

DOI:10.18684/BSAA(14)18-28

CINÉTICA, PRUEBA DE CRECIMIENTO Y EFECTO DE INHIBICIÓN DE *Lactococcus lactis* SOBRE *Yersinia pseudotuberculosis*

KINETIC, TEST OF GROWTH AND INHIBITION EFFECT *Lactococcus lactis* ON *Yersinia pseudotuberculosis*

CINÉTICA, PROVA DE CRESCIMENTO E EFEITO DE INIBIÇÃO *Lactococcus lactis* ON *Yersinia pseudotuberculosis*

HENRY JURADO-GÁMEZ¹, ALEJANDRO ROMERO-BENAVIDES², ALEXANDER MORILLO-GARCÉS³

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas han demostrado una alta capacidad para inhibir microorganismos patógenos, por lo que mejorar el conocimiento de este tipo de microorganismos es importante. Para ello, se determinó la cinética, el crecimiento y el efecto de inhibición de Lactococcus lactis sobre Yersinia pseudotuberculosis. La investigación se realizó en la Universidad de Nariño, mediante antibiograma en todas las cepas; inhibición in vitro de Lc. lactis y su sobrenadante sobre la bacteria patógena; pruebas gastrointestinales en la cepa láctica (producción de gas y catalasa, bilis, sales biliares y 2 temperaturas), cinética de crecimiento y determinación de péptidos por HPLC en el sobrenadante. Se encontró resistencia a la dicloxacilina en ambas cepas. La cepa láctica y el sobrenadante inhibieron a Y. pseudotuberculosis. Se encontró crecimientos de 3×10^{11} y $3,9 \times 10^{10}$ UFC/150 μ L al 3 y 5% de sales biliares, 5×10^{12} y 3×10^{11} UFC/150 μ L a 1 y 2% de bilis bovina y 3×10^{13} y 3×10^{12} UFC/150 μ L a 38 y 45°C. La fase logarítmica de Lc. lactis se encontró a las 3 horas con valores de $6,4 \times 10^{12}$ UFC/150 μ L. Se encontró el péptido VAL-TIR-VAL en el sobrenadante. Se concluye que Lc. lactis muestra características probióticas en condiciones in vitro.

Recibido para evaluación: 10 de Abril de 2016. **Aprobado para publicación:** 13 de Julio de 2016.

- 1 Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Departamento de Producción y Procesamiento Animal, Programa de Zootecnia, Grupo de investigación FISE-PROBIOTEC. Ph. D. Ingeniería de alimentos. Pasto, Colombia.
- 2 Universidad de Nariño, Grupo de investigación FISE-PROBIOTEC. Zootecnista. Pasto, Colombia.

Correspondencia: henryjugam@gmail.com

ABSTRACT

Lactic acid bacteria have demonstrated a high ability to inhibit pathogenic microorganisms, which improve knowledge of such microorganisms is important, for this, the kinetics was determined, growth and the inhibition effect of Lactococcus lactis on Yersinia pseudotuberculosis. The research was conducted at the University of Nariño, by susceptibility testing in all strains; in vitro inhibition of Lc. lactis and supernatant on bacterial pathogen; gastrointestinal lactic strain testing (gas production and catalase, bile, bile salts and 2 temperatures), growth kinetics and HPLC determination of peptides in the supernatant. dicloxacillin resistance was found in both strains. Lactic strain and the supernatant inhibited Y. pseudotuberculosis. growths and $3,9 \times 10^{10}$ 3×10^{11} CFU/150 uL to 3 to 5% bile salts, 3×10^{11} 5×10^{12} and CFU/150 uL 1 and 2% bovine 3×10^{13} and 3×10^{12} bile and CFU/150 uL was found 38 and 45°C. The logarithmic phase of Lc. lactis was found at 3 hours with values $6,4 \times 10^{12}$ CFU/150 uL. The VAL-TIR-VAL peptide was found in the supernatant. It is concluded that Lc lactis shows probiotic characteristics in vitro conditions.

RESUMO

Bactérias do ácido láctico têm demonstrado uma elevada capacidade de inibir microrganismos patogênicos, que melhoram o conhecimento de tais microrganismos é importante, por isso, foi determinada a cinética, o crescimento e o efeito de inibição de Lactococcus lactis em Yersinia pseudotuberculosis. A pesquisa foi conduzida na Universidade de Nariño, por testes de sensibilidade em todas as estirpes; inibição in vitro de Lc. lactis e sobrenadante de agente patogênico bacteriano; testes gastrointestinal lático estirpe (produção de gás e a catalase, biliar, sais biliares e 2 temperaturas), cinética de crescimento e determinação por HPLC de peptídeos no sobrenadante. resistência dicloxacilina foi encontrada em ambas as linhagens. estirpe láctico e o sobrenadante inibida Y. pseudotuberculosis. crescimentos e $3,9 \times 10^{10}$ 3×10^{11} UFC/150 uL de 3 a 5% de sais biliares, 3×10^{11} 5×10^{12} e CFU/150 uL de 1% e 2 3×10^{13} 3×10^{12} bovina e biliar e CFU/150 uL foi encontrado 38 e 45°C. A fase logarítmica de Lc. lactis foi encontrada em 3 horas com valores $6,4 \times 10^{12}$ CFU/150 ul. VAL-TIR-VAL péptido foi encontrada no sobrenadante. Concluiu-se que Lactococcus lactis, mostra características probióticas em condições in vitro.

INTRODUCCIÓN

Los lactobacilos se encuentran presentes en una amplia variedad de nichos ecológicos, siempre que en ellos exista abundante fuente de carbohidratos hidrosolubles, productos de degradación de proteínas, vitaminas y una tensión de oxígeno reducida. Se pueden encontrar en hábitats tan variados como la leche y sus derivados, y formando parte de la microbiota gastrointestinal y genitourinaria de humanos y animales. Las bacterias ácido lácticas (BAL) son las que mejor toleran la acidez y muchas se utilizan en la industria alimentaria [1].

PALABRAS CLAVE:

Probiótico, Antibióticos, Fermentación, Antagonismo.

KEYWORDS:

Probiotics, Antibiotics, Fermentation, Antagonism.

PALAVRAS-CHAVE:

Probióticos, Antibióticos, Fermentação, antagonismo.

La investigación microbiológica está en busca de organismos probióticos para el control de bacterias patógenas. Los probióticos tienen un efecto benéfico en el tracto intestinal, manteniendo y fortaleciendo los mecanismos de defensa, sin alterar las funciones fisiológicas y bioquímicas [2]. Los principales géneros utilizados como probióticos en cultivos son *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Bacillus*, *Bacteroides* y *Lactobacillus* [3].

La *Yersinia* es un microorganismo infeccioso importante en humanos y animales. Se han encontrado 11 especies, de las cuales, tres son consideradas patógenas: *Yersinia pestis*, algunos serotipos de *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis* [4]. La principal fuente de infección de estas, es la vía oral a través de los alimentos; además los roedores son vectores importantes de diseminación de la bacteria [5].

Esta investigación buscó determinar la cinética, el crecimiento y el efecto de inhibición de *Lactococcus lactis* sobre *Yersinia pseudotuberculosis*.

MÉTODO

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Pecuarias y los Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño, ubicados en la ciudad de Pasto con una temperatura promedio de 14°C, a una altura de 2540 msnm, precipitación anual promedio de 1084 mm y humedad relativa del 76%.

Se usó la cepa comercial *Lactococcus lactis* *supsp. lactis* ATCC® 11454 (*Lc. lactis*) y la cepa patógena *Yersinia pseudotuberculosis* NCTC 8580. Estas fueron reconstituidas de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial. La bacteria láctica se conservó mediante repique en medio sólido (cajas con agar MRS) cada 5 días y en medio líquido (tubos con caldo MRS) cada 8 días; y para la bacteria patógena se usó caldo BHI como medio líquido y agar McConkey como medio sólido. Las condiciones de incubación fueron a 37°C y 24 h, para luego ser refrigeradas hasta su utilización (4°C).

Lc. lactis fue cultivado de la siguiente manera: En un Erlenmeyer se tomaron 40 mL de caldo MRS estéril, en este se depositó una alícuota de la bacteria conservada y se incubó por 24 h a 37°C; terminada la incubación, se tomaron 4 mL del incubado y se de-

positaron en otros 40 mL de caldo MRS, que fueron incubados en iguales condiciones. El inóculo fue ajustado mediante la metodología de Crueger y Crueger [6], para ello, se tomó 90 mL de caldo MRS estéril y se añadió 10 mL de inóculo de acuerdo con la regla, al terminar la incubación, se hizo lectura directa de 1 mL en espectrofotómetro (625 nm), cuando la población fue superior a la establecida, se agregó caldo estéril teniendo en cuenta la propuesta de Guerrero ajustado por Jurado-Gámez *et al.* [7].

Se realizaron pruebas de susceptibilidad a antibiótico en *Lc. lactis* y *Y. pseudotuberculosis*; los antibióticos evaluados fueron Gentamicina (CN 10 µg), Penicilina (P10 IU), Ciprofloxacina (CIP 5 µg), Dicloxacilina (DCX 1 µg) y Cefalotina (KF 30 µg). La técnica utilizada fue Kirby Bauer [8]; para ello, las bacterias fueron depositadas en un tubo con 1 mL de agua destilada, cada cepa por separado y los tubos fueron incubados a 37°C, hasta obtener la turbidez ópticamente comparable con el estándar 0,5 de MacFarland; enseguida, el contenido se transfirió a cajas de Petri con agar Müller Hilton y se distribuyó con un hisopo de algodón. Por otra parte, se tomaron, con pinza estéril, discos impregnados con cada uno de los antibióticos y se colocaron sobre el agar con algo de presión para que se adhieran al medio; luego se invirtieron las cajas de Petri y se incubaron a 37°C por 18 h; al terminar el tiempo de incubación, se midió el halo formado entre el borde del disco y el borde máximo de inhibición.

De igual manera, se evaluó el efecto de inhibición producido por *Lc. lactis* sobre *Y. pseudotuberculosis* mediante la metodología de Tagg y McGiven [9]. Se tomó una alícuota de *Lc. lactis* y se ajustó a escala McFarland 4 ($1,2 \times 10^9$ UFC/mL) y se cultivaron en cajas de Petri con agar MRS y azul de anilina a concentraciones de 50, 75, 100 y 150 µL, finalmente se incubaron a 37°C por 24 h. La bacteria patógena fue ajustada a escala MacFarland 0,5 y cultivada en cajas de Petri con agar Müller Hilton y agar TSA (Tryptona soya agar). Del agar MRS incubado con la bacteria láctica, se tomaron discos y se colocaron en las cajas incubadas con la bacteria patógena, luego se incubó a 37°C por 12 h. Al finalizar el periodo de incubación se midieron los halos de inhibición. Se determinó susceptibilidad de la cepa patógena cuando el halo fue igual o superior a 2 mm [10].

Se extrajo el sobrenadante de *Lc. lactis*; para ello, se ajustó la concentración de la bacteria a 4 en la escala McFarland; 625 nm. De esta, se tomó varias muestras

de 1,5 mL y se depositaron en tubo Eppendorf para centrifugar a una temperatura de 4°C con 15.000 rpm durante 15 min. Se tomó el sobrenadante de cuatro formas, la primera sin filtrar y sin exponer a temperatura; la segunda sin filtrar y se llevó a 80°C por 5 min; la tercera filtrada sin exposición a temperatura y la cuarta filtrada y llevada a 80°C, para filtrar, se usó papel filtro de 0,2 µm. Cada muestra se refrigeró a 4°C para posterior análisis.

Los anteriores sobrenadantes se evaluaron mediante la metodología de Kirby Bauer [8] modificada; el sobrenadante se colocó en papel pads, sobre el cual se depositó concentraciones de 50, 75, 100 y 150 µL [11]. Los discos fueron colocados en cajas de Petri con la bacteria patógenas y se incubaron a 37°C y 24 h.

Se determinó el crecimiento de la cepa láctica a concentraciones de 3, 4 y 5% de sales biliares bovinas y 0,5, 1 y 2% de bilis bovina. La cepa se cultivó en caldo MRS durante 24 h; 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.

Se realizaron pruebas de producción de gas y catalasa a la bacteria láctica [12].

Se evaluó el crecimiento de la cepa láctica a cuatro pH 2,5, 3,5, 4,5 y 6, el registro se realizó durante tres horas, con toma de muestras cada hora. La cepa fue incubada en medio MRS comercial y el pH se ajustó con la adición de ácido tartárico o hidróxido de sodio para mantener el pH. Las condiciones de incubación fueron de 32°C por 48 h.

Se evaluó la cinética de fermentación de *Lc. lactis* en los medios de cultivo MRS y PRO, este último compuesto por 10 g/L de azúcar blanco, 15 g/L de leche de soya, 150 g/L de suero de leche y 15 g/L de salvado de trigo [13], para cada medio se tomó un Erlenmeyer, al cual se adicionó 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 dado la resistencia de la cepa. Durante la cinética se evaluó: conteo de microorganismos viables en placa (UFC/150 µL), determinación de pH, consumo de azúcar total, determinación de ácido láctico y consumo de proteína. Las mediciones se realizaron cada 4 h.

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 (150 µL) para siembra en superficie. Las cajas fueron incubadas a 32°C y se observaron entre 24 y 48 h. 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/150 µL [14].

Para determinar el pH se tomó una muestra del medio y se midió con pHmetro digital (JENCO® VisionPlus).

El método de Dubois [15] fue usado para determinar el azúcar total, se prepararon diferentes concentraciones de glucosa para crear una curva patrón mediante los valores obtenidos de las muestras observadas a una densidad óptica de 625 nm. Los valores se graficaron contra la concentración en mg/L, finalmente se obtuvo los valores de la línea recta.

La acidez fue determinada mediante titulación con hidróxido de sodio (1N). La biomasa se determinó por los métodos de Crueger y Crueger [6] y Rodríguez et al [16], para ello se estableció la velocidad máxima de crecimiento mediante la siguiente ecuación:

$$v_{\max} = \frac{d \ln X}{dt} \quad (\text{Ec. 1})$$

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

$$t_d = \frac{\ln 2}{v_{\max}} \quad (\text{Ec. 2})$$

Se cuantificó el consumo de proteína mediante el método de Lowry y Col [17], con modificación de Malara y Charra [18], se realizó una curva de calibración mediante seroalbúmina bovina y se determinó la absorbancia en espectrofotómetro a 750 nm. Los valores

obtenidos fueron graficados contra la concentración para obtener la ecuación de la línea recta.

Se evaluó la viabilidad de *Lc. 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 [6], para ello se ajustó el inóculo de acuerdo con la escala de MacFarland 0,125, la incubación duró 24 h de iniciada la prueba, enseguida se realizó 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^{-6} hasta la máxima disolución, las cajas se incubaron por 48 horas a 37°C para determinar el recuento de colonias en UFC/150 μ L.

Se tomó una muestra de sobrenadante y con ella se identificó el contenido de péptidos mediante HPLC. Se tomó 1 mL de muestra y se filtró en jeringa PVDF, Pall de 0,25 μ m, enseguida se conservó a -20°C, protegida de la luz hasta su estudio. Los péptidos se identificaron mediante el análisis de los picos integrados de los espectros UV detectados mediante el sistema PDA. Se empleó como patrón de referencia una mezcla de péptidos (Sigma H2016), se realizó 4 réplicas para la muestra.

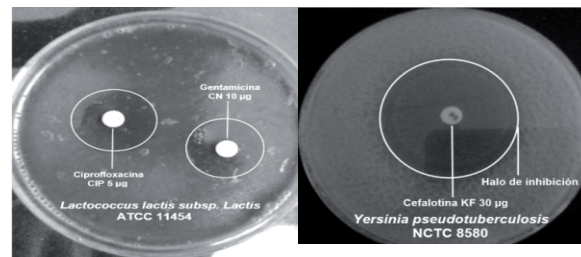
Los datos fueron evaluados mediante el paquete estadístico SAS 9.1 [19]. Para comparar los medios y la prueba de pH, se utilizó un diseño estadístico de medidas repetidas en el tiempo, con el procedimiento PROC MIXED de SAS.

Cuadro 1. Susceptibilidad de *Lc. lactis* a diferentes antibióticos.

Antibióticos	<i>Lc. lactis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
P	40 Sab	24 Sabe
KF	22 Sa	43 Sa
CIP	26 Sbc	40 Sad
CN	24a	28 Sacd
DCX	0 Rab	0 Rd

S: sensible, **R:** resistente. **a.** Centro de controle e produtos para diagnósticos Ltda. CECON. **b.** Manual para antibiograma LABORCLIM. **c.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twenty-Fourth Informational Supplement. **d.** EUCAST Europea comitte on antimicrobial susceptibility testing. **e.** Calpa y Chaspuengal. P: penicilina 10 IU; KF: cefalotina 30 μ g; CIP: ciprofloxacina 5 μ g; CN: gentamicina 10 μ g; DCX: 1 μ g.

Figura 1. Halos de inhibición en las dos cepas.



Izquierda *Lc. lactis*; derecha *Y. pseudotuberculosis*.

RESULTADOS

Susceptibilidad frente a antibióticos

En el cuadro 1 y figura 1 se aprecia los resultados obtenidos para la prueba de susceptibilidad de *Lc. lactis*.

Gueimonde *et al.* [20] mencionan que la resistencia a los antibióticos es un peligro potencial cuando se presenta en los microorganismos benéficos, ya que estos podrían convertirse en reservorios que pueden transferir resistencia a microorganismos patógenos y oportunistas. Este fenómeno se debe a la modificación en el ADN bacteriano, producto de una mutación o la transferencia de plásmidos, trasposones o integrones [21].

Los resultados indican que la cepa láctica muestra sensibilidad a la mayoría de los antibióticos evaluados. Según Devirgiliis *et al.* [22], el género *Lactococcus* presentan poca resistencia adquirida; además, es sensible a macrólidos y antibióticos de amplio espectro como aminoglicósidos (gentamicina y kanamicina) vancomicina, tetraciclinas y cloranfenicol. Flores [23] informa que en la cepa *Lc. lactis* K214, aislada de un queso fresco fabricado con leche cruda, se halló un plásmido (pK214), portador de tres genes de resistencia a estreptomycin, cloranfenicol y tetraciclina. A pesar de existir resistencia a las dicloxacilina, se necesita conocer qué tipo de resistencia es, ya que no todas son transferibles, pero se puede inferir que *Lc. lactis* es una cepa potencialmente segura.

Los resultados obtenidos para la cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* se observan en el cuadro 1 y figura 1. Esta prueba determinó sensibilidad a la penicilina, cefalotina, ciprofloxacina y gentamicina y mostró resistencia únicamente a dicloxacilina.

En un estudio similar, Pérez-Guerra [24] encontró que *Y. pseudotuberculosis* presentó resistencia a la

dicloxacilina y Blair *et al.* [25] reportaron resultados análogos en cuanto a la dicloxacilina, además de resistencia a la penicilina y cefalotina. Las diferencias podrían deberse a una adaptación de la bacteria patógena. La presencia de resistencia a antibióticos es un fenómeno natural que puede ocurrir por la propagación de los sistemas de defensa que presentan las cepas. Estos pueden ser generados por cambios en genes, en donde proteínas codificadas pueden modificar su actividad hasta que son capaces de proteger o modificar el blanco de acción.

Evaluación *in vitro* sobre *Y. pseudotuberculosis*

Los resultados del ensayo *in vitro* de *Lc. lactis* sobre *Y. pseudotuberculosis* se observan en la figura 2. Se encontró que la bacteria patógena fue sensible a todas las concentraciones, produciendo halos de 3, 4, 4 y 3 mm a 50, 75, 100 y 150 μ L respectivamente.

La acción inhibitoria de *Lc. lactis* se puede explicar por la producción de compuestos antimicrobianos. Según Khemariya *et al.* [26], *Lc. lactis* es capaz de producir compuestos como ácido, peróxido de hidrógeno y nisina, los cuales se han identificado por contribuir en la actividad antimicrobiana de esta bacteria.

Khemariya *et al.* [26] afirman que la nisina se ha descrito como un péptido extracelular con una extensa acción antimicrobiana frente a bacterias gram positivas nocivas y bacterias patógenas. Según Tong *et al.* [27] *Lc. lactis* tiene características dominantes en la competencia contra bacterias, debido a la producción de la bacteriocina nisina. Los mismos autores señalan que en estudios con *Lc. Lactis*, se encontra-

Figura 2. Discos de agar impregnados *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*



Cuadro 2. Halos producidos por el sobrenadante de *Lc. lactis* (sensidisco).

Modelo	Halo (mm)			
	50 μ l	75 μ l	100 μ l	150 μ l
Filtrado pH 6	2	2	2	2
Filtrado pH 6 80°C	2	2	3	3
Sin filtrar pH 6	2	2	2	2
Sin filtrar pH 6 - 80°C	2	2	2	2

ron resultados que demuestran la acción antagonica frente a *Streptococcus mutans*, una de las principales bacterias cariogénicas.

Los ensayos de inhibición *in vitro* del sobrenadante de *Lc. Lactis* sobre *Y. pseudotuberculosis* se observan en el cuadro 2. Se presentaron halos de 1, 2 y 3 mm, donde la mayoría de estos tiene un valor de 2 mm.

Según Faouzi *et al.* [28] la actividad inhibitoria del sobrenadante de *Lc. lactis* se explica por la producción de bacteriocinas estables al calor y los ácidos orgánicos. Esta afirmación es acorde con los resultados encontrados en este estudio, ya que se presentaron halos de inhibición, en el sobrenadante con 80°C.

Los resultados encontrados en la investigación son similares a los reportados por Sadiq *et al.* [29], donde se observa actividad antimicrobiana de *Lc. Lactis* frente a *E. coli* y *S. aureus*, al igual que los resultados reportados por Hemaiswarya *et al.* [30]; y Vegas *et al.* [31]. Esto demuestra la capacidad inhibitoria de la cepa láctica sobre la bacteria patógena y su importancia en la utilización como probiótico.

Viabilidad de *Lc. lactis* frente a sales biliares y bilis bovina

En el ensayo de viabilidad frente a diferentes concentraciones de sales biliares, *Lc. Lactis* reportó valores entre $7,8 \times 10^9$ a 3×10^{11} UFC/150 μ L a una concentración de 3%, $5,6 \times 10^9$ a $5,4 \times 10^{10}$ UFC/150 μ L al 4% y $4,4 \times 10^9$ a $3,9 \times 10^{10}$ UFC/150 μ L al 5% de sales biliares.

En cuanto a la viabilidad a diferentes concentraciones de bilis bovina, *Lc. lactis* reportó valores de 8×10^{11} , 5×10^{12} y 3×10^{11} UFC/150 μ L en las concentraciones de 0,5, 1 y 2% respectivamente.

La resistencia de las cepas a bilis y sales biliares bovinas es importante, debido a que tienen que enfrentarse

al ambiente gastrointestinal, especialmente durante su pasaje por el intestino delgado (Melgar-Lalanne *et al.* [32]. Muchas cepas mueren cuando el medio en que se desarrollan es básico (pH superiores a 8) [33]. Los resultados muestran que *Lc. lactis* muestra un adecuado crecimiento a las concentraciones evaluadas.

Producción de gas y actividad de catalasa de *Lc. lactis*

Este ensayo permitió establecer que *Lc. lactis* no produjo gas y fue catalasa negativo. Según Castillo-Martínez *et al.* [34] la enzima catalasa, degrada el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y para poder hacerlo requiere de un grupo porfirínico (citocromo), mismo que las BAL no pueden sintetizar; por tal motivo las BAL no poseen catalasa y esto permite identificarlas como catalasa negativas. Con respecto a la producción de gas, Agüero *et al.* [35] comentan que la ausencia de gas de una bacteria probiótica es una de las características deseables para ser utilizada como cultivo iniciador en la industria cárnica; además de evitar problemas de gases en el organismo hospedero cuando se administra en forma oral [36].

Cinética de fermentación

Conteo unidades formadoras de colonia. *Lc. lactis* presentó su fase exponencial en el tiempo 3 (12 h) para el medio MRS y 4 (16 h) para el medio PRO con valores de $6,4 \times 10^{12}$ y 3×10^{11} UFC/150 μ L

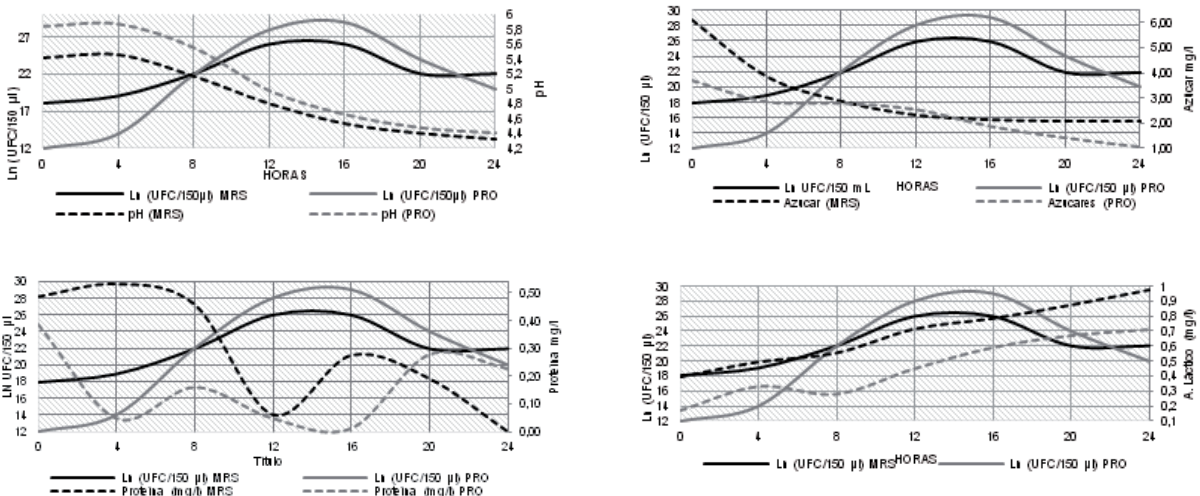
Los resultados de la fase exponencial demuestran que la cepa tiene un crecimiento rápido, esta característica es importante, ya que a nivel industrial, el tiempo tiene un efecto sobre los costos de producción de inóculos viables [37]. Las cepas que tienen un tiempo menor para llegar a la fase exponencial muestran menores costos de producción [38].

Determinación de pH. En la figura 3 se observa que en la fase logarítmica existe una mayor producción de biomasa a un pH de 4,8 y 4,66, para el medio MRS y PRO respectivamente.

Se observa que el pH disminuye durante la cinética en ambos medios de cultivo (MRS y PRO). De acuerdo con Abdel-Rahman *et al.* [39], la reducción en el pH del medio es consecuencia de la producción de ácido láctico y ácidos orgánicos en el medio. Los resultados muestran la efectividad de la cepa láctica en reducir el pH, con valores cercanos a 4,3 al final de la fermentación. Tabasco *et al.* [40] mencionan que uno de los mecanismos antagónicos de las cepas lácticas es la reducción del pH, debido a que muchas bacterias no crecen en pH ácidos (2 a 4), por lo cual este es un factor importante en la evaluación de cepas con características probióticas.

Consumo de azúcares totales. El consumo de azúcar en los medios MRS y PRO presentó valores de 2,17 y 1,87 mg/L en la fase exponencial de la cinética para los medios MRS y PRO (figura 3).

Figura 3. pH, azúcar y LN UFC/ μ L de MRS y Pro en la cinética de fermentación.



El consumo de azúcar demuestra que la cepa hace un adecuado uso de los carbohidratos del medio de cultivo, lo que se convierte en ácido láctico en el medio por los procesos fermentativos de las bacterias lácticas [39]. La producción de ácido láctico tiene como consecuencia la reducción del pH, sustancia antagónica para bacterias patógenas.

Ácido láctico. Los resultados obtenidos para la prueba de acidez se pueden observar en la figura 3, donde se encontraron valores de acidez de 0,71 y 0,45% para los medios MRS y PRO respectivamente, durante la fase exponencial.

Los resultados indican que *Lc. lactis* muestra un incremento en la producción de ácido láctico a través del tiempo, lo anterior responde a que las cepas necesitan el azúcar del medio para realizar sus funciones fisiológicas y como producto de la fermentación se obtiene ácido láctico [40]. El ácido láctico es producido en forma comercial como conservante de productos alimenticios, ya que inhibe el crecimiento de microorganismo en los alimentos; de igual manera, se ha observado que inhibe el crecimiento de bacterias patógenas en el tracto gastrointestinal del hospedero [41], por lo que su producción por parte de las BAL es importante.

Consumo de proteínas. El consumo de proteínas en la fase exponencial mostró un consumo de 0,06 y 0,05 mg/L en los medios MRS Y PRO respectivamente (figura 3).

Se observan fluctuaciones en los niveles de proteína en el medio, el consumo de proteína muestra incrementos en algunos de los tiempos de evolución, este tipo de comportamiento puede ser la respuesta a la utilización de la proteína del medio y su posterior uso en el construcción de sustancias peptídicas como son la bacteriocinas [42].

En el cuadro 3 se observa el resumen de la cinética de fermentación para ambos métodos,

El tiempo de duplicación celular de *Lc lactis* registro valores de 28,2 y 56,12 minutos, en los medios PRO y MRS respectivamente. Por su parte, Ahmed *et al.* [43] afirman que tres cepas de *Lc. Lactis* en leche en polvo reconstituida sin grasa, reportaron tiempos de duplicación celular de 68,16, 65,68 y 60,17 minutos. Las diferencias en cuanto al tiempo de duplicación pueden explicarse por la acción del medio, ya que estos, ofrecen una variada cantidad de aportes nutricionales.

Cuadro 3. Resumen cinético de *Lc. lactis* en los medios MRS y PRO.

Lactococcus lactis	MRS	PRO
Fase de latencia	0	0
Velocidad específica de crecimiento (μ h ⁻¹)	0,741	1,475
Fin fase logarítmica (horas)	12:00	12:00
Tiempo de duplicación celular (minutos)	56,12	28,2
R2 fin fase logarítmica	0,9462	0,9524

Los resultados de la cinética de fermentación permitieron establecer que el medio PRO es el más adecuado en términos de tiempo y velocidad para el crecimiento de la bacteria láctica, ya que permite la obtención de inóculos adecuados en el menor tiempo posible.

Susceptibilidad en diferentes niveles de temperatura. Se encontró que *Lc. lactis* obtuvo conteos comprendidos entre $3,6 \times 10^8$ y 3×10^{13} UFC/150 μ L a una temperatura de 38°C y valores entre $2,36 \times 10^8$ y 3×10^{12} UFC/150 μ L a temperatura de 45°C respectivamente.

La temperatura de crecimiento de las BAL ha sido descrita por diferentes autores. Smith *et al.* [45] encontraron que ciertas cepas de *Lc. lactis* muestran resistencia a elevadas temperaturas como consecuencia de mutaciones en su ADN. Sin embargo, los lactobacillus se consideran mesófilos, lo que indica un crecimiento entre 20 y 40°C [46]. Se han encontrado deficiencias en el crecimiento a altas temperaturas cuando el medio es insuficiente en riboflavina [47]. De acuerdo con lo mencionado, las BAL estudiadas, concuerdan dentro de los rangos anteriormente mencionados.

Los resultados encontrados en este estudio indican que la temperatura y el período de incubación son factores importantes que modulan el crecimiento de las BAL, según Ghareed *et al.* [48] estas características pueden llegar a afectar considerablemente las cantidades producidas de metabolitos antimicrobianos y reducir su capacidad antagónica.

Determinación de péptidos. Los resultados de HPLC indicaron la presencia de la cadena peptídica VAL-TIR-VAL con una concentración de 0,62% mg/mL. Sin embargo, no se pudo determinar la presencia de péptidos relacionados con bacteriocinas en el sobrenadante.

CONCLUSIONES

Lc. lactis y su sobrenadante inhibieron a *Y. pseudotuberculosis*, lo que indica que la cepa puede ser evaluada en condiciones *in vivo*. El crecimiento a diferentes condiciones gastrointestinales demostró que es viable su administración por vía oral y resiste procesos industriales con temperaturas de 40°C en condiciones *in vitro*. La producción de inóculos es adecuada y presenta un rápido crecimiento, con lo que se reduce los costos de producción.

REFERENCIAS

- [1] WANG, S., CHANG, C., CHAN, S., SHIEH, J., CHIU, C. and DUH, P. Effects of lactic acid bacteria isolated from fermented mustard on lowering cholesterol. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4(7), 2014, p. 523-528.
- [2] SANDERS, M., GUARNER, F., GUERRANT, R., HOLT, P., QUIGLEY, E. and SARTOR, A. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut*, 62(5), 2013, p. 787-796.
- [3] LAMARI, F., SADOK, K., BAKHROUF, A. and GATESOUBE, F. Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics and *in vivo* test on *Artemia nauplii*. *Aquaculture international*, 22(2), 2014, p. 699-709.
- [4] CORREA, R. Sanidad en cuyes. Memorias V curso y V congreso Latinoamericano de Cuyicultura. Puerto Ayacucho (Venezuela): Mesa Redonda sobre Cuyicultura Periurbana, Tomo I, 1999, p. 11-14.
- [5] DAVOUST, B., DIATTA, G., SHAKO, J., RAJERISON, M., ABEDI, A. and KARHEMERE, S. Sero-prevalence of *Yersinia pestis* in dogs and small rodents in one hyperendemic plague focus of Democratic Republic of Congo. *African Journal of Microbiology Research*, 7, 2013, p. 1622-1624.
- [6] CRUEGER, W. y CRUEGER, A. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. 1 ed. Madrid (España): Acribia, 1993, 650 p.
- [7] JURADO-GÁMEZ, H., MARTÍNEZ-BENAVIDES, J., CHASPUENGAL-TULCÁN, A. y CALPA-YAMA, F. Evaluación *in vitro* de la acción de *Lactobacillus plantarum* con características probióticas sobre *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(2), 2014, p. 49-59.
- [8] BAUR, A. and KIRBY, J. Antibiotic susceptibility testing by a standardize single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 36, 1966, p. 493-496.
- [9] TAGG, J. and Mc GIVEN, A. Assaysystem for Bacteriocins. *Applied Environment Microbiology*, 21(5), 1971, p. 943.
- [10] JURADO-GÁMEZ, H., JARRÍN-JARRÍN, V. y PARRERO-SALAS, J. Crecimiento de *Lactobacillus plantarum* y efecto sobre *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. perfringens* y *S. aureus*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(2), 2015, p. 57-66.
- [11] JURADO-GÁMEZ, H., CALPA-YAMA, F. y CHASPUENGAL-TULCÁN, A. Determinación *in vitro* de la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum* sobre *Yersinia pseudotuberculosis* aislada de *Cavia porcellus*. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 61(3), 2014, p. 241-257.
- [12] CAI, Y., SUYANANDANA, P., SAMAN, P. and BENNO, Y. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *Journal of General and Applied Microbiology*, 45(4), 1999, p. 177-184.
- [13] RAMÍREZ, M., AGUIRRE, D. y JURADO-GÁMEZ, H. Cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico. *Veterinaria y Zootecnia*, 7(2), 2013, p. 37-53.
- [14] JARRÍN-JARRÍN, V., GUZMÁN-INSUASTY, M. y JURADO-GÁMEZ, H. 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*. *Revista Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 62(2), 2015, p. 40-56.
- [15] DUBOIS, M., GILLES, K., HAMILTON, J., REBERS, P. and SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 1956, p. 350-356.
- [16] RODRÍGUEZ, L., BUENO, G., RODRÍGUEZ, D., SERRANO, P. and BRIZUELA, M. True and apparent maintenance coefficient and their significance on fermentation kinetics. *New Horizons Biotechnology*, 2003, p. 163-162.
- [17] LOWRY, O., ROSEBROUG, N., FAR, A. and RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biologica Chemistry*, 193, 1951, p. 265-75.
- [18] MALARA, G. and CHARRA, R. Dosage des proteines particulaires selon la methode the Lowry:

- Note interne de travail. N° 5. Paris (France): Station Zoologique de Vellafranche-Sur-Mer, 1972, 52 p.
- [19] SAS. Institute Inc. SAS/STAT® 9.1 User's Guide. Cary (USA): SAS Institute Inc., 2004, p. 5136.
- [20] GUEIMONDE, M., SÁNCHEZ, B., DE LOS REYES-GAVILÁN, C.G. and MARGOLLES, A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontier Microbiology*, 4(202), 2013, p. 1-6.
- [21] WERNER, G., COQUE, T.M., FRANZ, C.M., GROHMANN, E. and HEGSTAD, K. Antibiotic resistant enterococci—tales of a drug resistance gene trafficker. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6), 2013, p. 360-379.
- [22] DEVIRGILIIS, C., ZINNO, P. and PEROZZI, G. Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. *Frontier Microbiology*, 4, 2013, p. 301-312.
- [23] FLÓREZ-GARCÍA, A. Perfiles de susceptibilidad / resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bifidobacterias. Caracterización molecular de genes de resistencia [Ph.D. Tesis Microbiología]. Oviedo (España): Universidad de Oviedo, Departamento de biología funcional, 2007, 191 p.
- [24] PÉREZ-GUERRA, N. Modeling the batch bacteriocin production system by lactic acid bacteria by using modified three-dimensional Lotka-Volterra. *Biochemical Engineering Journal*, 88, 2014, p. 115-130.
- [25] BLAIR, J.M., WEBBER, M.A., BAYLAY, A.J., OGBOLU, D.O. and PIDDOCK, L.J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 2015, p. 42-51.
- [26] KHEMARIYA, P., SINGH, S., NATH, G. and GULATI, A. Diversity Analysis, Batch Fermentation and Characterization of Nisin in Identified Strains of *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. *Food Biotechnology*, 28, 2014, p. 142-161.
- [27] TONG, Z., ZHOU, L., LI, J., KUANG, R., LIN, Y. and NI, L. An in vitro investigation of *Lactococcus lactis* antagonizing cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. *Archives of oral biology*, 57(4), 2011, p. 376-382.
- [28] FAOUZI, L., KHOUADJA, S., AMINA, B. and FRANCOIS, G. Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics and in vivo test on *Artemia nauplii*. *Aquaculture Environment Interactions*, 22(2), 2014, p. 699-709.
- [29] SADIQ, S., IMRAN, M., HASSAN, M., IQBAL, M., ZAFAR, Y. and HAFEEZ, F. Potential of bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inhabiting low pH vegetables to produce nisin variants. *LWT-Food Science and Technology*, 59(1), 2014, p. 204-210.
- [30] HEMAISWARYA, S., RAJA, R., RAVIKUMAR, R. and CARVALHO, I. Mechanism of action of probiotics. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(1), 2013, p. 113-119.
- [31] VEGAS, C., PICHUHA, B., PEÑA, C. y ZAVALETA, A. Efecto simbiótico del extracto de *Smilax chifolius* (yacón) y *Lactobacillus plantarum* frente a *Escherichia coli*. *Ciencia e Investigación*, 16(2), 2013, p. 77-82.
- [32] MELGAR-LALANNE, G., RIVERA-ESPINOZA, Y., FARRERA-REBOLLO, R. and HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H. Survival under stress of halotolerant lactobacilli with probiotic properties. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(1), 2014, p. 323-335.
- [33] LAZREG, L., DALACHE, F., ZADI-KARAM, H. and KARAM, N. E. Bacteriocinogenic potential and genotypic characterization of three *Enterococcus faecium* isolates from Algerian raw milk and traditional butter. *African Journal of Biotechnology*, 14(32), 2015, p. 2518-2524.
- [34] CASTILLO-MARTÍNEZ, F., MARCOS-BALCIUNAS, E., SALGADO, J., DOMÍNGUEZ, J., CONVERTI, A. and DE SOUSA-OLIVEIRA, R. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 30, 2013, p. 70-83.
- [35] AGÜERO, N., ALBARRACÍN, A., MIER, A., ALEU, G., ZOGBI, A., ROSMINI, M. and FRIZZO, L. Evaluación de la producción de ácido láctico y gas por cepas autóctonas y comerciales potencialmente iniciadoras y probióticas para productos cárnicos. *Memorias XV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas*. Córdoba (Argentina): Instituto Argentino de Investigaciones, 2014, p. 12-16.
- [36] ELLIS, J.L., BANNINK, A., HINDRICHSEN, I.K., KINLEY, R.D., PELLIKAN, W.F., MILORA, N.L. and DIJKSTRA, J. Effect of lactic acid bacteria inoculants on in vitro rumen organic matter digestibility, total gas and methane production (ON-LINE FIRST). *Animal Feed Science and Technology*, 2016, p. 34-39.
- [37] SARAIVA, M.A.F., NES, I.F., BARACAT-PEREIRA, M.C., DE QUEIROZ, M.V., MANTOVANI, H.A.C. and DE MORAES, C.E.A. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus*

- cus lactis subsp. lactis PD6. 9. J. Microbiology Antimicrobo, 6, 2014, p. 79-87.
- [38] DAS, A., DATTA, S., MUKHERJEE, S., BOSE, S., GHOSH, S. and DHAR, P. Evaluation of antioxidative, antibacterial and probiotic growth stimulatory activities of Sesamum indicum honey containing phenolic compounds and lignans. LWT-Food Science and Technology, 61(1), 2014, p. 244-250.
- [39] ABDEL-RAHMAN, M.A., TASHIRO, Y. and SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. Biotechnology advances, 31(6), 2013, p. 877-902.
- [40] TABASCO, R., DE PALENCIA, P.F., FONTECHA, J., PELÁEZ, C. and REQUENA, T. Competition mechanisms of lactic acid bacteria and bifidobacteria: fermentative metabolism and colonization. LWT-Food Science and Technology, 55 (2), 2014 p. 680-684.
- [41] DOUILLARD, F.P. and DE VOS, W.M. Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. Microbiology Cell Fact, 13(Suppl 1), 2014, p. S8-S17.
- [42] UZELAC, G., KOJIC, M., LOZO, J., ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, T., GABRIELSEN, C. and KRISTENSEN, T. A Zn-dependent metallopeptidase is responsible for sensitivity to LsbB, a class II leaderless bacteriocin of *Lactococcus lactis* subsp. lactis BGMN1-5. Journal of bacteriology, 195(24), 2013, p. 5614-5621.
- [43] AHMED, P., GÓMEZ-LLORENTE, C., PLAZA-DÍAZ, J. and GIL, A. The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases. BioMed Research International, 2015, p. 1-15.
- [45] SMITH, W.M., PHAM, T.H., LEI, L., DOU, J., SOOMRO, A.H., and BEATSON, S.A. Heat resistance and salt hypersensitivity in *Lactococcus lactis* due to spontaneous mutation of *lmg_1816* (*gdpP*) induced by high-temperature growth. Applied and environmental microbiology, 78(21), 2012, p. 7753-7759.
- [46] WILHELM, H. and BRIAN, B. En: Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy: The genus *Lactobacillus*. 1 ed. Hoboken (USA): John Wiley & Sons, Ltd., 2014, 45 p.
- [47] CHEN, J., SHEN, J., SOLEM, C. and JENSEN, P.R. Oxidative stress at high temperatures in *Lactococcus lactis* due to an insufficient supply of riboflavin. Applied and environmental microbiology, 79(19), 2013, p. 6140-6147.
- [48] GHAREEB, K., AWAD, W., MOHL, M., PORTA, R., BIARNÉS, M., BÖHM, J. and SCHATZMAYR, G. Evaluating the efficacy of an avian-specific probiotic to reduce the colonization of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. Poultry Science. 91, 2012, p. 1825-1832.