación de *L. lactis* en dos medios de cultivo (MRS y Pro) (Jurado-Gómez 2010), para cada medio se tomó un Erlenmeyer al cual se le adicionaron 540 ml de medio y 60 ml de inóculo, luego se llevó a incubación (incubadora Shaker®) en agitación constante a 32°C y 100 rpm, el pH no fue controlado dada la resistencia de las cepas a niveles bajos. Durante la cinética se evaluó: conteo de microorganismos viables en placa (UFC/ml), determinación de pH, determinación de azúcar total y determinación de producción de ácido láctico. Las mediciones se realizaron cada 2:24 horas durante 24 horas.

El conteo de microorganismos viables en placa se determinó mediante la disolución de 1 ml de muestra en 9 ml de agua peptonada al 0,1%, se realizaron diluciones decimales que fueron transferidas a cajas de Petri, que contenían medio MRS con azul de anilina (0,1 ml) para siembra en superficie. Las cajas fueron incubadas a 32°C y se observaron entre 24 y 48 horas. Se tuvo en cuenta únicamente las cajas de Petri con conteos entre 30 y 300 colonias. El número de colonias fue multiplicado por el inverso de la dilución y por 10 para obtener UFC/ml (Lanara 1981).

Para determinar el pH se tomó una muestra del medio y se midió con pHmetro digital (JENCO® VisionPlus). Por su parte, el azúcar total se determinó mediante el método de Dubois (1956), para lo cual, se prepararon diferentes concentraciones de glucosa para crear una curva patrón mediante los valores obtenidos de la observación de las muestras a una densidad óptica de 625 nm. Los datos se graficaron contra la concentración en mg/l y finalmente se obtuvieron los valores de la línea recta.

El nivel de ácido láctico fue determinado mediante titulación con hidróxido de sodio (1N) (Negri 2005) y el de biomasa con los métodos de Crueger y Crueger (1993) y Rodríguez-León *et al.* (2003), para ello se estableció la velocidad máxima de crecimiento mediante la siguiente ecuación:

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

El tiempo de duplicación celular (td), se determinaron teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

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

El nivel de proteína se determinó con el método de Lowry *et al.* (1951), con modificación de Malara y Charra (1972), se realizó una curva de calibración mediante seroalbúmina bovina y se cuantificó la absorbancia en espectrofotómetro a 625 nm. Los valores obtenidos fueron graficados contra la concentración para obtener la ecuación de la línea recta.

Posteriormente, se evaluó la viabilidad de *L. lactis* a dos temperaturas 38 y 45°C, tomando como referencia la fase exponencial de crecimiento encontrada en la cinética de fermentación. El procedimiento se basó en lo propuesto por Crueger y Crueger (1993), para ello, se ajustó el inóculo de acuerdo con la escala de MacFarland a 0,125; la incubación duró 14:24 horas luego de iniciada la prueba, luego de lo cual se realizaron 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 horas a 37°C para determinar el recuento de colonias en UFC/ml.

Paso seguido, para determinar el contenido de péptidos presentes en el sobrenadante de *L. lactis*, se tomó una muestra y se identificaron los péptidos mediante espectrofotometría de alta eficiencia. Para ello, se tomaron 25 ml de sobrenadante que fueron centrifugados a 18000 rpm por un periodo de 30 min y 4°C, a continuación se pasaron por jeringas de filtrar 0,25 micras (2 ml) y finalmente se hizo la lectura en el espectrofotómetro y se obtuvieron los valores correspondientes.

El análisis de producción de ácidos orgánicos se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) (Brizuela 2003). Se tomó una alícuota de caldo de crecimiento y fue centrifugado a 8500

rpm, enseguida se filtró el sobrenadante con membrana 0,45 μm y se realizó la lectura por HPLC. Los ácidos orgánicos fueron determinados por HPLC así: solvente de fase móvil, ácido sulfúrico a pH 1,5; presión, 800-900 PSI; volumen inyectado, 20 L; temperatura del horno, 65°C; columna BIORAD aminex HPX87 H con soporte de resina trasplantada H+ (copolímero de estireno y bisulfato dedivinilbenzeno).

Posteriormente, con las cepas patógenas (aisladas y de referencia) y la bacteria láctica, se determinó la inhibición producida por los antibióticos: Gentamicina (CN 10 μg), Penicilina (P 10 IU), Ciprofloxacina (CIP 5 μg), Dicloxacilina (DCX 1 μg), Cefepime (FEP 30 μg), Cefalotina (KF 30 μg), Trimetropin Sulfa (25 μg) y Ampicilina (AM 10 μg) mediante la técnica de Bauer *et al.* (1966); para ello se tomaron alícuotas de las bacterias y se depositaron cada una en un tubo con 1 ml de agua destilada, luego los tubos fueron incubados a 35°C, hasta alcanzar la turbidez ópticamente comparable con el estándar 0,5 de MacFarland; después de ajustada la turbidez se transfirió cada cepa a cajas de Petri con agar Müller Hilton, distribuyéndose sobre este con un hisopo de algodón. Posteriormente, se tomaron, con pinza estéril, discos impregnados con los antibióticos y se depositaron sobre el agar, realizando ligera presión para que se adhirieran al medio, enseguida se invirtieron las cajas de Petri para evitar acumulación excesiva de humedad y se incubaron a 35°C por 18 horas; transcurrido este tiempo, se midió el halo formado entre el borde del disco y el borde máximo de inhibición.

Adicionalmente, se evaluó la inhibición producida por *L. lactis* sobre las bacterias patógenas (aisladas y de referencia), mediante la metodología de Tagg y McGiven

(1971). Se tomó una alícuota de *L. lactis* y se ajustó a 0,5 en la escala McFarland, para sembrar en cajas de Petri con agar MRS y azul de anilina a cantidades de 25, 50 y 100 μl que se incubaron a 32°C por 24 horas. Por su parte, las bacterias patógenas también fueron ajustadas a escala MacFarland 0,5 pero sembradas en cajas de Petri con agar Müeller Hilton y agar TSA (Tryptona Soya Agar). Del agar MRS incubado con la bacteria láctica se tomaron discos y se colocaron en las cajas de Petri con las bacterias patógenas (aisladas y de referencia), enseguida se incubaron a 32°C por 12 horas; luego de transcurrido este tiempo se procedió a medir los halos de inhibición, se determinó susceptibilidad de las cepas patógenas cuando el halo fue igual o superior a 2 mm (Estrada *et al.* 2005).

A partir de *L. lactis*, se extrajeron las biocinas presentes en el sobrenadante; para ello se ajustó la concentración de la bacteria a $3,0 \times 10^8$ UFC/ml (1 en la escala McFarland; 625 nm). De esta se tomaron varias muestras de 1,5 ml y se depositaron en tubos Eppendorf® para centrifugar a una temperatura de 4°C con 15000 rpm durante 15 min. Se tomó el sobrenadante de dos formas, la primera sin filtrar y la segunda filtrado, para esta última se usó papel filtro de 0,45 μm . Cada muestra se refrigeró a 4°C para posterior análisis. Paso seguido, los sobrenadantes, se evaluaron mediante la metodología de Bauer *et al.* (1966) modificada; el sobrenadante se colocó de dos formas: el primero, mediante papel pads, sobre el cual se depositaron concentraciones de 50, 75 y 100 μl y el segundo, mediante cilindros estériles de 6 mm de diámetro, sobre los cuales se depositaron las mismas concentraciones (los cilindros fueron obtenidos de puntas de pipeta estériles). Los discos y cilindros

fueron colocados en cajas de Petri con las bacterias patógenas y se realizó el mismo procedimiento para determinar la inhibición de *L. lactis*.

Los datos fueron evaluados mediante el paquete estadístico SAS 9.1 (2004). Para realizar la comparación de cinética de crecimiento entre los medios MRS y PRO se usaron medidas repetidas en el tiempo, con el procedimiento PROC 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

Finalmente, se obtuvieron las ecuaciones de regresión para las variables de la cinética de fermentación: conteo de microorganismos viables en placa (UFC/ml), pH, azúcar total y ácido láctico, mediante el procedimiento PROC REG de SAS, teniendo como variable dependiente el conteo de microorganismos viables en placa.

$$Y = \beta_0 + \beta_{1x} + e$$

donde:

y : variable a evaluar

β_0 : Intercepto.

β_{1x} : Pendiente.

e : error.

RESULTADOS

Las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* de leche de vaca con mastitis subclínica fueron identificadas y aisladas para su posterior uso.

La cepa láctica presentó dificultades al 1% de bilis bovina, ya que no presentó crecimiento a esta concentración; sin embargo, a una mayor concentración (1.2%) presentó buen comportamiento, ya que se obtuvo un valor de 5×10^9 UFC/ml. En el caso de las sales biliares se encontró crecimiento únicamente a la más baja concentración (0,5%) con valor de 5×10^8 UFC/ml.

Las pruebas de catalasa y producción de gas fueron negativas. Mientras que la prueba de pH (tres niveles) indicó crecimientos de $1,4 \times 10^{12}$; $6,4 \times 10^{11}$ y $7,5 \times 10^{11}$ para pH 2; 4,5 y 7 respectivamente. La temperatura mostró valores de $2,8 \times 10^{12}$ y $3,1 \times 10^{12}$ UFC/ml para 38 y 45°C.

En la Figura 1, se puede observar la cinética de crecimiento de *L. lactis* comparada con las variables pH, acidez, azúcar y proteína. Se encontró que la fase de crecimiento exponencial en el medio MRS se desarrolló a las 14:24 horas de iniciado el proceso de incubación, con un valor de 2×10^{11} UFC/ml.

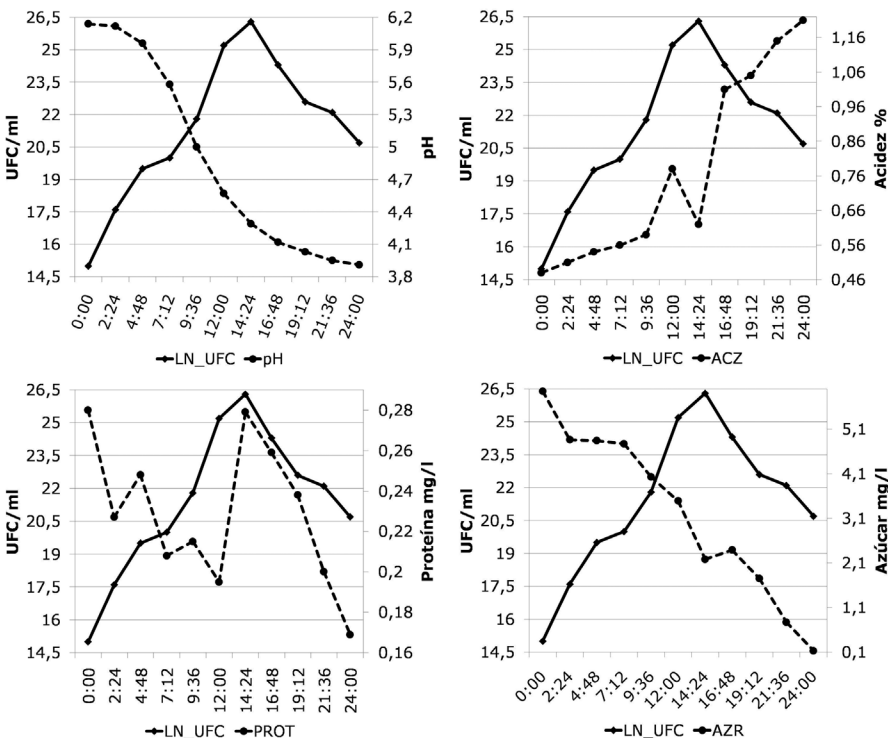


FIGURA 1. Variables pH, acidez (ACZ %), azúcar (AZR mg/l) y proteína (PROT mg/l) junto a Ln UFC, durante la cinética de crecimiento.

Se observó un descenso del pH de 0,23 unidades, con un valor inicial de 6,14 y un valor final de 3,91; se observó un pH de 4,29 durante la fase exponencial. Por consiguiente, se evidenció un incremento de la acidez del medio de 0,73%, durante toda la cinética de evaluación; con un valor de 0,62% de acidez en la fase exponencial. De otro lado, se obtuvo un consumo de azúcar de 5,82 ml/l durante todo el periodo de evaluación, con un consumo de 3,67 ml/l hasta la fase exponencial. Por su parte, el análisis de proteína mostró un valor de 0,28 y 0,169 ml/L al inicio y final de la fermentación, respectivamente.

La comparación entre los medios MRS y Pro determinó diferencias estadísticas entre los medios ($p < 0,05$), para lo cual, la prueba de Tukey mostró un mayor crecimiento de *L. lactis* en el medio Pro, por lo tanto se puede argumentar que el medio puede ser usado para determinar la cinética de crecimiento *in vitro* de las bacterias en evaluación. Por otra parte, no se encontró efecto del tiempo en el análisis ($p > 0,05$), por lo cual solo se tuvo en cuenta únicamente el efecto de los medios. En la Tabla 1 se resumen los datos encontrados en la cinética del medio MRS.

TABLA 1. Resumen de la cinética de fermentación.

Variable	Valor
Fase latencia	0
Velocidad específica de crecimiento (μ h ⁻¹)	1,48
Fin fase log (h)	14:24
Tiempo de duplicación (min)	45
Incremento cel. Total	2,90E+09
Incremento cel. Fin fase log	1,20E+013
% azúcares consumidos totales	62,18
% azúcares consumidos fin fase log	41,12
% proteína consumida total	31,48
% proteína consumida fin fase log	11,14
Coefficiente de determinación R ²	0,772

A su vez, se encontró correlación de las variables pH, acidez y azúcar con referencia a la variable UFC/ml. El análisis de regresión indicó que las pendientes de la recta fueron de -0,182; 0,028; -0,29 y 0,001 para pH, acidez y azúcar, respectivamente ($p < 0,05$). Para la proteína el análisis no indicó correlación ($p > 0,05$).

Los resultados de HPLC efectuados al sobrenadante de *L. lactis* se pueden

observar en la Figura 2. La comparación de los picos del sobrenadante con el estándar muestra que durante el tiempo 11,842 (aprox. 12), el pico número 8 del sobrenadante presenta un tiempo de retención similar; al respecto, se puede determinar la existencia de una cadena de aminoácidos VAL-TIR-VAL, con una concentración de 0,66 mg/ml de muestra.

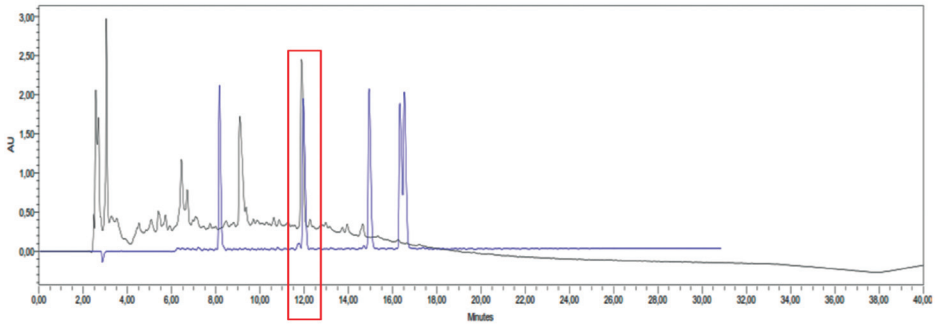


FIGURA 2. Cromatograma para *Lactobacillus lactis* (color azul), patrón (negro).

En la tabla 2 se observa los resultados obtenidos en la determinación de ácidos orgánicos.

TABLA 2. Perfil característico de la producción de ácidos orgánicos, concentración gramos/litro para *L. lactis*.

Bacteria	Ácido cítrico	Glucosa	Ácido succínico	Ácido láctico	Ácido acético	Etanol
<i>L. lactis</i>	2.72 (g/L)	3.95(g/L)	0.70 (g/L)	26.20 (g/L)	1.42(g/L)	0.90 (g/L)
	8.53%		2.27%	82.90%	3.62%	2.68%

La cepa láctica mostró resistencia a Dicloxacilina, Cefepima y Cefalotina, con sensibilidad a Ciprofloxacina,

Gentamicina, Penicilina, Trimetropim Sulfa y Ampicilina (Tabla 3 y Figura 3).

TABLA 3. Prueba antibiograma.

	DCX	FEP	KF	CIP	CN	P	TF	AM
Cepas de Referencia								
<i>L. lactis</i>	R	R	R	S	S	S	S	S
<i>S. aureus</i>	S	S	S	-	-	S	S	S
<i>S. epidermidis</i>	S	S	S	-	-	R	S	S
<i>S. agalactiae</i>	S	S	S	-	-	S	S	S
<i>E. coli</i>	-	S	S	S	S	-	S	-
Cepas Aisladas								
<i>S. aureus</i>	R	R	R	-	-	R	-	-

	DCX	FEP	KF	CIP	CN	P	TF	AM
<i>S. epidermidis</i>	R	R	S	-	-	R	S	S
<i>S. agalactiae</i>	S	S	S	-	-	S	S	S
<i>E. coli</i>	-	S	S	S	R	-	S	-

DCX: Dicloxacilina, **FEP:** Cefepima, **KF:** Cefalotina, **CIP:** Ciprofloxacina, **CN:** Gentamicina, **P:** Penicilina, **TF:** Trimetropim Sulfa, **AM:** Ampicilina.

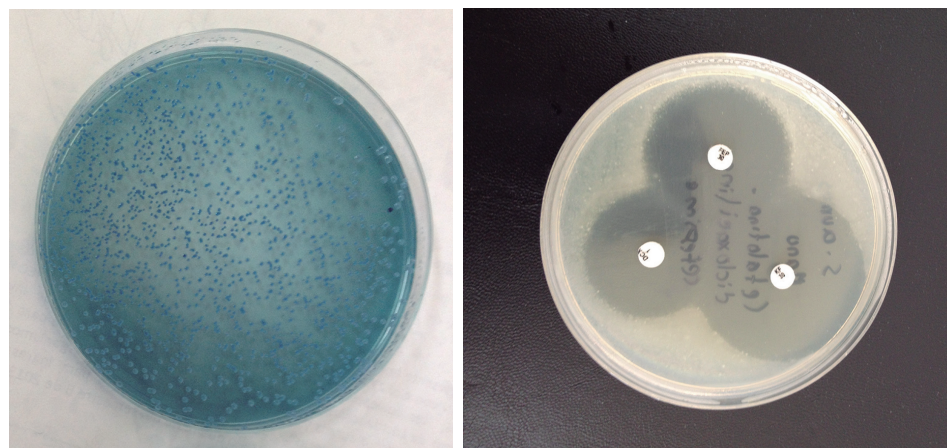


FIGURA 3. *Lactobacillus lactis* con azul de anilina y halos de inhibición para Dicloxacilina, Cefepime y Cefalotina sobre *S. aureus*.

Los resultados sobre las cepas de *S. aureus* mostraron que la cepa de referencia fue sensible a los antibióticos Dicloxacilina, Cefepima, Cefalotina, Penicilina, Trimetropim Sulfa y Ampicilina y la cepa aislada presentó resistencia a los mismos. Por su parte, la cepa de referencia de *S. epidermidis* fue resistente únicamente a la penicilina, mientras que la cepa aislada fue resistente a la Dicloxacilina, Cefepima, Penicilina, y Trimetropim Sulfa. En cuanto a las cepas aislada y de referencia de *Streptococcus agalactiae*, mostraron sensibilidad a los antibióticos Dicloxacilina, Cefepima, Cefalotina, Penicilina, Trimetropim Sulfa y Ampicilina. A su vez, la cepa de *E. coli*

de referencia presentó sensibilidad a todos los antibióticos evaluados (Cefepima, Cefalotina, Ciprofloxacina, Gentamicina, Trimetropim Sulfa y Ampicilina), mientras que la cepa aislada mostró resistencia a la Gentamicina (Tabla 3). Ahora bien, se observó que la cepa de referencia de *S. aureus* fue resistente a la bacteria láctica, a diferencia de la aislada. Las cepas de *S. agalactiae* presentaron resistencia a concentraciones de 25 y 50 μ l; y 50 μ l, para la cepa aislada y de referencia, respectivamente. *S. epidermidis* mostró susceptibilidad a *L. lactis*. Las cepas de *E. coli* fueron sensibles a la bacteria láctica (Figura 4 y 5a).

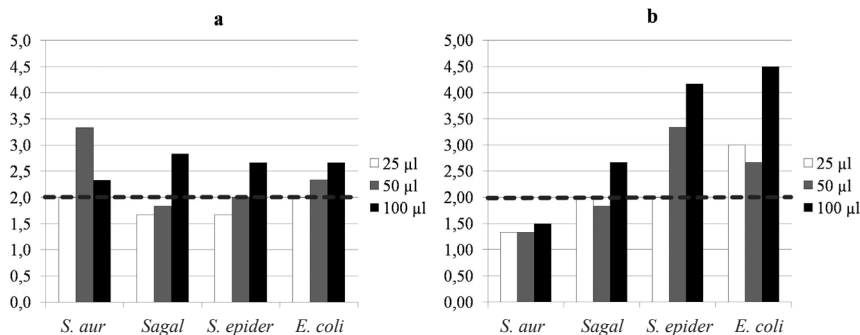


FIGURA 4. Halos de inhibición en mm de *L. lactis* sobre las bacterias patógenas.

a: cepas aisladas, **b:** cepas de referencia. *S. aur:* *Staphylococcus aureus*, *S. agal:* *Staphylococcus agalactiae*, *S. epider:* *Streptococcus epidermidis*. La línea punteada muestra el límite de sensibilidad (Estrada *et al.* 2005).

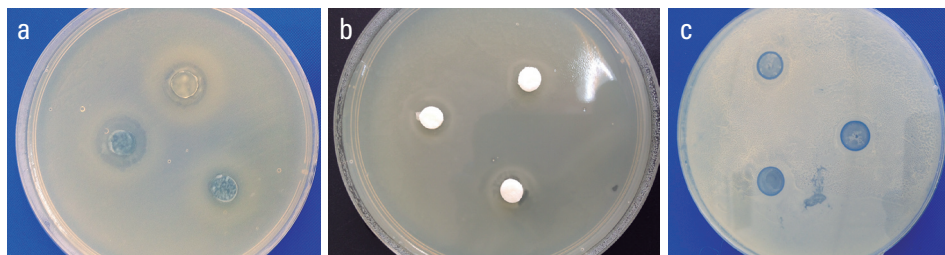


FIGURA 5. a: halos de inhibición de la bacteria *L. lactis*. **b:** Sobrenadante de *L. lactis* con sensidisco y **c:** con cilindros.

En las figuras 6 y 7 se puede observar que *S. aureus* aislado, presenta resistencia a las tres concentraciones del sobrenadante de *Lactobacillus*, mientras que la cepa de referencia mostró susceptibilidad; los resultados fueron similares para la toma del sobrenadante (con y sin filtro). De igual forma, se observa que *S. agalactiae* aislado presenta resistencia al sobrenadante, sin embargo, la cepa de referencia presenta sensibilidad a una concentración de 75 µl; los resultados fueron iguales con filtro

y sin filtro. En cuanto a las cepas de *S. epidermidis*, fueron resistentes al sobrenadante filtrado (aislada y referencia), sin embargo, se observó susceptibilidad de la cepa de referencia al sobrenadante sin filtrar. Finalmente, la cepa aislada de *E. coli* mostró resistencia al sobrenadante filtrado y sin filtrar, mientras que la cepa de referencia mostró sensibilidad a 50µl y las tres concentraciones para el sobrenadante filtrado y sin filtrar, respectivamente.

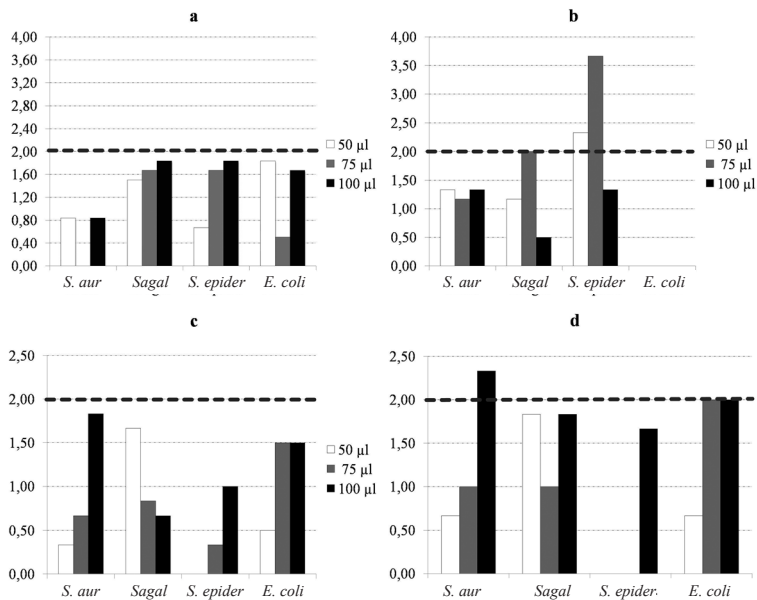


FIGURA 6. Halos de inhibición del sobrenadante de *L. lactis* sobre las bacterias patógenas aisladas. **a:** sensidisco con filtro, **b:** sensidisco sin filtro, **c:** cilindro con filtro, **d:** cilindro sin filtro. La línea punteada muestra el límite de sensibilidad (Estrada *et al.* 2005).

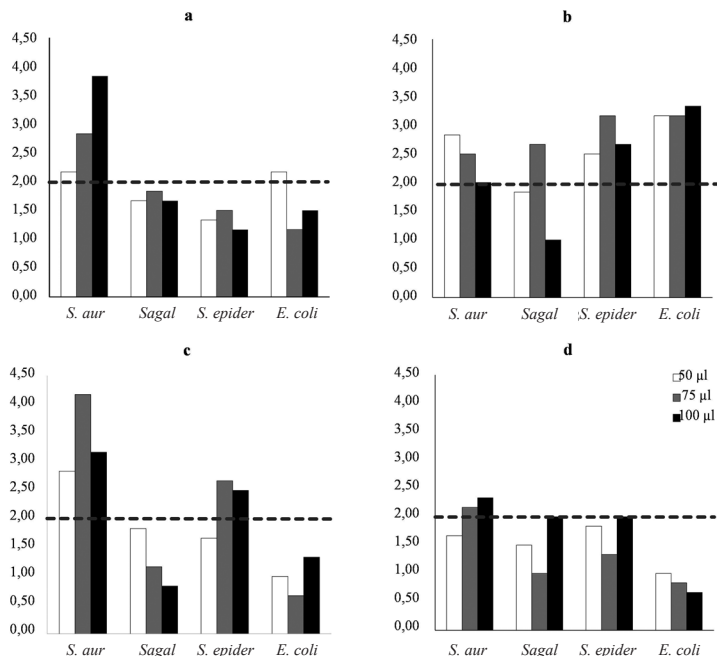


FIGURA 7. Halos de inhibición del sobrenadante de *L. lactis* sobre las bacterias patógenas de referencia. **a:** sensidisco con filtro, **b:** sensidisco sin filtro, **c:** cilindro con filtro, **d:** cilindro sin filtro. La línea punteada muestra el límite de sensibilidad (Estrada *et al.* 2005).

Se encontró un coeficiente de correlación de 0,1385 entre el método de sensidisco y el método de cilindro, por ello se argumenta que no existe relación entre metodologías.

DISCUSIÓN

Las pruebas que simulan las condiciones gastrointestinales *in vitro* (pH, temperatura) muestran adecuado comportamiento de la cepa láctica. Sin embargo, la prueba de sales biliares y bilis bovina indicaron que la cepa no tolera las concentraciones evaluadas, dado que no presentó crecimiento en estas condiciones. Al respecto, Iniguez-Palomares *et al.* (2007) y Carr *et al.* (2002), mencionan que para considerar una cepa microbiana como probiótica debe tener la capacidad de adherirse, crecer y colonizar el tracto digestivo del animal huésped; para ello, debe resistir las diversas condiciones que presenta el sistema digestivo de los animales como son el pH y la temperatura.

La fase exponencial de la cepa láctica mostró un crecimiento adecuado. Con ello se consiguió el tiempo necesario para obtener el valor máximo; es importante determinar la capacidad de desarrollo de la bacteria probiótica, con el fin de establecer su capacidad de producir inóculo (Zamudio y Zabaleta 2003). Además, un el crecimiento adecuado es un indicador de la inhibición que posee sobre otros microorganismos, ya que el uso de nutrientes del medio no será una limitante (Pérez-Luyo 2008).

Por otra parte, el pH encontrado durante la fase de crecimiento exponencial indica que la cepa posee características adecuadas para resistir ambientes con niveles bajos de pH; esta capacidad es importante para un probiótico, dado que

le permitirá sobrevivir con crecimientos adecuados. Una cepa que no puede adecuarse a los diferentes ambientes del tracto digestivo, difícilmente podrá llegar a considerarse como un probiótico (Prescott *et al.* 2002). La capacidad de *L. lactis* de crecer en medios ácidos se debe a que los mecanismos celulares de bomba de extracción de protones le permiten tener valores próximos a la neutralidad (Godward *et al.* 2000).

En otro sentido, la determinación de producción de ácidos orgánicos mostró que la cepa láctica es homofermentativa, dado que se encontró un porcentaje superior al 80% de ácido láctico en la muestra analizada. Esta es una buena característica, dado que el ácido láctico es el ácido con mayor poder de inhibición reportado en la literatura (Mishra y Lambert 1996).

La evaluación de la bacteria láctica mostró que no es resistente en condiciones *in vivo*, cuando el organismo huésped, se encuentre tratado con los antibióticos evaluados. A diferencia de otras especies bacterianas, la cepa comercial no ha creado resistencia, debido posiblemente a que no es un agente patógeno y por consiguiente no es tratado en el control de enfermedades bacterianas (Aarestrup 2000).

En otro sentido, se observa diferencia entre las cepas patógenas aisladas y de referencia, ya que las primeras presentan mayor resistencia a los antibióticos evaluados. A pesar de ser este un fenómeno natural de los microorganismos, el proceso puede ser acelerado por diversos factores, entre los que se encuentran un inadecuado uso de los antibióticos en el control de enfermedades como la mastitis o residuos antibióticos en los alimentos, entre otros (Martínez-Pacheco *et al.* 2013). Las bacterias que presentan mayor evidencia de este proceso son *S. aureus* y *S. epidermidis*,

posiblemente porque al ser los principales agentes de la causa de la mastitis en la región, su control se realice de forma inadecuada. En cuanto a las cepas de *S. agalactiae* y *E. coli* presentan un comportamiento similar entre microorganismos aislados y de referencia, por lo cual se determina que estos agentes tienen baja incidencia en la zona.

L. lactis resultó ser un buen candidato como agente reductor de la población patógena evaluada con cepas obtenidas de vacas con mastitis subclínica en la región. Al respecto, Fernández (2005), menciona que las bacteriocinas producidas por bacterias probióticas pueden servir como barreras antimicrobianas y ayudar a reducir los niveles de microorganismos patógenos, efecto observado en la presente investigación. Sin embargo, se debe notar que los mayores halos de inhibición se producen en las cepas de referencia, por lo cual se infiere que las cepas aisladas presentan un cierto grado de resistencia a la bacteria láctica que pueden afectar los resultados cuando se evalué en condiciones *in vivo*. Un caso particular se da en la cepa de referencia de *E. coli*, ya que presenta resistencia, a diferencia de la cepa aislada.

El caso del sobrenadante de *L. lactis* muestra resistencia de las cepas aisladas, por lo cual se infiere que el sobrenadante no es efectivo en el control de estos microorganismos. Sin embargo, los resultados encontrados con el uso de la cepa son opuestos. Esto hace suponer que el sobrenadante usado en la evaluación no presentó un adecuado nivel de sustancias inhibitorias, los cuales generaron los resultados encontrados.

La metodología modificada de Bauer *et al.* (1966) indica que no se pueden hacer comparaciones entre las dos formas de

colocar el sobrenadante (disco de papel pads y cilindro plástico), ya que los resultados no son correlacionados ($p > 0,05$; corr: 0,08). Se necesita mejorar la técnica de cilindros y aumentar el número de mediciones para determinar con mayor precisión los halos de inhibición. Estos resultados son diferentes a los encontrados por Jurado-Gómez *et al.* (2013), donde las dos formas registraron resultados similares.

Finalmente, se concluye que la cepa de *Lactobacillus lactis* representa una buena alternativa para ser evaluada en condiciones *in vivo*, aunque se debe tener en cuenta que presenta dificultades con las secreciones biliares. Sin embargo, se necesita continuar con la investigación en esta área para determinar la eficiencia de la cepa láctica sobre el control de bacterias patógenas en la región de Nariño.

REFERENCIAS

- Aarestrup FM. 2000. Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark. APMIS. [Internet]. [Citado 2014 febrero 23]; 108(101): 1-48. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11125553>. Doi: 10.1111/j.1600-0463.2000.tb05380.x.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. [Internet]. [Citado 2013 julio 18]; 45(4):493-496. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5325707>.
- Bedolla C, Ponce de León M. 2008. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. Rev Electrón Vet. [Internet]. [Citado 2014 enero 20]; 9(4): 1-26. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408/040805.pdf>.
- Brizuela M. 2003. Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos. [Tesis Doctoral]. [La Habana, Cuba]. ICIDCA.

- 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*. [Internet]. [Citado 2013 Noviembre 24]; 45(4): 177-184. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12501375>. Doi: 10.2323/jgam.45.177.
- Carr F, Chill D, Maida N. 2002. The lactic acid bacteria: a literature. *Critic Rev Microbiol*. [Internet] [citado 2014 noviembre 2]; 28(4): 281-370. Disponible en: <http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.1080/1040-840291046759>.
- Crueger W, Crueger A. 1993. *Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial*. 3° ed. España: Acirbia editorial.
- Dahl TA, Midden WR, Hartman PE. 1989. Comparison of killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by our singlet oxygen. *J Bacteriol*. [Internet]. [Citado 2014 Enero 20]; 171(4): 2188-2194. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC209876/>.
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem*. [Internet]. [Citado 2014 Enero 20]; 28(3): 350-356.
- Estrada AC, Gutiérrez LA, Montoya OI. 2005. Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus sp.* contra *Salmonella sp.* y *Escherichia coli*. *Rev Fac Nal Agr Medellín*. [Internet]. [Citado 2013 julio 18]; 58(1): 2601-2609. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179914238002>.
- Fernández A. 2005. Producción inducible de lactococina A, pediocina PA-1, colicina V e interleuquina-2 en cepas de *Lactococcus lactis* productoras de nisina. [Tesis Doctoral]. [Madrid España]. Universidad Complutense de Madrid.
- Godward G, Sultana K, Kaillasapathy K, Peiris P, Arumugaswamy R, Reynolds N. 2000. The importance of strain selection on the viability and survival of probiotic bacteria in dairy foods. *Milchwissenschaft*. 5(8): 441-445.
- Íñiguez-Palomares C, Perez-Morales R, Acedo-Félix E. 2007. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Rev Latinoam Microbiol*. [Internet]. [Citado 2013 abril 10]; 49(3-4):46-54. Disponible en: http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2007/mi07-3_4b.pdf.
- Jurado-Gómez H. 2010. Evaluación de bacterias ácido-lácticas con características probióticas en la alimentación de lechones en fase de precebo como alternativa al uso de antibióticos. [Tesis Doctoral]. [Cali, Valle del Cauca]: Universidad del Valle.
- Jurado-Gómez H, Calpa-Yama F, Chaspuengal-Tulcán A. 2014. Determinación *in vitro* de la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum* sobre *Yersinia pseudotuberculosis* aislada de *Cavia porcellus*. *Rev Med Vet Zoot*. [Internet], [Citado 2015 marzo 25]; 61(3): 241-257. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/remezv/article/view/46872/49462>. Doi: <http://dx.doi.org/10.15446/rfmvz.v61n3.46872>.
- Jurado-Gómez H, Ramírez C, Martínez J. 2013. Evaluación *in vivo* de *Lactobacillus plantarum* como alternativa al uso de antibióticos en lechones. *Rev. MVZ Córdoba*. [Internet]. [Citado 2014 noviembre 1]; 18(supl): 3648-3654. Disponible en: <http://revistas.unicordoba.edu.co/revistamvz/mvz-18supl/v18supla08.pdf>.
- [Lanara] Laboratorio Nacional de Referencia Animal. 1981. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredients: II Métodos físicos e químicos. Brasília (BR). Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2 (25): 1-15.
- López JE, Ochoa A, Santoyo G, Anaya JL, Medina E, Martínez M, Loeza PD. 2008. Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. [Internet]. [Citado 2014 Septiembre 2]; 39(3):49-57. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/579/57911110007.pdf>.
- Lowry OH, Rosebroug NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Proteine asurement with the folinphenol reagent. *J Biol Chem*. [Internet]. [citado 2014 Febrero 23]; 193: 265-75. Disponible en: <http://www.jbc.org/content/193/1/265.long>.
- Malara G, Charra R. 1972. Dosage des proteines particulaires selon la methode the Lowry. *Notes de Travail*. 5:11. Station Zoologique de

- Vellafranche-Sur-Mer (France): Universidad de París.
- Martínez-Pacheco D, Cruz-Carrillo A, Moreno-Figueroa G. 2013. Resistencia de las bacterias causantes de mastitis bovina frente a los microbianos más frecuentes: Revisión. Conexión Agropecuaria JDC. [Internet]. [Citado 2014 noviembre 14]; 3(1): 53-73. Disponible en: <http://www.revistasjdc.com/main/index.php/conexagro/article/view/273/265>.
- Mishra C, Lambert J. 1996. Production of antimicrobial substances by probiotics. Asian Pacific J Clin Nutr. [internte]. [Citado 2014 Noviembre 17]; 5(1): 20-24. Disponible en: <http://www.apjcn.org/update%5Cpdf%5C1996%5C1%5C20-24%5C20.pdf>.
- Montes A, Santacruz A, Sañudo J. 2003. Efecto *in vitro* de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* sobre el crecimiento de un aislado de *Helicobacter pylori*. [Trabajo de grado]. [Pasto, Colombia]: Universidad de Nariño.
- Negri LM. 2005. El pH y la acidez de la leche. En: Manual de Referencias técnicas para el logro de leche de calidad. 2º ed. INTA. p. 155-161. [Citado 02 dediciembre de 2013]. Disponible en: <http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/pH-y-acidez-en-leche2.pdf>.
- Norren N, Hooi WY, Baradaran A, Rosfarizan M, Sieo CC, Rosli MI, Yusoff K, Rahin AR. 2011. *Lactococcus lactis* M4, a potential host for the expression of heterologous proteins. Microb Cell Fact. [Internet]. [Citado 2014 Octubre 15]; 10(28): 1. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21518457>. Doi: 10.1186/1475-2859-10-28.
- Pérez-Luyo A. 2008. Probióticos: Una alternativa en la prevención de la caries dental? Rev Estomatol Herediana. [Internet]. [Citado 2013 abril 10]; 18 (1): 65-68. Disponible en: <http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/REH/article/viewFile/1856/1865>.
- Prescott LM, Harley J, Klein D. 2002. Normal microbiota and nonspecific host resistance. En: Microbiology. 5ª Ed. Madrid, España: Mc Graw-Hill/Interamericana de España.
- Rodríguez A. 2009. Elaboración de los manuales de procedimientos hematológicos, serológicos, citológicos, parasitológicos y uroanálisis, como parte integral del proceso de control de calidad interno del laboratorio de clínica veterinaria "Carlos Martínez Hoyos" de la Universidad de Nariño. [Trabajo de grado]. [Pasto, Colombia]: Universidad de Nariño.
- Rodríguez-León JA, Bueno G, Rodríguez DE, Delgado G, Serrano P, Brizuela MA. 2003. True and apparent yields and maintenance coefficient and their significance on fermentation kinetics. En: Roussos S, Soccol CR, Pandey A, Augur C, editores. New Horizons Biotechnology. Dordrecht: IRD Editions/Springer-Science+Business Media, B.V. p. 163-172.
- SAS Institute Inc. 2004. SAS/STAT® 9.1 User's Guide. Cary (NC): SAS Institute Inc.
- Tagg J, McGiven A. 1971. Assay system for Bacteriocins. Appl Microb. [Internet]. [Citado 2013 febrero 10]; 21(5): 943. Disponible en: <http://aem.asm.org/content/21/5/943.full.pdf>.
- Valencia HF, Jurado H, Moran CH. 2003. Aislamiento e identificación de microorganismos causantes de mastitis subclínica y su sensibilidad a antibióticos en hatos lecheros del suroccidente de Pasto. Revista del Centro de Estudios en Salud. 1(4): 19-25.
- Zamudio KL, Zavaleta AI. 2003. Estudio del potencial probiótico de lactobacilos aislados de fuentes naturales. Cienc Investig. [Internet]. [Citado 2014 Noviembre 17]; 6(1): 30-35. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3317/2759>.
- Zhou GH, Xu XL, Liu Y. 2010. Preservation technologies for fresh meat. A review. Meat Science. [Internet]. [Citado 2014 Septiembre 2]; 86(1): 119-128. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174010001658>. Doi: 10.1016/j.meatsci.2010.04.033.

Article citation:

Jurado-Gómez H, Gúzman-Insuasty M, Jarrín-Jarrín V. 2015. Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición *in vitro* de *Lactobacillus lactis* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* [Determination of kinetic, tests and growth inhibition effect of *Lactobacillus lactis* *in vitro* in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* in holstein cows]. Rev Med Vet Zoot. 62(2): 40-56.
Doi: 10.15446/rfmvz.v62n2.51993.