

# Determinación del potencial bactericida In vitro de un aislado nativo de *Lactobacillus casei* frente *E. coli*

Luz Adriana Gutiérrez Ramírez<sup>1</sup>, Elly Vanesa Acosta Otálvaro<sup>2</sup>

Determination of the in vitro bactericide potential of a native isolated of *Lactobacillus casei* against *E. coli*

Determinação do potencial bactericida In vitro de um isolado nativo de *Lactobacillus casei* frente *E. coli*

## Resumen

**Introducción** Los probióticos son microorganismos vivos con gran capacidad antagónica contra otros microorganismos, es por esto el marcado interés para ser utilizado como bioconservantes naturales, disminuyendo en parte el uso de conservantes químicos en alimentos. **Objetivo** Determinar el efecto bactericida del extracto crudo del *L.cassei* nativo sobre el crecimiento in Vitro de bacterias patógenas como *E.coli*. **Materiales y métodos.** El extracto crudo se obtuvo cultivando el microorganismo en 20 ml de caldo MRS a 37°C por 72h anaeróbicmente. Los ensayos se realizaron en tres tiempos: 5, 10 y 15 días, el método utilizado para detectar la actividad del extracto fue el ensayo de difusión en pozos, el que presentara un halo de inhibición superior a 2mm se consideraba con actividad. Los resultados encontrados se compararon con los de una cepa de *Lactobacillus plantarum* de uso comercial con actividad bactericida frente a *Escherichia coli*. **Resultados.** Se encontró que *L.cassei* presentó actividad antagónica contra *E.coli*, pues la zonas de inhibición leídas como variable de respuesta fueron mayores de 2mm hasta en la dilución  $10^{-3}$  en los tres ensayos realizados en el tiempo, sin embargo en el día 15 la actividad bactericida del extracto disminuye considerablemente con respecto a la del día 5. Los análisis de Unidades de Actividad mostraron que el extracto de este aislado es activo aun en diluciones altas, lo cual significa que los extractos tiene actividad aun a muy pequeñas concentraciones. **Conclusión.** El aislado nativo de *L.cassei* produce sustancias antimicrobianas contra bacterias Gram negativa como *E.coli* pudiendo utilizarse probablemente como un bioconservante natural en alimentos.

**Palabras clave:** Probióticos. Prebióticos. Lactobacillus. Actividad bactericida. Nutracéutica

## Abstract

**Introduction.** Probiotics are living microorganisms with a great capacity against other microorganisms, this is why there is an interest in using them as natural bio-preservatives, reducing partially the use of chemical preservatives in food. **Objective.** To determine the bactericide effect of the raw extract of native *L. casei* on the in Vitro growth of pathogenic bacteria, such as *E.coli*. **Materials and methods.** The raw extract was obtained by cultivating the microorganism in 20 ml of MRS breeding ground at 37 °C Turing 72 h, anaerobically. The experiments were done in three periods of time: 5, 10 and 15 days. The method used to detect the activity of the extract was the experiment of diffusion in wells. Those that represented an inhibition halo above 2mm were considered as active. The results found were compared with those from a strain of *Lactobacillus plantarum* of for commercial use with a bactericide activity against *Escherichia coli*. **Results.** *L.cassei* represented hostile activity against *E.coli*, because the inhibition zones read as response variable were higher than 2mm until getting the  $10^{-3}$  dilution in the three experiments made. However, on day 15 the bactericide activity of the extract was considerably reduced when compared to that from day 5. The analysis of activity units showed that the extract from this isolated is active even in high dilutions, which means that the extracts are active even at very low concentrations. **Conclusion.** The native isolated of *L.cassei* produces antimicrobials against Gram negative bacteria, such as *E.coli*, being

\* Investigación financiada con recursos del Fondo de Fomento a la Investigación de la Corporación Universitaria Lasallista  
Línea de investigación: Biotecnología de alimentos. Semillero INNOVA, Grupo de Investigación GRIAL

<sup>1</sup> MSc en Biotecnología, Bióloga, profesora de la Corporación Universitaria Lasallista/ <sup>2</sup> Investigadora del semillero INNOVA y estudiante de Ingeniería de Alimentos de la Corporación Universitaria Lasallista.

Correspondencia: Luz Adriana Gutiérrez Ramírez, e-mail: lugutierrez@lasallista.edu.co

Fecha de recibo: 22/02/2008; fecha de aprobación: 22/09/2008

available for their possible use as natural bio preservatives in food.

**Key words:** Probiotics. Prebiotics. Lactobacillus. Bactericide activity. Nutraceuticals.

## Resumo

**Introdução.** Os probióticos são microorganismos vivos com grande capacidade antagônica contra outros microorganismos, é por isto o marcado interesse para ser utilizado como bio-conservantes naturais, diminuindo em parte o uso de conservantes químicos em alimentos. **Objetivo.** Determinar o efeito bactericida do extrato cru do *L.cassei nativo* sobre o crescimento in vitro de bactérias patogênicas como *E.coli*. **Materiais e métodos.** O extrato cru se obteve cultivando o microorganismo em 20 ml de caldo MRS a 37°C por 72h anaerobicamente. Os ensaios se realizaram em três tempos: 5, 10 e 15 dias, o método utilizado para detectar a atividade do extrato foi o ensaio de difusão em poços, o que apresentasse um

halo de inibição superior a 2mm se considerava com atividade. Os resultados encontrados se compararam com os de uma cepa de *Lactobacillus plantarum* de uso comercial com atividade bactericida frente a *Escherichia coli*. **Resultados.** Encontrou-se que *L.cassei* apresentou atividade antagônica contra *E.coli*, pois a zonas de inibição lidas como variável de resposta foram maiores de 2mm até na dilucion10-3 nos três ensaios realizados no tempo, no entanto no dia 15 a atividade bactericida do extrato diminui consideravelmente com respeito à do dia 5. As análises de Unidades de Atividade mostraram que o extrato deste isolado é ativo ainda em diluições altas, o qual significa que os extratos tem atividade ainda a muito pequenas concentrações. **Conclusão.** O isolado nativo de *L.cassei* produz substâncias antimicrobianas contra bactérias Gram negativa como *E.coli* podendo utilizar-se provavelmente como um bio-conservante natural em alimentos.

**Palavras chaves:** Pro-bióticos. Pré-bióticos. Lactobacilos. Atividade bactericida. Nutraceutica.

---

## Introducción

En la actualidad, se ha generado un marcado interés por el consumo de alimentos con valor nutricional, y que proporcionen beneficios a la salud al prevenir enfermedades, mejorar la digestión y controlar el crecimiento de bacterias patógenas<sup>1</sup>.

Las bacterias ácido lácticas no solamente se han venido utilizando como cultivos iniciadores para la obtención de productos fermentados sino que sus metabolitos se han estado empleando como bioconservantes naturales en alimentos, algunos de los metabolitos empleados para tal fin se han denominado bacteriocinas; péptidos antimicrobianos de bajo peso molecular y su uso genera una alternativa natural para sustituir, al menos parcialmente el uso de agentes químicos<sup>2</sup>.

La conservación de los alimentos y la prevención de la ocurrencia de Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA), han motivado que el mundo industrial y el científico se interesen por conocer con mayor detalle el modo de acción de los probióticos y de algunos de sus metabolitos sobre los microorganismos patógenos.

En los países industrializados anualmente se reporta que el 30% de la población sufre de algún tipo de ETAs<sup>3</sup>, sólo en los Estados Unidos, se calcula aproximadamente 76 millones de casos; de los cuales 325.000 requieren hospitalización y 5.000 mueren debido a la presencia de microorganismos patógenos como *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Escherichia coli* Enterohemorrágica (O157H), *Listeria monocytogenes* y *Vibrio cholerae*, con un costo estimado de 35 billones de dólares, referidos como gastos médicos y pérdida de la productividad<sup>3</sup>. La transmisión de estos microorganismos patógenos está relacionada con el consumo de alimentos crudos o mal cocidos, ya sea pollo, carne, mariscos, o por productos lácteos, frutas y vegetales<sup>3</sup>.

Una solución a este problema sería el uso de las bacterias lácticas no sólo por su aporte probiótico sino por la producción de sustancias antimicrobianas, frente a un gran número de bacterias patógenas Gram positivas como Gram negativas. Actualmente, en los países desarrollados estas bacterias se están utilizando como conservantes naturales de alimentos; porque son considerados GRAS (Generally Recognized As Safe), y confieren al consumidor función nutraceutica.

## Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Biotecnología y Microbiología de la Corporación Universitaria Lasallista

**Cepas bacterianas y cultivos.** Las cepas de estudio *E.coli*, se obtuvo del Laboratorio de Microbiología de la Corporación Universitaria Lasallista y el aislado nativo de *L.cassei* de leches fermentadas cultivados en Agar MRS e incubados anaerobicamente a 30°C /72horas<sup>4</sup>

**Producción del extracto.** El aislado nativo de *L.cassei* fue cultivado en 20ml de caldo MRS a 37°C por 72h anaerobicamente, al cabo de este tiempo el caldo fermentado, se dividió en dos porciones en tubos estériles; una porción se precipitó y la otra correspondiente al sobrenadante se utilizó como extracto crudo; de la misma manera se reactivó la cepa comercial de *Lactobacillus plantarum* que fue utilizada como microorganismo control.

**Evaluación de la actividad bactericida.** Para determinar la actividad bactericida se empleó el ensayo de difusión en pozos con algunas modificaciones<sup>5</sup> para lo cual se tomaron cajas de petri marcadas con el extracto y la cepa indicadora y se adicionaron de 10 a 12ml de agar MRS, después se procedía a hacer 4 pozos a una distancias de 4cm cada uno en la superficie del agar.

En cada pozo se adicionaban de 50 a 70µl del extracto, y se hacía el inóculo de la cepa indicadora, *E.coli* por el método de dilución en agua peptonada 0,1%p/v hasta obtener una dilución de  $1 \times 10^{-12}$ , a partir de esta última dilución se retiraban 15ul y se mezclaban con 15ml de agar Tripticasa soya (Merck) semisólido (0.8% de agar agar), se agitaba y se adicionaban sobre la caja de agar MRS que contenía los extractos, formándose una doble capa, incubándose posteriormente a 37°C/48h.

**Identificación de la cepa productora de sustancias bactericidas.** La actividad bactericida de los extractos se detectaba por una zona clara de inhibición alrededor del pozo (halos de inhibición), se consideró como actividad inhibitoria la formación de un halo mayor de 2mm<sup>6</sup>.

Los ensayos se realizaron en tres tiempos: 5, 10 y 15 días, el extracto obtenido tanto para la cepa experimental como para el control se mantuvo en refrigeración durante los 15 días de evaluación los registros de la inhibición se realizaron durante dos meses. Las pruebas se realizaron por duplicado en cada ensayo

**Determinación de Unidades de Actividad.** Las unidades de actividad se consideran como el recíproco de la dilución más alta de los extractos, probándose mediante esta, la optimización de la calidad del extracto de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas<sup>6</sup>.

Una porción del extracto centrifugado se diluyó hasta  $3 \times 10^{-3}$  para determinar su actividad bactericida y comprobar que es capaz de controlar bacterias patógenas aun en bajas concentraciones.

Las unidades de actividad evaluadas fueron  
 $1 \times 10^{-1} = 10,56$  UA  
 $1/2 \times 10^{-2} = 50,8$  UA  
 $1/3 \times 10^{-3} = 333,33$  UA

## Resultados

Los extractos obtenidos de los aislados de *L.cassei* y *L.plantarum* mostraron una zona clara de inhibición en el ensayo de difusión en pozos, tal como lo muestra la foto 1, las medidas obtenidas fueron superiores a 2mm; los niveles de inhibición más altos se encontraron en la cepa comercial *L.plantarum*<sup>7</sup> exceptuando en los ensayos realizados en diluciones muy altas.

Al evaluar las unidades de actividad de *L.cassei* vs *E.coli* y compararlos con los de la cepa comercial, se observó que el extracto del aislado nativo presenta actividad bactericida frente a este patógeno en todas las diluciones y en los diferentes tiempos de evaluación, para ambos extractos la mayor actividad se presenta en los primeros días del ensayo y va disminuyendo a medida que se aumenta el tiempo de los análisis; *L.plantarum* obtuvo los niveles más altos de actividad bactericida con respecto a la cepa nativa.

Los datos observados en la grafica 1 de actividad bactericida muestra que los extractos son activos frente a las bacterias patógenas en casi

todas las diluciones, excepto en  $3/3E^{-3}$  o 333.33UA de *L.plantarum* frente a *E.coli*. El extracto de *L.cassei* presenta una buena actividad antagonista al compararse con el blanco, y su actividad es buena cuando se utiliza sin diluir más que cuando se utiliza diluido hasta  $10E^{-3}$ .

Las medidas más altas de actividad bactericida se presentaron con *L.plantarum* el día 5 con la dilución  $10E^{-1}$  equivalente a 14mm, resultados similares fueron obtenidos en las mismas condiciones por *L.cassei* donde la medida fue 10mm.

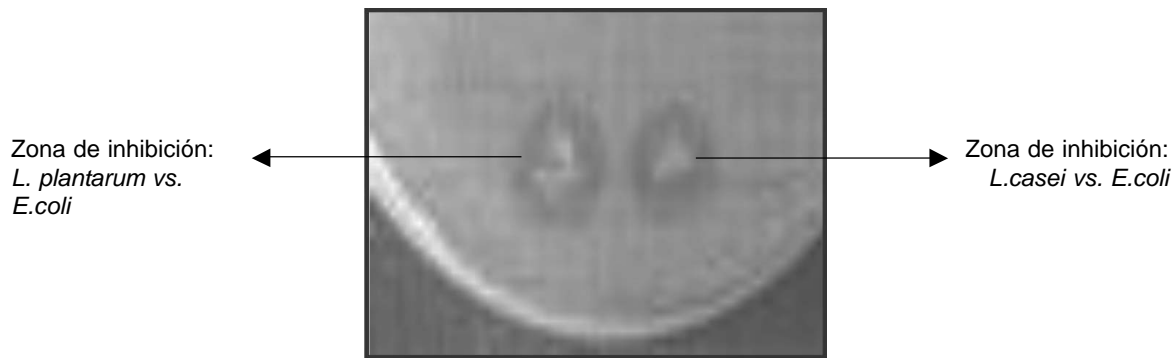
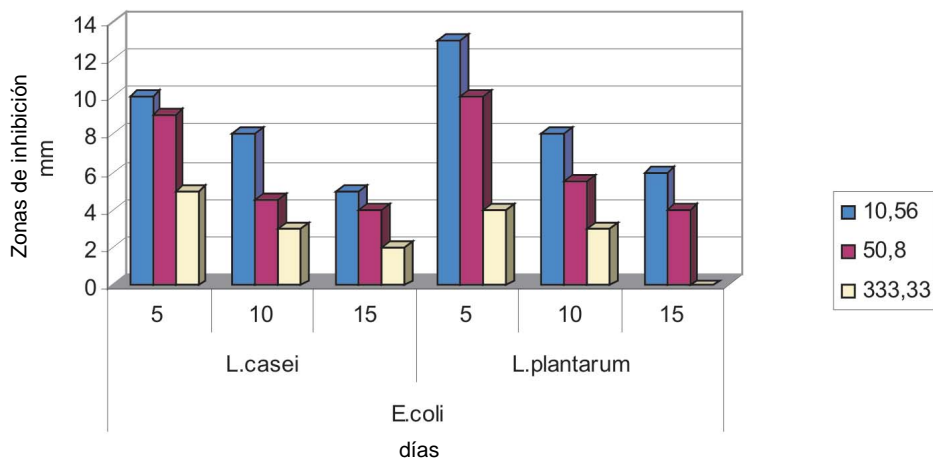


Foto 1. Halos de inhibición de *L.plantarum* y *L.cassei* vs *E.coli*



Grafica 1. Efecto del extracto *L.cassei* y *L.plantarum* sobre *E.coli*

## Discusión

La conservación de los alimentos y la prevención de la ocurrencia de Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA) en los individuos, han motivado que el mundo industrial y el científico se interesen por conocer con mayor detalle el

modo de acción de las bacterias ácido lácticas especialmente las probióticos y de algunos de sus metabolitos sobre los microorganismos patógenos. Actualmente la industria de alimentos está utilizando los extractos purificados de Bacterias ácido lácticas y probióticas para controlar bacterias patógenas, estas sustancias han

sido llamadas bacteriocinas y se han considerados como sustancias GRAS (Generally Recognized As Safe)<sup>3</sup>, y confieren al consumidor función nutraceutica; no sólo por su función nutricional sino protectante.

Los análisis de Unidades de Actividad mostraron que el extracto de *L.cassei* es activo aun en diluciones altas, lo cual significa que el extracto tiene actividad aun a muy pequeñas concentraciones, resultado importante para utilizarse como bioconservante en alimentos que presenten un contenido de agua alto. Sin embargo la actividad de *L.plantarum* se ve disminuida o afectada completamente contra *E.coli* cuando la dilución se hace muy alta<sup>8</sup>.

En estudios previos a éste, ambas cepas de *Lactobacillus* fueron consideradas probióticas. La producción de numerosas sustancias antimicrobianas específicas como ácido láctico, acetoacético, diacetilo y bacteriocinas entre otras les confiere su capacidad bactericida; sobre diferentes cepas de bacterias gram negativas y gram positivas patógenas<sup>9</sup>.

Dentro de los resultados obtenidos en la investigación se comprobó que *L.cassei* presentaba actividad bactericida frente a *E.coli* aun en diluciones muy altas;  $10^{-3}$  además de presentar estabilidad a temperaturas de refrigeración durante los 15 días del análisis, Ogubanwo Sanni y Onilude<sup>9,10</sup> obtuvieron resultados similares, donde el extracto a temperaturas de congelación conserva más sus cualidades antimicrobianas.

Los resultados obtenidos en esta investigación determinaron que los extractos de *L.cassei*, presentaron actividad antagónica In Vitro contra *E.coli*. Es probable que esta actividad se deba a la producción sustancias bactericidas específicas contra gram negativas, las cuales solubilizan el lipopolisacarido y destruyen la membrana citoplasmática vaciando su contenido celular, de esta manera generan inhibición parcial o total de estos microorganismos<sup>11, 12</sup>.

Se cree que hay muchas formas por las cuales se generan antagonismo con estos microorganismos contra bacterias patógenas a nivel in vivo, regularmente es por los nutrientes pero también por el espacio físico. Algunas bacterias pueden inhibir la adherencia de los agen-

tes patógenos a los sitios receptores por un mecanismo de obstrucción estérica o de bloqueo específico del receptor, con lo que se produce una prevención de la colonización de microorganismos patógenos por inhibición competitiva en los lugares de adhesión<sup>10</sup>.

## Conclusión

En conclusión se pudo comprobar que los extractos obtenidos de *L.cassei* y *L. plantarum* presentan actividad bactericida In Vitro frente a *E.coli*; y permanecieron estables a temperaturas de refrigeración durante los 15 días de evaluación. Los resultados encontrados en esta investigación servirán de apoyo en la aplicación de bioconservantes alimentarios en la industria láctea y cárnica siendo un punto de partida en la industria de bioconservantes de origen natural.

## Referencias

1. MARTEAU, Philippe R. et al. Protection from gastrointestinal diseases with the uses of probiotics. In: American Society for Clinical Nutrition. Vol. 73, No. 2 (feb. 2001); p. 430-436.
2. FARNWORTH, E.R. Probiotics and prebiotics. In: Handbook of Nutraceutical and functional foods. s.l. : Ed. CRC Press, 2001. Cap. 25: 407-422.
3. CINTAS IZARRA, L. M.; CASAUS, P. y HERNÁNDEZ, Pablo E. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas (I y II). En: Alimentación, Equipos y Tecnología. Vol. 19, No.7 (Sep.,2000); p. 109-119.
4. SALAZAR, A. B. Aislamiento de cepas nativas de microorganismos probióticos. Medellín. 2003. 77 p. Tesis (Magister en Biotecnología).Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.
5. MONTVILLE, T. J. and CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions En: Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 50, No. 5 (nov. 1999); p. 511-519.
6. KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria FEMS. In: Microbiological Reviews vol. 12 (1993); p. 39-86.

7. GUTIERREZ, Luz A. Evaluación del potencial bactericida de los extractos de Bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento in vitro de *E. coli*, *Salmonella sp.* y *Listeria monocytogenes* 2004 (Magister en Biotecnología). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. *Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol. 42, no. 2 (mar. 2002); p. 91-121
8. OGUNBANWO, S.T.; SANNI, A.L. and ONILUDE, A.A. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. In: *African Journal of Biotechnology*. Vol. 2, No. 8 (2003); p. 219-227.
9. RODRÍGUEZ, Juan Manuel; MARTÍNEZ, María I. and KOK. Pediocin PA-1 to wide spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. In: *Critical*
10. SCHREZENMEIR, J. And VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and symbiotic-approaching to definition. In: *American Journal of Clinical Nutrition*. Vol 73, No. 2 (feb. 2001); p. 361s-364s.
11. BASKARAN, D. Effect of duration of incubation of various lactobacilli on the antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. In: *Indian Veterinary Journal*. Vol. 79 (2002); p. 800-802.
12. FRICOURT, B.V. et al. Detection and activity of Plantaricin F an antibacterial substance from *Lactobacillus plantarum* BFOO1 isolated from processed channel catfish. In: *Journal of Food Protection*. Vol. 37, No.8 (1994); p. 698-708.