

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

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

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

RESUMEN

Se determinó cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición *in vitro* de *L. casei* sobre *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae* y *E. coli*. Se usaron cepas comerciales y cepas aisladas de muestras de leche con mastitis subclínica (Vereda La Victoria, Pasto, Colombia). Se evaluó el efecto de los antibióticos Dicloxacilina, Cefepima, Cefalotina, Ciprofloxacina, Gentamicina, Penicilina, Trimetropim Sulfa y Ampicilina, así como la inhibición de *L. casei* y su sobrenadante sobre las bacterias patógenas. El crecimiento de *L. casei* se evaluó a diferentes condiciones gastrointestinales y su cinética de crecimiento. Se determinaron péptidos y ácidos orgánicos en el sobrenadante (HPLC). *L. casei* fue susceptible a la Ciprofloxacina y Ampicilina, mientras que *S. aureus* comercial mostró susceptibilidad a los antibióticos, lo mismo se observó en *S. epidermidis*, pero las cepas de *S. agalactiae* y *E. coli* fueron susceptibles. *E. coli* fue la única resistente a la cepa láctica. El sobrenadante tuvo resultados similares a la cepa. Se encontró un crecimiento de $2,3 \times 10^7$ a $1,1 \times 10^{11}$ UFC/ml a diferentes condiciones gastrointestinales. La fase exponencial se encontró a 16:48 h (3×10^{10} UFC/ml) y las variables pH, azúcar total, acidez y proteína durante esta fase fueron: de 4,94; 0,88 mg/l; 2,89 mg/l y 1,9 mg/l. Se encontró el péptido VAL-TIR-VAL y un 83,46% de ácido láctico. *L. casei* mostró buenas características probióticas en condiciones *in vitro* que permitirían su aplicación en ensayos *in vivo* para el control de microorganismos causantes de mastitis subclínica en vacas.

Palabras claves: bacteria, biomasa, salud, fermentación.

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

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

* Autor para correspondencia: henryjugam@gmail.com

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

ABSTRAC

Kinetics, growth tests and *in vitro* inhibition effect of *L. casei* on *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae* and *E. coli*. Was determined. commercial and strains isolated from milk samples with subclinical mastitis (La Victoria, Pasto, Colombia) strains were used. The effect of Dicloxacillin, Cefepime, Cephalothin, Ciprofloxacin, Gentamicin, Penicillin, Ampicillin and Trimethoprim Sulfa antibiotics, as well as inhibition of *L. casei* and the supernatant on bacterial pathogens was evaluated. *L. casei* growth was assessed at various gastrointestinal conditions and growth kinetics. Peptides and organic acids in the supernatant (HPLC) were determined. *L. casei* was susceptible to Ciprofloxacin and Ampicillin, while commercial *S. aureus* showed susceptibility to antibiotics, the same was observed in *S. epidermidis*, but strains of *S. agalactiae* and *E. coli* were susceptible. *E. coli* was the only strain resistant lactic. The supernatant had similar results to the strain. an increase of 2.3×10^7 to 1.1×10^{11} CFU/ml was found to various gastrointestinal conditions. Exponential phase was found to 16:48 h (3×10^{10} CFU/ml) and the pH, total sugar, acidity and protein during this phase variables were: 4.94; 0.88 mg/l; 2.89 mg/l and 1.9 mg/l. Peptide-VAL VAL-TIR and 83.46% lactic acid was found. *L. casei* probiotic characteristics showed good *in vitro* conditions that allow its application in vivo assays for controlling causative organisms of subclinical mastitis in cows.

Key words: bacterium, biomass, health, fermentation.

INTRODUCCIÓN

La mastitis es considerada la enfermedad infecciosa más costosa de las vacas lecheras, debido a que induce una disminución en la producción de 4 a 30% de leche y baja su calidad, además de incrementar los costos del cuidado de la salud del hato y un desecho prematuro de animales genéticamente mejorados (Bedolla y Ponce de León 2008). Esta es causada más comúnmente por infección intramamaria (patógeno), pero también puede ser causada por una lesión (herida), y menos frecuente, por alergia y neoplasias (Pastor-Guizar y Bedolla-Cedeño 2008).

Lactobacillus casei es una bacteria Gram positiva con forma de bastón que pueden fermentar una mayor variedad de carbo-

hidratos en comparación con la mayoría de *Lactobacillus* encontrados en las leches fermentadas (Santacruz 2004). De acuerdo con Bouchard *et al.* (2013) y Parasol *et al.* (2005), *L. casei* posee la capacidad de adherirse al epitelio de la glándula mamaria de vacas productoras de leche, sin presentar ningún efecto citotóxico sobre el huésped. La cepa láctica ha mostrado efectividad en el control de microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus agalactiae* (Ingrassia *et al.* 2005). Su metabolismo proporciona cualidades organolépticas a diversas leches fermentadas y quesos; además, se ha encontrado viabilidad de la cepa durante el tránsito por el tracto digestivo, lo cual demuestra un adecuado comportamiento en el uso de la cepa como probiótica (Park *et al.* 2005).

La presente investigación buscó determinar la cinética, pruebas de crecimiento y el efecto de inhibición *in vitro* de *Lactobacillus casei* sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la investigación se adquirieron las cepas comerciales *Lactobacillus casei* ATCC 11456, *Staphylococcus aureus* ATCC 13245, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14532, *Streptococcus agalactiae* ATCC 15678 y *Escherichia coli* ATCC 2346 y se aislaron cepas de la región mediante técnicas bioquímicas y microbiológicas.

Se reconstituyeron las cepas comerciales para lo cual se siguieron las instrucciones del fabricante. Para conservar las bacterias se realizó repique en medio sólido cada 5 días y en medio líquido cada 8 días. Para la bacteria láctica el medio sólido fue agar MRS y el medio líquido caldo MRS; para las bacterias patógenas se usó como medio líquido caldo BHI, mientras que el medio sólido fue diferente para cada especie: *Staphylococcus*, agar manitol; *Streptococcus*, agar base sangre y *Escherichia coli*, agar McConkey. Todas las cepas se incubaron a 37°C durante 24 horas, y luego fueron refrigeradas a 4°C, hasta su utilización.

El inóculo de *L. casei* se obtuvo de la siguiente manera: en un Erlenmeyer se depositaron 40 ml de caldo MRS estéril y una alícuota de la bacteria láctica conservada, el preparado se incubó a 35°C durante 24 horas, luego se tomaron del Erlenmeyer 4 ml y se trasladaron a otro Erlenmeyer con la misma cantidad de medio y se incubó en las condiciones mencionadas anteriormente. El ajuste del inóculo se realizó por la metodología propuesta por Crueger y Crueger (1993): se tomaron 90

ml de caldo MRS estéril, se adicionaron 10 ml de la bacteria láctica de acuerdo con la regla; al finalizar el periodo de incubación se tomó 1 ml de la muestra y se hizo lectura directa mediante espectrofotómetro a 625 nm. Por último, en los casos donde la población fue superior a la establecida, se adicionó caldo estéril de acuerdo con lo formulado por Montes *et al.* 2003 indicada en Jurado-Gámez *et al.* (2014).

Por su parte, las cepas patógenas aisladas fueron obtenidas de vacas con mastitis. Para ello, se tomaron muestras de leche con mastitis subclínica de fincas de la vereda Victoria, Municipio de San Juan de Pasto (Colombia), caracterizada por una temperatura promedio de 10°C, altura de 3000 msnm, precipitación media anual de 1200 mm. Las muestras fueron seleccionadas a través del California Mastitis Test (CMT) (Valencia *et al.* 2003), tomando únicamente muestras con grado 2 o 3 y cumpliendo con el protocolo de toma de muestras dado por el laboratorio de la Clínica Veterinaria de la Universidad de Nariño.

Posteriormente, el aislamiento de las cepas se determinó mediante el protocolo de aislamiento basado en el manual de procedimientos microbiológicos del laboratorio de la Clínica Veterinaria de la Universidad de Nariño para aislamientos de cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos (Rodríguez *et al.* 2009).

Entretanto, se evaluó el crecimiento de *L. casei* a concentraciones de 0,5; 1 y 2% de sales biliares bovinas y concentraciones de 1 y 1,2% de bilis bovina. Para ello, primero se cultivó la bacteria en caldo MRS por 24 horas; luego de lo cual, de este cultivo se tomaron muestras y se depositaron en tubos con MRS y las diferentes concentraciones a evaluar, enseguida se tomaron muestras para cultivar en agar MRS con azul de anilina y se cultivaron a

32°C durante 48 horas, al final se realizó recuento de bacterias de cada muestra.

Más adelante, se determinó si hubo producción de gas (Dahl *et al.* 1989) y reacción de catalasa (Cai *et al.* 1999) en la bacteria láctica y se si la cepa era viable a diferentes niveles de pH, para lo cual se midió el crecimiento a pH 2,5; 4,5 y 7; se evaluó por un periodo de 3 horas, con toma de información cada hora. Para ello, se usó medio MRS comercial y el pH fue ajustado con ácido tartárico, las condiciones de incubación fueron de 32°C durante 48 horas.

Seguidamente, se usaron dos medios de cultivo para evaluar los parámetros cinéticos de *L. casei*: el primer medio fue el MRS comercial y el segundo el Pro, este último compuesto por 10 g/l de azúcar blanco, 8 g/l de extracto de carne y 4 g/l de extracto de levadura (Jurado-Gómez 2010). Para determinar la cinética de crecimiento se tomó un Erlenmeyer por cada medio, se adicionaron 60 ml de inóculo de *L. casei* y 540 ml de medio, se llevaron a incubación en incubadora Shaker® con agitación constante a 32°C y 100 rpm, no se controló el pH debido a las características de la cepa que resiste niveles bajos. Posteriormente, se evaluó la cepa durante 24 horas, realizando mediciones cada 2 h 24 min. En cada medición se determinó conteo de microorganismos viables en placa (UFC/ml), pH, azúcar total, producción de ácido láctico y proteína.

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:

$$v_{\max} = \frac{d \ln X}{dt}$$

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

$$td = \frac{\ln 2}{v_{\max}}$$

El nivel de proteína se determinó con el método de Lowry *et al.* (1951), con modificación de Malara y Charra (1972); se obtuvo una curva patrón a partir de seroalbúmina bovina, luego se midió la absorbencia en espectrofotómetro a 625 nm. La concentración fue graficada contra los valores para obtener la ecuación de la línea recta.

Posteriormente, se determinó la viabilidad de *L. casei* a dos temperaturas (38 y 45°C), el tiempo de evaluación se llevó hasta la fase exponencial encontrada en la cinética de fermentación en el medio MRS (16 h 48 min). Se usó el procedimiento descrito por Crueger y Crueger (1993), ajustando el inóculo a 0,125 en escala de McFarland y se incubó hasta las 16 h 48 min, luego se hicieron diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-12} con agua peptonada, se sembró en cajas de petri con azul de anilina y se inició en la dilución 10^{-8} hasta 10^{-12} a 37°C y 48 horas para determinar el recuento de UFC/ml.

Paso seguido, se tomó una muestra de sobrenadante de *L. casei* y se determinó el contenido de péptidos mediante espectrofotometría de alta densidad (HPLC), para ello, se usó una alícuota de 25 ml de sobrenadante, la cual fue centrifugada a 18000 rpm durante 30 minutos y 4 °C; luego se condujeron 2 ml en jeringa de filtrar (0,25 micras) y finalmente se hizo la lectura en el espectrofotómetro a 650 nm y se obtuvieron los resultados.

Para determinar la producción de ácidos orgánicos se tomó una alícuota de caldo de crecimiento y se centrifugó a 8500 rpm, enseguida se filtró en membrana de 0,25 μm y se determinó la producción mediante HPLC de la siguiente manera: solvente de fase móvil, ácido sulfúrico a pH 1,5; presión, 800-900 PSI; volumen inyectado, 20 L; temperatura del horno, 65°C; columna BIORAD aminex HPX87 H con soporte de resina trasplantada H+ (copolímero de estireno y bisulfato de divinilbenzeno), (Brizuela 2003).

Posteriormente, se efectuó prueba de sensibilidad a los antibióticos sobre las bacterias (patógenas y láctica) con la técnica de Bauer (1966). Los antibióticos evaluados fueron: 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).

Para conocer el efecto inhibitorio de *L. casei* sobre las otras bacterias, se utilizó la metodología de Tagg y McGiven (1971), modificada por Jurado-Gómez *et al.* 2014.

Por otro lado, se determinó el efecto del sobrenadante de *L. casei* sobre las bacterias patógenas. Para ello, primero se ajustó la bacteria láctica a 1 en la escala de McFarland ($3,0 \times 10^8$ UFC/ml), luego se tomaron muestras de 1,5 ml, se depositaron en tubos Eppendorf® y se centrifugaron a 15000 rpm y 4°C de temperatura, durante 15 minutos. Luego de esto, se tomó el sobrenadante, el cual fue evaluado de dos maneras, el primero, filtrado en papel filtro de 0,45 μm y el segundo, sin filtrar; posteriormente, las muestras se conservaron refrigeradas a 4°C hasta su análisis.

Para evaluar el efecto del sobrenadante de *L. casei* se usó la metodología de Bauer (1966) modificada por Jurado-Gómez *et al.* 2014. Se usaron dos procedimientos el primero, discos de papel pads y el segundo, cilindros de punta de pipeta estéril con 6 mm de diámetro, para ambos métodos se usaron tres concentraciones (50, 75 y 100 μl de sobrenadante).

Para realizar la evaluación estadística se usó el paquete SAS 9.1 (2004). La evaluación de la cinética de fermentación de los medios MRS y PRO se realizó a través de un análisis de medidas repetidas en el tiempo, con el uso del 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

Por último, se determinó la correlación entre los métodos del sobrenadante con el procedimiento PROC CORR y se establecieron ecuaciones de regresión lineal simple de las variables pH, ácido láctico, consumo de proteína, consumo de azúcar y crecimiento (LN UFC/ml) como variables independientes, teniendo en cuenta únicamente los datos de crecimiento desde el inicio hasta la fase exponencial en el medio MRS mediante el procedimiento PROC REG.

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

donde:

y : variable a evaluar

β_0 :Intercepto.

β_{x_l} :Pendiente.

e : error.

RESULTADOS

Se logró identificar las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* en las muestras de leche de vacas con mastitis subclínica y aislarlas para su posterior uso.

Las pruebas de sales biliares bovinas y bilis bovina mostraron crecimientos superiores a 10^9 UFC/ml. Las pruebas de producción de gas y catalasa fueron negativas y la viabilidad a diferentes valores de pH mostró un crecimiento de $1,1 \times 10^{11}$; $2,0 \times 10^{10}$ y $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml para 2; 4,5 y 7, respectivamente.

Se encontró la fase exponencial de crecimiento a las 16 h 48 min con un crecimiento de $3,3 \times 10^{10}$ UFC/ml. El pH inicial fue de 6,1; de 4,94 durante la fase exponencial y de 4,32 en la fase final; en el análisis de regresión se observó un descenso del pH de -0,117 (r^2 0,63 $p < 0,05$) (Figura 1). Por su parte, el azúcar mostró un valor inicial de 5,98 mg/l, de 2,87 mg/l durante la fase exponencial y de 1,79 mg/l en la fase final (Figura 2); el análisis de regresión determinó un descenso de -0,289 mg/l (r^2 0,763 $p < 0,05$).

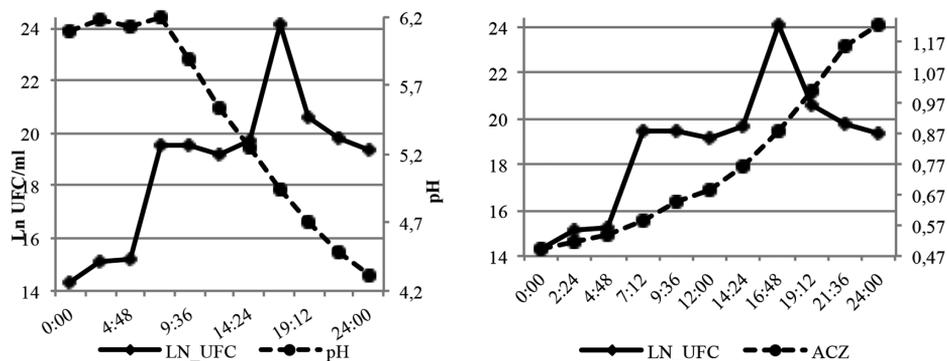


FIGURA 1. Crecimiento bacteriano, pH y acidez durante la cinética de crecimiento.

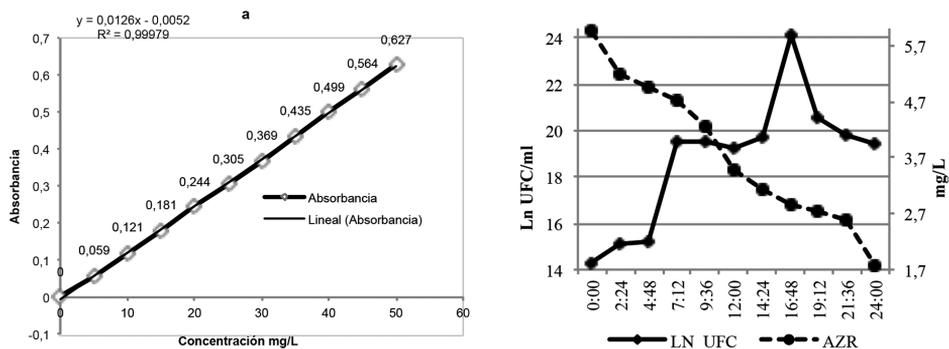


FIGURA 2. Curva patrón de azúcar y consumo de azúcar en la cinética de crecimiento.

En cuanto a la variable acidez, esta mostró un valor de 0,49% en la fase inicial, de 0,88% en la fase exponencial y de 1,23% en la final (Figura 1); la regresión indicó una pendiente de 0,037% (r^2 0,872 $p < 0,05$). A su vez, la variable producción de

proteína mostró un valor inicial, exponencial y final de 0,73; 0,68 y 0,36 mg/l, respectivamente (Figura 3); el análisis de regresión determinó que la variable no posee una tendencia cuando se compara con la cinética de crecimiento (r^2 0,002 $p > 0,05$).

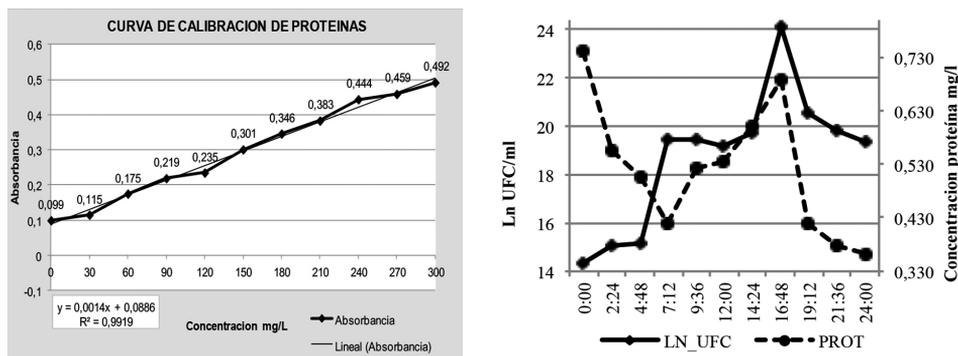


FIGURA 3. Curva de calibración de la proteína y consumo de proteína en la cinética de crecimiento.

Por otro lado, la evaluación de los medios mostró que existieron diferencias significativas entre ellos, con un mayor crecimiento de la bacteria láctica en

el medio Pro ($p < 0,05$). El resumen de datos de la cinética de crecimiento en el medio MRS se puede ver en la Tabla 1.

TABLA 1. Datos sobre la cinética de crecimiento en el medio MRS.

Variable	Valor
Fase latencia	0
Velocidad específica de crecimiento (μ h ⁻¹)	1,233
Fin fase log (h)	16:48
Tiempo de duplicación (min)	33
Incremento cel. Total	2,60E+08
Incremento cel. Fin fase log	3,30E+010
% azúcares consumidos totales	70,07
% azúcares consumidos fin fase log	54,35
% proteína consumida total	51,50
% proteína consumida fin fase log	43,50
Coefficiente de determinación R ²	0,85

Los resultados del sobrenadante para determinar las cadenas pépticas se observan en la Figura 4. Se encontró una cadena de péptidos determinada por

VAL-TIR-VAL en el pico 8, con un tiempo de retención de 12,15 minutos y una concentración de 0,55 mg/ml (Tabla 2).

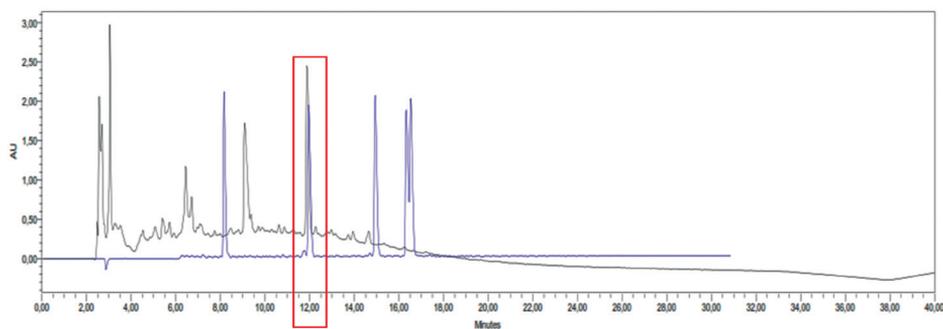


FIGURA 4. Cromatograma del sobrenadante de *Lactobacillus casei*, color azul estándar de péptidos y color negro resultados del sobrenadante de *L.casei*.

TABLA 2. Resultados análisis de péptidos para *L. casei* a 214 nm mediante cromatograma.

Pico n°	Tiempo de retención	Cantidad relativa en % promedio	Concentración
1	2,472	1,09	-
2	2,597	6,97	-
3	2,688	2,78	-
4	2,971	18,08	-
5	7,342	8,62	-
6	7,707	3,01	-
7	9,716	21,86	-
8	12,145	33,85	0,55 mg/ml
9	12,541	0,52	-
10	14,836	1,51	-

En la Tabla 3 se muestra los resultados del análisis de HPLC para determinación de ácidos orgánicos.

TABLA 3. HPLC para ácidos orgánicos usando el sobrenadante de *Lactobacillus casei*.

Bacteria	Ácido cítrico	Glucosa	Ácido succínico	Ácido láctico	Ácido acético	Etanol
<i>L. casei</i>	2.62 (g/L)	3.95(g/L)	0.71 (g/L)	26.5 (g/L)	1.38(g/L)	0.88 (g/L)
	8.30%		2.29%	83.46%	3.51%	2.44%

La prueba de antibióticos indica que *L. casei* presenta resistencia a los antibióticos Dicloxacilina, Cefepima, Cefalotina, Gentamicina, Penicilina y Trimetropim sulfa (Tabla 4 y Figura 5). Por su parte, la cepa de *S. aureus* de referencia fue sensible a Dicloxacilina, Cefepima, Cefalotina, Penicilina, Trimetropim Sulfa y Ampicilina, mientras que la cepa aislada mostró resistencia (Tabla 4). A su vez,

la cepa de *S. epidermidis* de referencia presentó resistencia a la penicilina y la cepa aislada fue resistente a Dicloxacilina, Cefepime, Penicilina y Trimetropin Sulfa. En cuanto a las cepas de *S. agalactiae*, las dos fueron sensibles a todos los antibióticos. Finalmente, de las cepas de *E. coli*, únicamente la aislada mostró resistencia a la gentamicina, siendo sensible a los demás antibióticos.

TABLA 4. Evaluación de sensibilidad (**S**) y resistencia (**R**) a antibióticos en cepas aisladas y de referencia.

	DCX	FEP	KF	CIP	CN	P	TF	AM
Cepas de Referencia								
<i>L. casei</i>	R	R	R	S	R	R	R	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	-	-
<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.

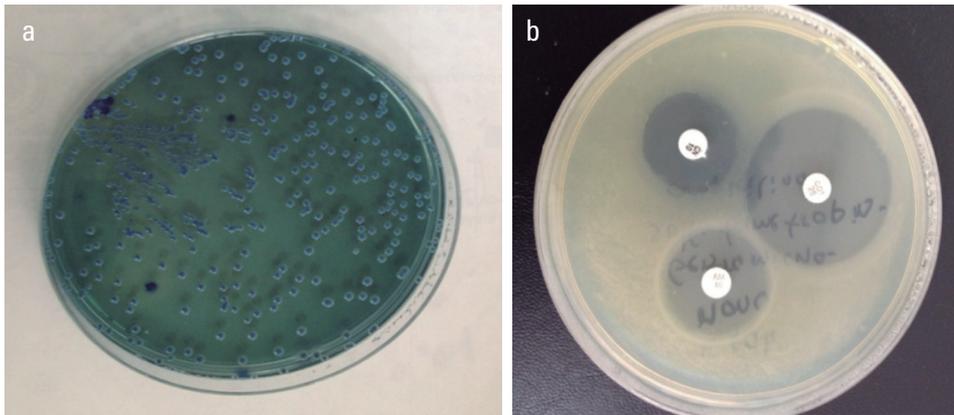


FIGURA 5. a: *L. casei* con azul de anilina; **b:** halos de inhibición de los antibióticos de Gentamicina, Dicloxacilina y Ampicilina, sobre *S. aureus*.

En la Figura 6 se puede observar que las cepas de referencia fueron susceptibles a la bacteria láctica, sin embargo, entre las bacterias aisladas

se encontró resistencia de *E. coli* a todas las concentraciones y resistencia de *S. epidermidis* a concentraciones de 25 y 100 µl.

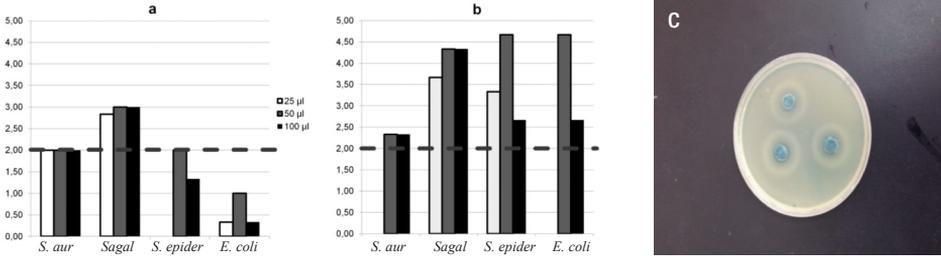


FIGURA 6. Halos de inhibición de la bacteria láctica sobre las bacterias patógenas. **a:** bacterias aisladas, **b:** bacterias de referencia, **c:** fotografía de los halos de inhibición.

En las figuras 7 y 8 se observa la inhibición del sobrenadante de *L. casei* sobre las bacterias patógenas.

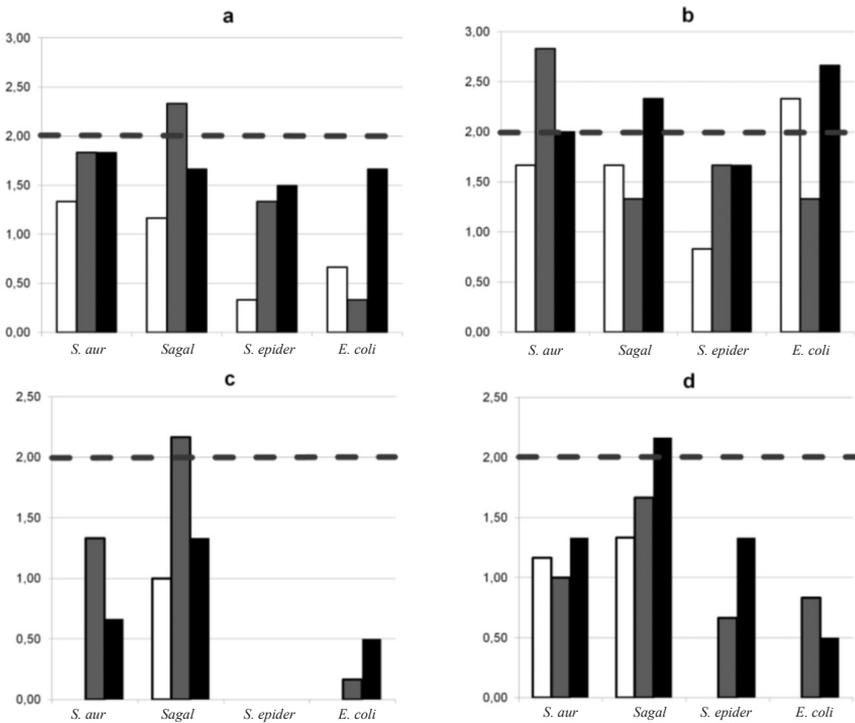


FIGURA 7. Inhibición del sobrenadante de *L. casei* sobre las bacterias patógenas aisladas. **a:** sensidisco con filtro, **b:** sensidisco sin filtro, **c:** cilindro con filtro, **d:** cilindro sin filtro.

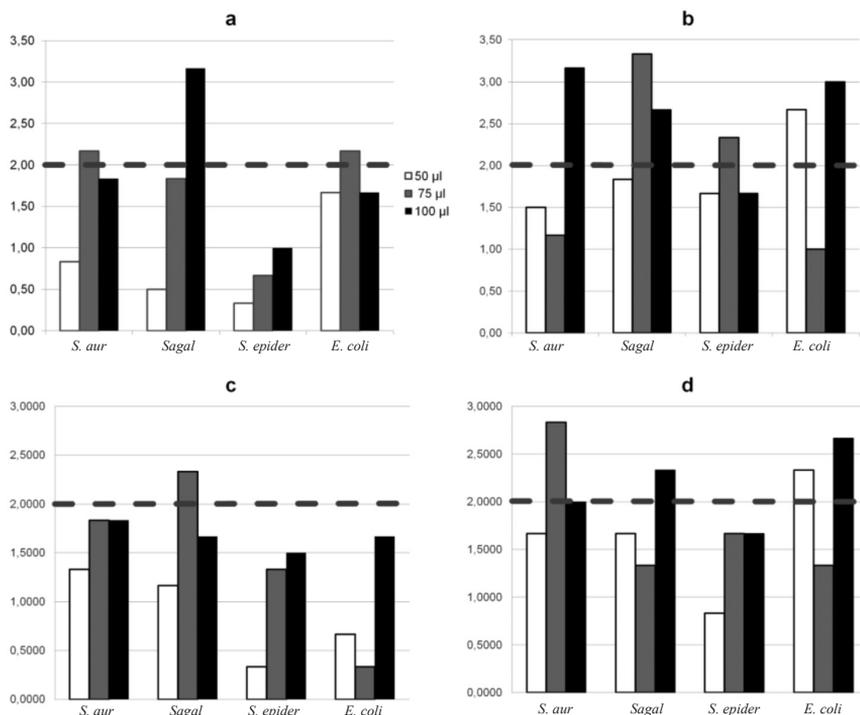


FIGURA 8. Inhibición del sobrenadante de *L. casei* sobre las bacterias patógenas de referencia. **a:** sensidisco con filtro, **b:** sensidisco sin filtro, **c:** cilindro con filtro, **d:** cilindro sin filtro.

No se encontró relación entre los métodos evaluados para el sobrenadante, ya que el análisis de correlación fue bajo (0,12 $p > 0,05$), por consiguiente las metodologías observadas en la presente investigación necesitan evaluarse de mejor manera.

DISCUSIÓN

La cepa láctica mostró un crecimiento adecuado en los diversos ambientes evaluados (temperatura, pH, sales biliares, bilis). Su crecimiento se encuentra por encima de los reportados como aceptables ($< 10^9$) para una adecuada colonización del tracto digestivo. En este sentido, uno de los factores de mayor importancia en la selección de cepas probióticas es la viabilidad a diferentes valores de pH (Salvatierra

et al. 2004; Tuomola *et al.* 2001). En su caso, el crecimiento a niveles bajos de pH permite la colonización de lugares difíciles como el estómago, lo cual trae como beneficio el bloqueo de los sitios de adhesión para bacterias patógenas y la producción de metabolitos antimicrobianos (Shiva-Ramayoni 2007). A su vez, las pruebas de bilis y sales biliares mostraron resistencia de la cepa láctica al estrés producido por estas sustancias, factor de importancia si se considera que para una correcta colonización del sistema digestivo de los animales la cepa administrada de forma oral, debe tener la capacidad de crecer en las diferentes condiciones presentes en el huésped. (Melgar-Lalane *et al.* 2014)

El valor obtenido durante la fase exponencial muestra que la cepa láctica posee

características adecuadas de crecimiento en el medio MRS, además, el nivel de crecimiento es bueno para la producción de inóculos con miras a la obtención de probióticos (Pérez-Luyo 2008). Los resultados obtenidos a las 16 h 48 min indican que la cepa alcanza niveles de crecimiento adecuados para colonizar la mucosa intestinal; así mismo, el tiempo necesario para alcanzar la fase exponencial fue superior a lo reportado por Jurado-Gómez (2010) en *L. plantarum*. Así pues, con este nivel de crecimiento la bacteria láctica tendrá la capacidad de competir con bacterias patógenas, con beneficios en el huésped, reduciendo la translocación y la inflamación intestinal (Adawi *et al* 1997); además, estimula la producción de musina en el epitelio celular (Mack *et al* 2003; Pérez-Luyo 2008).

Los resultados de pH encontrados muestran que *L. casei* favorece procesos de fermentación cuando se produce un inóculo; de esta manera, se observa un crecimiento a niveles bajos de pH, condición adecuada para resistir el ambiente estomacal de los animales (Prescott *et al*. 2002); lo anterior demuestra que la cepa láctica es acidúrica, con crecimiento a pH inferior a 5 (Ben Ounis *et al*. 2008), esta capacidad de resistencia se logra a través de mecanismos celulares que mantienen el pH cerca de la neutralidad. A su vez los valores encontrados para azúcar total muestran una adecuada fermentación de los nutrientes presentes en el medio, lo que favorece su crecimiento. De esta manera, el medio posee las condiciones necesarias para producir inóculos a nivel industrial (Pyo *et al*. 2005), al respecto Ben *et al*. (2008) mencionan que las bacterias lácticas utilizan diferentes oligosacáridos entre los que se encuentran estaquiosa y rafinosa durante la cinética de fermentación.

De otra parte, la resistencia de las cepas aisladas a los antibióticos evaluados puede deberse a una mala administración de medicamentos a los animales afectados, sin realización de un previo diagnóstico que identifique el microorganismo causante de la enfermedad (Montes *et al*. 2003). En efecto, las bacterias patógenas poseen varios mecanismos de resistencia a los antibióticos como: modificación enzimática del antibiótico, bombas de expulsión, cambios en la permeabilidad de la membrana externa y alteraciones del sitio de acción, que dificultan el manejo terapéutico de las enfermedades producidas por estos microorganismos (Tafur *et al*. 2008). Esta característica se ha convertido en un problema para el productor, dado que las cepas al ser más resistentes a los antibióticos, dificultan el control de enfermedades importantes para el adecuado desarrollo de la industria lechera (Bedolla y Ponce de León 2008).

Entre tanto, la cepa láctica mostró efectividad en el control de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. agalactiae*, pero no fue efectiva con *E. coli*. Esto permite inferir que la bacteria es un buen competidor contra las bacterias patógenas susceptibles, presentándose como una alternativa para el manejo de mastitis ocasionada por estos microorganismos. Al respecto, Soleimani *et al*. 2010 encontraron resultados similares al evaluar *L. casei* con *S. aureus* aislada de vacas con mastitis. Los resultados del sobrenadante muestran el mismo comportamiento de la cepa láctica.

Las anteriores características muestran el potencial de *L. casei* como probiótico para la industria lechera. Sin embargo, se debe evaluar la cepa en condiciones *in vivo*, para determinar si su comportamiento se encuentra o no afectado por otras condiciones no evaluadas en la pre-

sente investigación. El uso de probióticos permite sustituir los antibióticos en el manejo de enfermedades animales, ya que son métodos menos agresivos y no tiene efectos secundarios con impacto en la salud del ser humano. Además, evaluar cepas que tengan la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos propios de una región, permite mejorar el control de los mismos, ya que se han encontrado cambios en el grado de efectividad de cepas que han sido evaluadas en lugares diferentes al de su aplicación final (Frizzo *et al.* 2002).

Finalmente, el resultado obtenido para producción de ácidos orgánicos muestra una efectiva producción de ácido láctico por parte de la bacteria lo cual es indicativo de que la bacteria láctica puede alterar el medio donde se encuentra, favoreciendo la inhibición de otros microorganismos (Helander 1997), la producción del metabolito se debe a la fermentación de hexosas usando la vía de Embden-Meyerhoff y como producto final se obtiene además de ácido láctico, también ácido acético, etanol y ácido fórmico (Zhan *et al.* 2006).

CONCLUSIONES

Se concluye que *Lactobacillus lactis* presenta características adecuadas como agente inhibidor de bacterias patógenas causantes de mastitis subclínica en la región de Nariño (Colombia).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adawi D, Kasravi FB, Molin G, Jeppsson B. 1997. Effect of *Lactobacillus* supplementation with and without arginine on liver damage and bacterial translocation in an acute liver injury model in the rat. *Hepatol.* [Internet]. [Citado 2013 abril 10]; 25(3): 642-647. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9049212>.
- 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>.
- Ben Ounis W, Champagne CP, Makhloufa J, Bazineta L. 2008. Utilization of tofu whey pre-treated by electromembrane process as a growth medium for *Lactobacillus plantarum* LB17. Desalination. [Internet]. [Citado 2014 enero 20]; 229(1): 192-203. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011916408002828>. Doi:10.1016/j.desal.2007.08.019
- Bouchard DS, Rault L, Berkova N, Le Loir Y, Even S. 2013. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasión into Bovine Mamary Epithelial Cells by contact with live *Lactobacillus casei*. *Appl Environ Microbiol.* [Internet]. [Citado 2014 enero 20]; 79(3):877-885. Disponible en: <http://aem.asm.org/content/79/3/877.full>. Doi: 10.1128/AEM.03323-12.
- 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.
- Crueger W, Crueger A. 1993. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. 3° ed. España: Acribia 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.
- Frizzo L, Sequeira G, Rosmini MR, Binner J, Zequin L. 2002. Evaluación de la actividad antimicrobiana de cepas bacterianas indígenas aisladas de terneros lactantes. En: Actas de las Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas 2002. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario. Casilda, Argentina. p. 59-60.
- Helander IM, von Wright A, Mattila TM. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends Food Sci Technol.* [Internet]. [Citado 2013 febrero 10]; 8(5): 146-150. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224497010303>. Doi: 10.1016/S0924-2244(97)01030-3.
- Ingrassia I, Leplingard A, Darfeuille-Michaud A. 2005. *Lactobacillus casei* DN-114001 Inhibits the Ability of Adherent-Invasive *Escherichia coli* Isolated from Crohn's Disease Patients To Invade Intestinal Epithelial cell. *Appl Environ Microbiol.* [Internet]. [Citado 2015 marzo 25]; 71 (6): 2880-2887. Disponible en: <http://aem.asm.org/content/71/6/2880.full>. Doi: 10.1128/AEM.71.6.2880-2887.2005.
- 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>.
- [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.
- Lowry OH, Rosebroug NJ, Far L, 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>.
- Mack DR, Ahrné S, Hyde L, Wei S, Hollingsworth MA. 2003. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells *in vitro*. [Internet]. [Citado 2013 abril 10]; 52(6): 827-833. Disponible en: <http://gut.bmj.com/content/52/6/827.full.pdf+html>.
- 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.
- Melgar-Lalanne G, Rivera-Espinoza Y, Farrera-Rebollo R, Hernández-Sánchez H. 2014. Survival under stress of halotolerant lactobacilli with probiotic properties. *Rev Mex de Ing Quím.* [Internet]. [Citado 2013 abril 10]; 13(1): 323-335. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v13n1/v13n1a24.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 diciembre de 2013]. Disponible en: <http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/pH-y-acidez-en-leche2.pdf>.
- Parassol N, Freitas M, Thoreux K, Dalmaso G, Bourdet-Sicard R, Rampal P. 2005. *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Research in Microbiology.* [Internet]. [Citado 2015

- marzo 20]; 156 (2): 256-262. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250804002633>. Doi: 10.1016/j.resmic.2004.09.013.
- Park D, Oh S, Ku KH, Mok C, Kim SH, Imm JY. 2005. Characteristics of yogurt-like products prepared from the combination of skim milk and soymilk containing saccharified-rice solution. *International journal of food sciences and nutrition*. [Internet]. [Citado 2014 agosto 20]; 56 (1): 23-34. Disponible en: <https://brainmass.com/file/341664/!d8b3d987d98ad984d9872032.pdf>.
- Pastor-Guizar JI, Bedolla-Cedeño JLC. 2005. Determinación de la prevalencia de mastitis bovina en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, mediante la prueba de califormia. *Revista Electrónica de Veterinaria*. [Internet]. [Citado 2013 abril 10]; 9(10): 1-34. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101008/101004.pdf>.
- 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.
- Pyo YH, Lee TC, Lee YC. 2005. Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria. *Food Res Int*. [Internet]. [citado 2013 noviembre 24]; 38(5): 551-559. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996904002698>. Doi: 10.1016/j.foodres.2004.11.008.
- Rodríguez JC, Carmenate MC, Hernandez JE, Guerra A, Calero I, Álvarez JM, Martín E, Suárez M. 2009. Evaluación del suministro de un preparado biológico de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus* en cerdos en crecimiento. *Rev Comp Prod Porcina*. [Internet]. [citado 2013 noviembre 24]; 16(1): 54-58. Disponible en: http://www.iip.co.cu/RCPP/161/161_09artJCRguez.pdf.
- 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.
- Salvatierra M, Molina A, Gamboa M, Arias M. 2004. Evaluación del efecto de cultivos probióticos presentes en yogurt sobre *Staphylococcus aureus* y la producción de termonucleasa. *Arch Latinoamer Nutric*. [Internet]. [citado 2013 diciembre 12]; 54 (3): 298-302. Disponible en: http://www.alanrevista.org/ediciones/2004-3/efecto_cultivos_probioticos_yogurt_staphylococcus_aureus_termonucleasa.asp.
- Santacruz YA. 2004. Impregnación de *Lactobacillus* en productos de manzana. [Tesis de Maestría en Biotecnología]. [Cholula, Puebla (México)]; Escuela de Ciencias,
- Départamento de Química y Biología, Universidad de las Américas Puebla.
- SAS Institute Inc. 2004. *SAS/STAT® 9.1 User's Guide*. Cary (NC): SAS Institute Inc.
- Shiva-Ramayoni CM, . 2007. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. [Tesis doctoral]: Universitat Autònoma de Barcelona.
- Soleimani NA, Kermanshahi RK, Yakhchali B, Sattari TN. 2010. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli against *Staphylococcus aureus* isolate from bovine mastitis. *Afr J Microbiol Res*. 4(20): 2169-2173.
- Tafur J, Torres J, Villegas M. 2008. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*. [Internet]. [Citado 2015 enero 22]; 12(3): 227-232. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922008000300007.
- 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>.
- Tuomola, E, Crittenden R, Playne M, Isolauri E, Salminen S. 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *The American journal*

- of clinical nutrition, [Internet]. [Citado 2014 julio 2]; 73 (2): 393s-398s. Disponible en: <http://ajcn.nutrition.org/content/73/2/393s.full.pdf+html>.
- 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. Rev Cent de Est en Salud. 1(4): 19-25.
- Zhan YZ, Bon J, Kelly JM. 2006. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus fungi*. Biochem Eng J. [Internet]. [Citado 2013 julio 18]; 35(1): 251-263. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X0700054X>. Doi: 10.1016/j.bej.2007.01.028.

Article citation:

Jurado-Gómez H, Gúzman-Insuasty M. 2015. Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición *in vitro* de *Lactobacillus casei* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* [Determination of kinetic, tests and growth inhibition effect of *Lactobacillus casei in vitro in Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus agalactiae and Escherichia coli*]. Rev Med Vet Zoot. 62(2): 23-39.
Doi: 10.15446/rfmvz.v62n2.51992.