

Determinación de la cinética de fermentación en dos medios probióticos, pruebas de desempeño *in vitro* y efecto de inhibición de *Lactobacillus plantarum*¹

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Henry Jurado-Gómez ^{2,3}, Javier Martínez-Benavides^{2,3}, Jairo Alexander Morillo-Garcés ³, Darío Alejandro Romero-Benavides ³, Adriana Elisabeth Orbes-Villacorte ³, Laura Nathaly Mesías-Pantoja ³

², Programa de Zootecnia, Departamento de Producción y Procesamiento Animal, Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia.

³, Grupo de investigación en Fisiología y Etología Animal y Procesos Biotecnológicos Aplicados a la Producción Animal - (FISE-PROBIOTEC), Pasto, Colombia.

henryjugam@gmail.com

(Recibido: 14 de Junio de 2016 Aprobado: 17 de Agosto de 2016 Actualizado: 24 de Octubre de 2016)

DOI: 10.17151/vetzo.2016.10.1.3

RESUMEN: en esta investigación se sometió la cepa *Lactobacillus plantarum* a diferentes pruebas *in vitro* en dos medios, que simulaban las condiciones fisiológicas del tracto digestivo, el primero fue el caldo comercial MRS y el segundo fue preparado a base de azúcar, leche de soya, leche en polvo y salvado de trigo (PRO). Se evaluó el crecimiento en relación a la cinética de fermentación, conteo de microorganismos viables en placa (UFC/150µl), tolerancia a pH (2,5; 3,5; 4,5 y 6%), resistencia a temperatura de 38 y 45°C, viabilidad frente a sales biliares (3, 4 y 5% p/v) y bilis (0,5%, 1% y 2% p/v), susceptibilidad frente a antimicrobianos, determinación de proteínas, consumo de azúcares, identificación de péptidos y ácido láctico en muestras de sobrenadante. La fase exponencial en los medios MRS y PRO se presentó a las 16 horas con un consumo de azúcar de 1,71 mg/L y 1,94 mg/L, y un valor de proteína de 1,61 y 1,47 mg/L en los medios MRS y PRO. El sobrenadante registró valores de 6,50 y 6,80 g/L para ácido láctico. *L. plantarum* fue resistente únicamente a dicloxacilina y presentó halos de inhibición sobre *Yersinia pseudotuberculosis* de 6 y 5mm en el sobrenadante; obtuvo conteos de 3×10^{11} y 3×10^{12} UFC/150µl a 38 y 45°C; 1×10^9 UFC/150µl a pH de 6; 4×10^{10} a pH 4,5 y 1×10^9 UFC/150µl a pH 3,5. Finalmente, fue viable a diferentes concentraciones de sales biliares con valores entre 2×10^{11} y 7×10^{13} UFC/150µLy valores entre 2×10^{12} y $2,4 \times 10^{12}$ UFC/150µL para bilis bovina.

Palabras clave: crecimiento, resistencia, bacteria, viabilidad

Determination of kinetics parameters of fermentation in two probiotic means: in vitro tests performance and *Lactobacillus plantarum* inhibition effect

ABSTRACT: *Lactobacillus plantarum* strains underwent different in vitro tests through two means which simulated physiological conditions of the digestive tract; the first was the commercial MRS broth and the second was prepared based on sugar, soy milk, milk powder and wheat bran (PRO). The maximum growth relative to kinetics parameters of fermentation, the count of microorganisms viable in plate (CFU/150 ul), tolerance to pH (2.5; 3.5; 4.5 and 6%), resistance to 38°C and 45°C temperatures, viability against bile salts (3%, 4% and 5% w/v) and bile (0.5%, 1% and 2% w/v), susceptibility to antibiotics, determination of proteins, consumption of sugars, identification of peptides and lactic acid in supernatant samples were evaluated. The exponential phase in MRS and PRO media was presented at 16 hours, with a sugar consumption of 1.71 mg/L and 1.94 mg/L, a protein value of 1.61 and 1.47 mg/L. in the MRS and PRO media. The supernatant recorded values of 6.50 and 6.80 g/L lactic acid. *L. plantarum* was resistant only to dicloxacillin, and presented inhibition halos on *Yersinia pseudotuberculosis* 6 mm and 5 mm in the supernatant; counts of 3×10^{11} and 3×10^{12} CFU/150µl at 38°C and 45°C, 1×10^9 CFU/150µl to pH 6; 4×10^{10} at pH 4.5 and 1×10^9 CFU/150µl to pH 3.5 were obtained. Finally, it was viable to different concentrations of bile salts with values between 2×10^{11} and 7×10^{13} CFU/150µL and values between 2×10^{12} and $2,4 \times 10^{12}$ CFU/150µL for bovine bile.

Key words: growth, resistance, bacterium, viability

Introducción

La importancia de las bacterias ácido lácticas (BAL), como los *Lactobacillus* en Colombia y en el mundo, hace necesario encontrar métodos óptimos para su crecimiento, utilizando sustratos diferentes para su desarrollo (Ossa et al., 2010).

Lactobacillus es uno de los géneros probióticos más importantes y se encuentra casi en cualquier nicho, o lugar donde se encuentren carbohidratos disponibles, se conocen más de 140 especies diferentes que incluyen bacterias Gram positivas, sin movilidad, catalasa negativas, no esporuladas y que pueden desarrollarse en ambientes microaerofílicos o anaeróbicos, pueden presentar formas espiraladas o cocobacilares bajo ciertas condiciones (Smita et al.; Ortiz; Cástulo et al. *apud* Ramírez, 2010).

Además, los *Lactobacillus* producen una amplia variedad de sustancias con acción antimicrobiana como el ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y péptidos de bajo peso molecular llamados bacteriocinas (Yousef; Cástulo et al.; *apud* Ramírez 2010).

Por otro lado, el desarrollo de productos probióticos obedece mayormente a la necesidad de sustituir el empleo de antibióticos en la alimentación animal, los cuales son usados para mantener un buen balance en la microflora del tracto gastrointestinal (TGI) y para eliminar microorganismos patógenos facilitando la reducción de enfermedades gastrointestinales frecuentes en animales (Patterson & Burkholder *apud* Ávila, 2010).

L. plantarum es una bacteria láctica heterofermentativa facultativa, metabólicamente muy flexible y versátil que se encuentra en un gran rango de ambientes, incluyendo los productos lácteos y cárnicos fermentados o el tracto gastrointestinal humano. Sin embargo, su nicho más habitual son los alimentos fermentados de origen vegetal. Posee un genoma relativamente grande con numerosos genes que codifican su capacidad de adaptación a diversas condiciones (Kleerebezem et al. *apud* Cermeño, 2012).

La investigación tuvo como objetivos evaluar las mejores condiciones de la cinética de fermentación de *L. plantarum* en dos medios de cultivo, uno a base de azúcar blanco, leche de soya, leche en polvo y salvado de trigo (medio PRO) comparado con el medio comercial MRS y así determinar el máximo crecimiento de microorganismos viables en placa (UFC/150uL) en la fase exponencial, determinar el consumo de azúcares totales, determinación de proteínas, producción de ácido láctico y péptidos del sobrenadante. Además, comprobar el efecto de inhibición sobre la bacteria patógena *Y. pseudotuberculosis*.

Materiales y Métodos

EL presente estudio fue realizado en el Laboratorio del grupo de investigación FISE – PROBIOTEC y en los Laboratorios Especializados – sección de Cromatografía de la Universidad de Nariño sede Torobajo, municipio de Pasto, departamento de Nariño. Se utilizaron las cepas comerciales *L. plantarum* y *Yersinia pseudotuberculosis*. Estas fueron reconstituidas de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial.

Se cultivó la cepa probiótica de la siguiente manera: En un erlenmeyer se tomó 40ml 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 tomó 4 ml del incubado y se depositaron en otros 40 ml de caldo MRS y se incubó en iguales condiciones. El inóculo fue ajustado mediante la metodología de Crueger & Crueger (1993), para ello, se tomaron 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 1ml en espectrofotómetro (625 nm), cuando la población fue superior a la establecida, se agregó caldo estéril teniendo en cuenta la propuesta de Guerrero ajustada por Jurado (2014).

L. plantarum y *Y. pseudotuberculosis* fueron sometidas a ensayos de inhibición frente a los siguientes antibióticos: penicilina (P 10 IU), cefalotina (KF 30 µg), ciprofloxacina (CIP 5 µg), gentamicina (CN 10 µg), dicloxacilina (DCX 1 µg) mediante la metodología de Bauer et al. (1966); 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, equivalente a $1,5 \times 10^7$ UFC/ml, enseguida, el contenido se transfirió a cajas de Petri con agar Müller Hilton y se distribuyó con un hisopo de algodón. Se incubaron a 37° C por 12 horas; 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 in vitro producido por *L. plantarum* sobre *Y. pseudotuberculosis* mediante la metodología de Tagg & McGiven (1997). Se tomó una alícuota de *L. plantarum*, se ajustó a escala McFarland de 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 horas. Se tomaron los discos y se colocaron en las cajas incubadas con la bacteria patógena, luego se incubó a 37°C por 12 horas. 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 (Jurado et al., 2015).

Se extrajo el sobrenadante de *L. plantarum*; para esto, se ajustó la concentración de la bacteria a McFarland de 4 ($1,2 \times 10^9$ UFC/ml) a 625nm, de esta, se tomaron varias muestras de 1,5 ml y se depositaron en tubo Eppendorf para centrifugar a una temperatura de 4°C con 13.500 rpm durante 15 min. Se tomó el sobrenadante de dos formas, la primera sin filtrar y la segunda filtrada, se la neutralizó a pH 6 para eliminar el efecto de los ácidos, la otra muestra se sometió a calentamiento a 80°C por 10 minutos para eliminar el efecto enzimático. Cada muestra se refrigeró a 4°C para posterior análisis.

Se colocó papel *Pads* con concentraciones de 50, 75 y 100 µl y cilindros estériles de 6mm de diámetro, sobre los cuales se depositaron las mismas concentraciones (los cilindros se obtuvieron de puntas de pipeta estériles; Jurado et al., 2014). Los discos y cilindros fueron colocados en cajas de Petri con las bacterias patógenas. Trascorridas las 12 horas se procedió a medir los halos formados. La distancia se midió desde el borde de la bacteria láctica hasta el borde o extremo del halo. Un halo igual o superior a 2 mm se considera como inhibidor del efecto de la bacteria patógena.

Se evaluó la viabilidad de *L. plantarum* 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 & Crueger (1993), para ello se ajustó el inóculo de acuerdo con la escala 4 de MacFarland, la incubación duró 12 horas; enseguida se realizaron diluciones de 10⁻¹ hasta 10⁻¹² en agua peptonada y se sembraron en cajas de Petri con azul de anilina comenzando en la disolución de 10⁻⁶ hasta 10⁻¹², las cajas se incubaron por 24 horas a 37°C para determinar el recuento de colonias en UFC/150µl.

Se determinó el crecimiento de la cepa láctica a concentraciones de 3, 4 y 5% de sales biliares bovinas y concentraciones de 0,5; 1 y 2% de bilis bovina. La cepa se cultivó en caldo MRS durante 24 horas; 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 entre 12 a 24 horas a 37°C.

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 20 minutos. La cepa fue incubada en medio MRS comercial y el pH se ajustó con la adición de ácido tartárico o hidróxido de sodio. Las condiciones de incubación fueron de 37°C.

Se evaluó la cinética de fermentación de *L. plantarum* en dos medios de cultivo MRS y PRO este último compuesto por 10g/L azúcar blanco; 15g/L leche de soya; 150g/L leche en polvo; 15g/L salvado de trigo Jurado et al. (2014), 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 37°C y 100 rpm. Se tuvieron en cuenta únicamente las cajas de Petri con conteos entre 30 y 300 colonias.

El método de Dubois (1956) 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 obtuvieron 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 & Crueger (1993) y Rodríguez et al. (2003), para ello se estableció la velocidad máxima de crecimiento mediante la siguiente ecuación:

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

En cuanto al tiempo de duplicación celular (td), se determinó teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

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

Se cuantificó el consumo de proteína mediante el método de Lowry et al. (1951), con modificación, se efectuó una curva de calibración mediante seroalbúmina de huevo y se determinó la absorbancia en espectrofotómetro a 750nm. Los valores obtenidos fueron graficados contra la concentración para obtener la ecuación de la línea recta.

Se tomó una muestra de sobrenadante y con ella se identificó el contenido de péptidos mediante HPLC. Se tomó 1ml de muestra y se filtró en jeringa PVDF, Pall de 0,25 µm. Enseguida se conservó a -20°C, protegida de la luz hasta su análisis.

Para establecer el efecto del medio MRS y el medio PRO sobre las variables *L. plantarum*, se realizó un análisis de medidas repetidas en el tiempo, utilizando el procedimiento PROC MIXED del paquete estadístico de SAS teniendo en cuenta un nivel de significancia del 5% (P< 0.05)

Resultados y Discusión

Susceptibilidad frente a agentes antimicrobianos de *Lactobacillus plantarum*. En este ensayo se determinó que *L. plantarum* fue resistente únicamente a la acción del antibiótico dicloxacilina, (Tabla 1, Figura 1). Por su parte *Y. pseudotuberculosis* se observó que tuvo sensibilidad a la penicilina, cefalotina, ciprofloxacina y gentamicina y mostró resistencia únicamente a dicloxacilina.

Tabla 1. Susceptibilidad de *Lactobacillus plantarum* frente a agentes antimicrobianos.

Antibiótico	<i>L. plantarum</i> halo de inhibición (mm)	Sensible (S) Resistente (R)	<i>Y. pseudotuberculosis</i> halo de inhibición en mm	Nivel de sensibilidad
Penicilina P 10 IU	50	S	26	S
Cefalotina KF 30 µg	42	S	42	S
Ciprofloxacina CIP 5 µg	30	S	42	S
Gentamicina CN 10 µg	17	S	26	S
Dicloxacilina DCX 1 µg	0	R	0	R

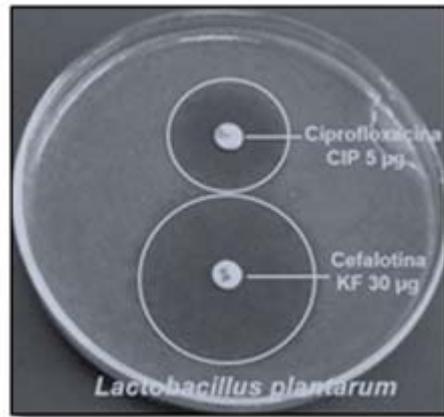


Figura 1. Halos de inhibición *Lactobacillus plantarum*.

Uno de los requisitos que deben cumplir las bacterias benéficas, es que no presenten resistencia a antibióticos, porque debe evitarse el peligro de que las cepas benéficas transfieran genes de resistencia antimicrobianos a bacterias patógenas o potencialmente patógenas que estén presentes en el TGI del huésped (Sanz et al., 2003). Por lo anterior, recomiendan realizar un perfil de susceptibilidad a antimicrobianos para especies con potencialidades probióticas (Charteris et al. *apud* Alvarado & Díaz, 2009). Puesto 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 la resistencia a los microorganismos patógenos y a los oportunistas (Gueimonde et al., 2013).

La 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 (Blair et al., 2015).

Ensayos de inhibición in vitro de *Lactobacillus plantarum* frente a *Yersinia pseudotuberculosis*. Los halos de mayor tamaño, producidos por *L. plantarum*, fueron de 6 mm en la concentración de 75 y 100 µl (Tabla 2, figura 2).

Tabla 2. Inhibición de *L. plantarum* sobre *Yersinia pseudotuberculosis*.

Medio	Concentración (µl) y medida del halo (mm) para <i>Lactobacillus plantarum</i>			
	50 µl	75 µl	100 µl	150 µl
TSA	4 mm	6 mm	6 mm	5 mm



Figura 2. Discos de agar impregnados *Lactobacillus plantarum*.

Según Mishra y Lambert *apud* Delgado (2005), las BAL son capaces de producir varios compuestos con efectos antimicrobianos como ácidos grasos y orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y otras sustancias relacionadas, por tal razón es posible afirmar que *L. plantarum* tuvo el potencial de inhibir a *Y. pseudotuberculosis* por acción individual o conjunta de los compuestos antimicrobianos que se produjeron durante el ensayo.

Acción inhibitoria del sobrenadante de *L. plantarum* frente a *Y. pseudotuberculosis*. En la cual se evidenció tamaños de halos entre 2 y 5mm el cual no depende de la cantidad del sobrenadante de *L. plantarum* (Tabla 3, Figura 3).

Tabla 3. Concentraciones (µl) y halos de inhibición (mm) producidos por el sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* frente a *Yersinia pseudotuberculosis*.

Método	Condición	Concentración (µl) y medida del halo (mm)			
		50 µl	75 µl	100 µl	150 µl
Discos Método modificado	Filtrado pH 6	4 mm	5 mm	3 mm	2 mm
	Filtrado pH 6 - 80°C	3 mm	3 mm	3 mm	2 mm
	Sin filtrar pH 6	2 mm	2 mm	2 mm	2 mm
	Sin filtrar pH 6 - 80°C	2 mm	2 mm	5 mm	3 mm
Difusión en cilindro plástico	Filtrado pH 6	1 mm	2 mm	2 mm	2 mm
	Filtrado pH 6 - 80°C	2 mm	2 mm	2 mm	2 mm
	Sin filtrar pH 6	2 mm	1 mm	2 mm	2 mm
	Sin filtrar pH 6 - 80°C	2 mm	2 mm	2 mm	2 mm

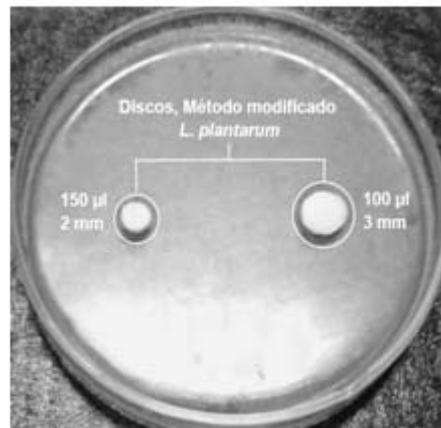


Figura 3. Halos producidos por el sobrenadante *Lactobacillus plantarum*.

El efecto de inhibición del sobrenadante no puede atribuirse en particular a un solo compuesto con efecto antimicrobiano producido por las BAL estudiadas, pero es posible descartar la acción de inhibición causada por la biomasa celular y de compuestos como el ácido láctico y otros ácidos orgánicos mediante el tratamiento de filtrado, neutralización y temperatura al sobrenadante. Por lo antedicho, se presume que la acción inhibitoria del sobrenadante pueda atribuirse a las posibles bacteriocinas producidas por las BAL estudiadas, ya que son péptidos activos producidos por BAL con actividad antimicrobiana, los cuales pueden presentar un espectro de inhibición particular que permite adquirir una posición dominante en un determinado nicho, al eliminar a otras bacterias competidoras Zárate (2009). Por lo tanto, es probable inferir que el sobrenadante de *L. plantarum* pudo presentar compuestos peptídicos (posibles bacteriocinas), las cuales manifestaron su acción de inhibición frente a la cepa patógena.

Resistencia a diferentes niveles de temperatura: *L. plantarum* reportó valores de crecimiento comprendidos entre $2,4 \times 10^8$ y 3×10^{11} UFC/150µL a una temperatura de 38°C y valores entre $2,8 \times 10^8$ y 3×10^{12} UFC/150µL a temperatura de 45°C.

Dalie et al. (2010) mencionan que la temperatura y el período de incubación, son factores esenciales que modulan el crecimiento de las BAL, los cuales pueden llegar a afectar considerablemente las cantidades producidas de metabolitos antimicrobianos. Por tal razón, es importante realizar esta prueba con el fin de determinar la capacidad de crecimiento de las bacterias a ser utilizadas como probióticas.

Existe una temperatura óptima a la cual la velocidad de crecimiento es más alta y las diferencias que se pueden encontrar dependen de las características propias del microorganismo utilizado (Guerra et al. *apud* Caballero, 2014). Para este estudio encontramos que hubo una mayor respuesta en cuanto a crecimiento a temperatura de 38°C.

Viabilidad a diferentes concentraciones de pH: los valores de UFC/150µL reportados para *L. plantarum* en los diferentes pH evaluados, fueron entre 4×10^{10} y

1×10^9 UFC/150 μ L en el pH 6; entre 4×10^{10} y 4×10^{10} UFC/150 μ L a pH 4,5 y entre 1×10^9 y 1×10^8 UFC/150 μ L a pH 3,5.

La capacidad de tolerancia a pH y sales biliares es un criterio de selección y un prerequisite indispensable para que los microorganismos puedan desarrollar sus efectos benéficos en el intestino (Vallejo et al., 2008). De acuerdo con esto, *L. plantarum* puede sobrevivir a los efectos adversos que se presentan en el tracto gastrointestinal, puesto que su viabilidad durante el tiempo presentó conteos elevados. León (2012) recalca la importancia de los probióticos frente a la resistencia de pH bajos, como una necesidad para tolerar y soportar la acidez del estómago de forma exitosa tras el paso por esta porción. Según Prescott, Harley & Klein *apud* por Alvarado & Díaz (2009), la acidez producida por el estómago constituye una de las principales barreras para muchos microorganismos. Por tal razón la prueba de viabilidad a diferentes concentraciones de pH permite determinar el comportamiento de las bacterias probióticas. Para ello, un mecanismo clave para la homeostasis del pH ácido es el transporte de protones fuera del citoplasma por bombas de protones primarios (Slonczewski et al., 2009).

Susceptibilidad en diferentes concentraciones de sales biliares y bilis bovina: en esta prueba *L. plantarum* reportó valores entre $3,5 \times 10^8$ - 7×10^{13} UFC/150 μ l a una concentración de 3%, valores de 3×10^7 - 1×10^{13} UFC/150 μ l al 4% y 3×10^8 - 2×10^{11} UFC/150 μ l al 5% de sales biliares. En cuanto a la viabilidad a diferentes concentraciones de bilis bovina se obtuvieron los resultados de $3,5 \times 10^8$ - 2×10^{12} , $3,3 \times 10^8$ - 3×10^{12} , 6×10^8 , 1×10^{11} - $2,4 \times 10^{12}$ UFC/150 μ l en las concentraciones de 0,5, 1 y 2%.

Pisano et al. (2014) afirman que para llevar a cabo su acción probiótica las bacterias deben llegar al tracto intestinal vivas. Esto requiere su supervivencia durante la elaboración del alimento, la maduración del producto, tiempo de conservación y después del consumo, su resistencia al ácido del estómago, así como a las sales biliares en el intestino, además, esta prueba está dirigida a determinar el grado de tolerancia a la acidez que presentan los *Lactobacillus*. Moreno (2012). De acuerdo con esto, Gómez et al. *apud* Caballero (2014) consideran que uno de los requisitos para la selección de bacterias probióticas sea que resistan y tengan capacidad de crecimiento en contacto con sales biliares.

Este efecto estresante sobre las cepas de *Lactobacillus* es complejo porque la concentración de bilis y el tiempo de residencia varían en cada parte del tracto gastrointestinal. Además, la resistencia a la bilis puede ser incrementada debido al efecto protector de algunos componentes de los alimentos (Frizzo, 2006). De acuerdo con esto, en la composición del medio PRO se encuentra el salvado de trigo, una de las materias primas con contenidos de fibra que pueden aislar a las bacterias y ayudar al paso por el TGI.

Corzo & Gilliland *apud* García et al. (2014) aseguran que en la selección de microorganismos potencialmente probióticos, un punto importante es la evaluación de

su resistencia a las condiciones del TGI puesto que tienen que soportar un bajo pH del estómago y presencia de enzimas digestivas (i.e., pepsina) y el intestino, que contiene bilis.

Cinética de fermentación. La fase exponencial de *L. plantarum*, para los dos medios fue a las 16:00 horas. Donde el medio PRO alcanzó un valor de 3×10^{13} UFC/150 μ l el cual es mayor al del medio MRS donde se encontró $1,2 \times 10^{12}$ UFC/150 μ l. (Figura 4). El efecto del medio de cultivo sobre el conteo de microorganismos en placa para *L. plantarum*, expresado en UFC/150 μ l, presentó diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) a los tiempos 1, 2, 3 y 4, con mayores conteos en el medio PRO (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto del medio de cultivo sobre el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC/150 μ l) de *Lactobacillus plantarum*.

<i>Lactobacillus plantarum</i>							
TIEMPO	1	2	3	4	5	6	7
¹ MRS	6.6×10^8 a	9.3×10^8 a	3.04×10^{10} a	1×10^{11} a	1.2×10^{12} b	4×10^{10} b	3×10^{10} b
² PRO	1.6 x 10^8 b	3×10^9 b	4.8 x 10^{11} b	3×10^{12} b	3×10^{13} b	3×10^{12} b	7×10^{11} b

Letras diferentes en una misma columna entre medios para una misma cepa indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$). ¹Medios de cultivo MRS = Man, Rogosa y Sharpe ²PRO = medio a base de azúcar, leche de soya, leche en polvo y salvado de trigo.

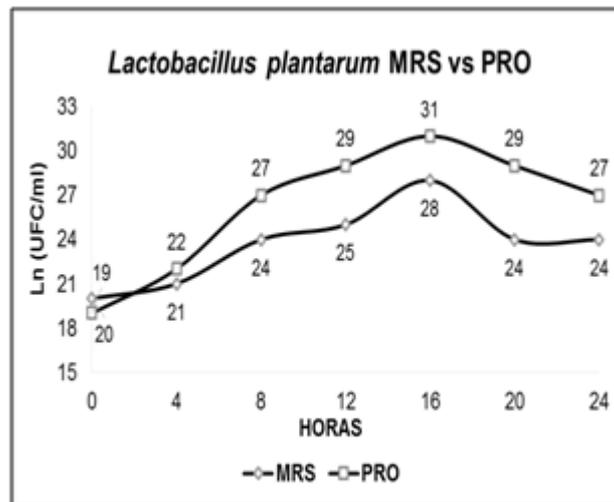


Figura 4. Curva de crecimiento de *L. plantarum* en dos medios (MRS y PRO).

Los microorganismos necesitan carbono, nitrógeno, minerales, para formar su biomasa y como fuente de energía para el mantenimiento celular y la biosíntesis del producto de su metabolismo Orozco & Solarte (2003). Sin embargo Puupponen et al. (2002) infieren que para poder llevar a cabo los beneficios a la salud, la bacteria probiótica debe estar

viable y disponible a altas concentraciones, por lo general, $>10^6$ UFC/g. una ventaja para *L. plantarum* puesto que sus conteos son elevados en su crecimiento.

Finalmente, hubo una mejor respuesta para el medio PRO probablemente a su contenido de nutrientes que facilitó su crecimiento. A pesar de ello, las células deben metabolizar las fuentes de carbono disponibles a fin de reabastecer su energía intercelular antes de iniciar la división celular. Igualmente, si el inóculo está creciendo en un medio que contiene una fuente de carbono diferente a la del nuevo medio, las nuevas enzimas requieren ser inducidas a catabolizar el nuevo sustrato, lo que también contribuye al retardo en el crecimiento celular (Orozco & Solarte, 2003).

Determinación de pH y porcentaje de ácido láctico: en la fase exponencial de *L. plantarum* presenta un pH de 3,61 y 4,66 en el medio MRS y PRO respectivamente y finaliza con valores de 3,52 y 4,60 a las 24 horas de la cinética, además se reportan porcentajes de ácido láctico de 1,8% en medio MRS y 0,7% en el medio PRO ([Figura 5](#)).

El efecto del crecimiento (UFC/150 μ l) sobre el pH del medio de cultivo, presentó diferencias estadísticas significativas ($P<0.05$) en todos los tiempos destacándose un menor pH para el medio MRS (3,75) en comparación con el medio PRO (4,68) al tiempo 4. Por otra parte, el efecto del crecimiento microbiano (UFC/150 μ L) sobre el porcentaje de ácido láctico del medio de cultivo, presentó diferencias estadísticas significativas ($P<0.05$) en todos los tiempos, destacándose el medio MRS con un mayor porcentaje de ácido (2,01; 2,14; y 2,53) en comparación con el medio PRO (0,81; 0,98 y 1,03) en los tiempos 5, 6 y 7.

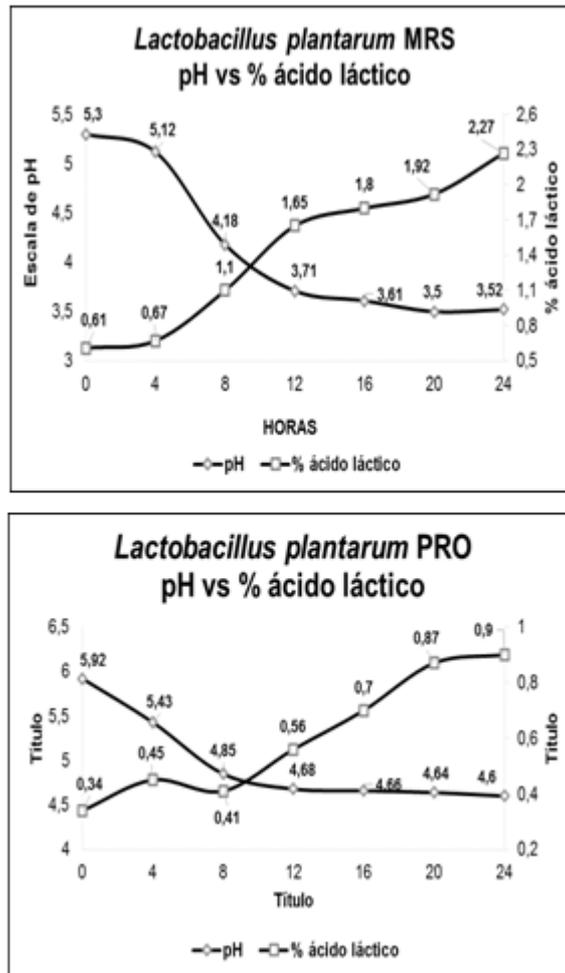


Figura 5. pH y ácido láctico (%) de los medios MRS y PRO y UFC/150µl de *Lactobacillus plantarum*.

Los pH encontrados durante la cinética y sobre todo en la fase de crecimiento exponencial indican que la cepa posee características adecuadas para resistir ambientes con niveles bajos de pH; esta capacidad es importante para un probiótico, dado que le permitirá sobrevivir con crecimientos adecuados. Una cepa que no puede adecuarse a los diferentes ambientes del tracto digestivo, difícilmente podrá llegar a considerarse como un probiótico (Prescott et al. *apud Jurado et al.*, 2015).

Por otro lado, el ácido láctico es un metabolito producto de la fermentación generado por ciertos microorganismos y es clasificado como GRAS (generalmente reconocido como seguro), Vargas (2004). Además las bacterias lácticas son caracterizadas por la producción de diferentes isómeros del ácido láctico mediante la fermentación de la glucosa. Durante la fermentación pueden producir ácido láctico L (+) levorrotatorio o D (-) dextrorrotatorio, o la mezcla de ambos DL (Carr et al., 2002).

Finalmente se pudo evidenciar que la producción de ácido láctico se incrementa simultáneamente mientras que el pH disminuye, su aumento se puede dar hasta el agotamiento de las fuentes de carbono ya que existe una relación inversa entre la acidez

y el pH (Ahmed et al., 2012). Además el uso de carbohidratos fermentables y alcoholes son empleados como fuentes de energía para formar principalmente ácido láctico (Savadogo et al. *apud* Vargas, 2004).

Consumo de azúcares totales y determinación de proteínas: El consumo de azúcar en los medios MRS y PRO presentó valores de 1,71y 1,94 mg/l en la fase exponencial de la cinética (Figura 6). La proteína detectada para *L. plantarum* en la fase exponencial fue de 1,61 y 1,47 mg/L en los medios MRS y PRO.

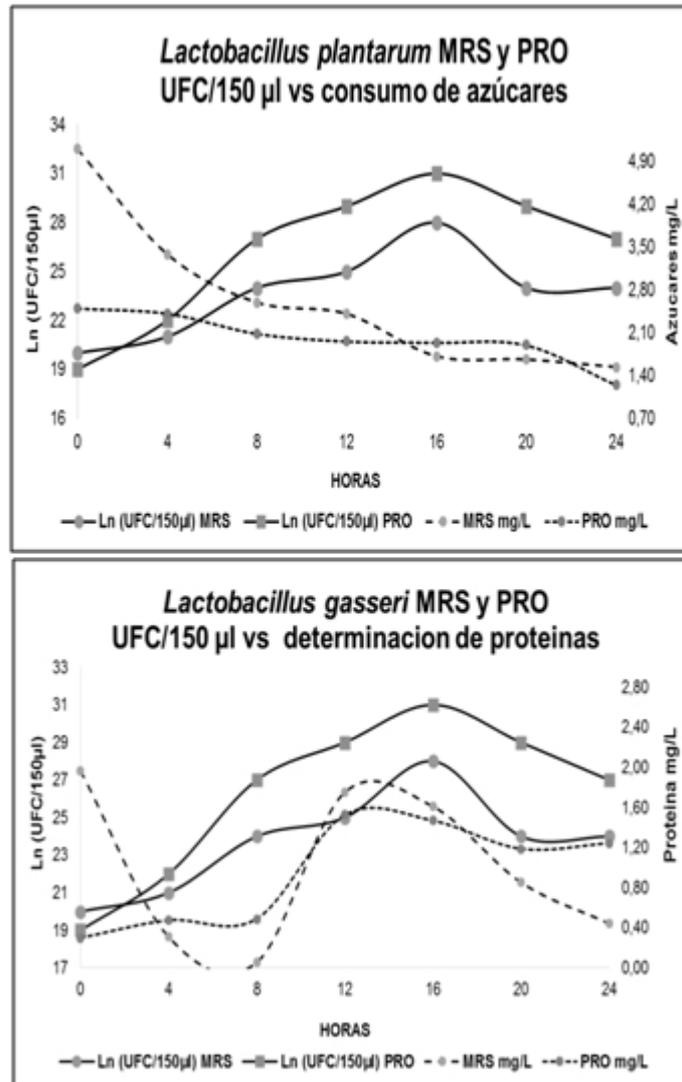


Figura 6. Consumo de azúcar, determinación de proteínas y crecimiento (UFC/150µl) de *Lactobacillus plantarum* en los medios MRS y PRO.

El sustrato energético ocupado por las BAL como fuente energética son los carbohidratos, y de su fermentación se obtiene ácido láctico; para tal razón, se utiliza el esquema de Embden Meyerhof Parnas (EMP), en donde se genera casi exclusivamente ácido láctico y la vía 6 fosfogluconato/fosfocetolasa, del que se obtienen etanol, ácido acético y dióxido de carbono como productos finales (Ramírez, 2011).

Como se puede observar en la [Figura 6](#), la tendencia de las curvas de proteína de las BAL estudiadas en los medios MRS y PRO, no es definida a diferencia del consumo de azúcares. Por lo anterior es posible inferir que el método de análisis es sensible tanto a la detección indirecta de la biomasa celular como al consumo de azúcares. Aunque las BAL no pueden sintetizar algunos aminoácidos, según la cepa considerada, sí pueden obtenerlos mediante la actividad proteolítica del medio en que se desarrollen (Olivera, 2011).

Tabla 5. Datos cinéticos del crecimiento bacteriano de *Lactobacillus plantarum*.

Parámetro	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
	MRS	PRO
Velocidad específica de crecimiento (μ h ⁻¹)	0,4922	0,7798
Fin fase logarítmica (horas)	16:00	16:00
Tiempo de duplicación celular (minutos)	84,50	53,33
% azúcares consumidos totales (g/L)	69,94	88,09
% proteína consumida total (g/L)	77,31	61,89
R ² fin fase logarítmica	0,9559	0,975

La velocidad de crecimiento específica obedece a la concentración de nutrientes, por tal razón, cuando la concentración es alta, la velocidad de crecimiento específica puede alcanzar valores máximos (Orozco & Solarte, 2003). Lo anterior concuerda con los resultados encontrados, ya que *L. plantarum* reportó una velocidad específica en el medio PRO de 0,7798, a diferencia del valor encontrado en el medio MRS de 0,4922. Esta diferencia puede atribuirse a las concentraciones nutricionales mayores del medio PRO ([Tabla 5](#)).

Determinación de ácido láctico e identificación de péptidos por HPLC-DAD en el sobrenadante de *Lactobacillus plantarum*. Se registró que la presencia de ácido láctico con valores de 6,50 y 6,80 g/L, por otra parte el análisis de péptidos detectó la presencia de 7 picos en el sobrenadante de *L. plantarum*, los cuales fueron comparados con un patrón estándar, el cual reportó una similitud en el pico 6, equivalente al tiempo 11,95. De la anterior, se puede inferir que posiblemente se trató de un péptido conformado por una cadena de aminoácidos VAL-TIR-VAL, con una concentración de 0,61mg/ml.

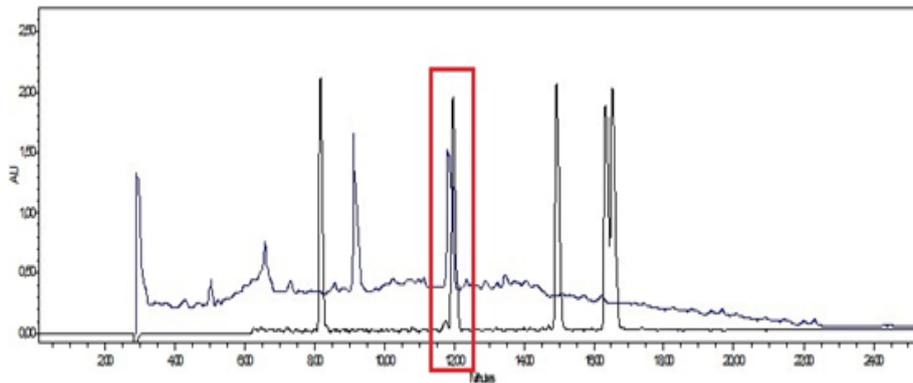


Figura 7. Cromatograma de *Lactobacillus plantarum*.

Conclusiones

Lactobacillus plantarum demostró ser una bacteria probiótica importante puesto que demostró una excelente viabilidad bajo condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal de forma *in vitro*, situación importante para la prevalencia en los animales de producción ya que permite que se pueda emplear en forma *in vivo* de forma segura. Por otro lado, fue muy efectiva la inhibición frente a *Yersinia pseudotuberculosis*, factor que demuestra importancia para la investigación mediante el uso alternativo de antibióticos.

Referencias bibliográficas

Agüero, N.; Albarracín, A.; Mier, A.E.; Aleu, G.; Zogbi, A.P.; Rosmini, M.R.; Frizzo, L.S.. Evaluación de la producción de ácido láctico y gas por cepas autóctonas y comerciales potencialmente iniciadoras y probióticas para productos cárnicos. En: **XV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas**, 2014. p. 1.

Ávila, J., et al. Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. **Revista Científica**, 2010, vol. 20, no 2, p. 161-169.

Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M; Sherris, J.C.; Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of clinical Pathology**, 1966, vol. 45, no 4, p. 493

Caballero, Y. **Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico en bovinos Holstein**. Tesis (Maestría en Ciencias). México: Colegio de Postgraduados, Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Campus Montecillo 2014. p. 15.

Cai, Y.; Benno, Y.; Nakase, T.; Oh, T.K.. Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine. **The Journal of general and applied microbiology**, 44(5), 311-316, 1998.

Carr, F. J.; Chill, D.; Maida, N. The lactic acid bacteria: a **literature survey**. **Critical reviews in microbiology**, 2002, vol. 28, no 4, p. 291

Crueger, W.; Crueger, A. **Biotecnología: Manual de microbiología industrial**. 1993.

Dalié, D.K.D.; Deschamps, A.M.; Richard-Forget, F. Lacticacid bacteria- Potential for control of mouldgrowth and mycotoxins: A review. En: **Food Control**. Abril, 2010, vol. 21, no. 4, 372 370 p.

Delgado, S. Microbiota intestinal humana: análisis y evolución de poblaciones representativas e identificación de bacterias probióticas. Memoria, para optar al grado de doctor. Oviedo: Instituto de Productos Lácteos de Asturias (**IPLA-CSIC**). 2005. p. 28, 29.

Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.;Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, 28(3), 350-356 1956.

Frizzo, L.S. Evaluación *in vitro* de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie para ser utilizados en la crianza de terneros.**FAVE Sección Ciencias Veterinarias**, 2006, vol. 5, no 1/2, p. 71

García, A.; González, D.; Fernández, A.; Requena, T.; Bartolomé, B.; MORENO, M.**Evaluación de las propiedades probióticas de bacterias lácticas de origen enológico**. 2014, p.31

Gueimonde, M.; Sánchez, B.; De los Reyes, C.G.; & Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. **Front Microbiol**, 4(202), 1-6

Jurado, H; Gúzman, M; Jarrín, V. 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*. **Rev Med Vet Zoot**, 2015.

León, M.F. **Evaluación *in vitro* de cepas de bacterias ácido lácticas nativas con potencial probiótico.** Tesis de grado (Licenciatura en Bioquímica). Montevideo-Argentina: Universidad de la República. Facultad de Ciencias, 2012. p. 25

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J biol Chem**, 193(1), 265-275, 1951.

Moreno, L.J. **Aislamiento y selección de *Lactobacillus sp* con potencial probiótico a partir de pan de abejas.** Posgrado Interfacultades de Microbiología. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. 2012. p. 26

Olivera, J. **Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche.** Tesis (Licenciatura en Bioquímica). Universidad de la República. Facultad de Agronomía, 2011. p.

Orozco, M.P.; Solarte, J.A. **Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa.** Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia-Sede Manizales. 2003. P. 10

Ossa, J.A., et al. Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. **Revista UDC A Actualidad & Divulgación Científica**, 2010, vol. 13, no 1, p. 97-104.

Pisano, M.B.; Viale, S.; Conti, S. ; Fadda, M.E. ; Deplano, M.; Melis, M.P.; Cosentino, S. Preliminary evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Sardinian dairy products. **BioMed research international**, 2014, vol. 2014. p. 2

Puupponen-Pimiä R.; Aura, A; Oksman-Caldentey, K; Myllärinen, P; Saarela, M; Mattila-Sandholm, T et al. Development of functional ingredients for gut health. **Food Sci Technol**, 2002; 13 (1): 3-11.

Ramírez, J.; Ulloa, P.; Velásquez, M.; Ulloa, J.; Romero, F. Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. **Revista Fuente Año 2**, No. 7, abril – junio, 2011.

Ramírez, F.A. **Aislamiento de bacterias *Lactobacillus sp* y levaduras a partir de productos lácteos artesanales y evaluación de la capacidad antagónica *in vitro*.** Tesis de grado (Microbiología Industrial). Colombia: Bogotá, Pontificia Universidad Javeriana, 2010. p. 25.

Sanz, Y.; Collado, M; Dalmau, J. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. **Acta pediátrica española**, v. 61, No 9. 2003. p.481

Slonczewski, J.L.; Fujisawa, M.; Dopson, M.; Krulwich, T.A. Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. En: **Advances in microbial physiology**, 2009, v. 55, p. 1-317.

TAGG, J.R.; MCGIVEN, A. R. **Assay system for bacteriocins. Applied microbiology**, 1971, vol. 21, no 5, p. 943.

Vallejo, M.; Marguet, E.R.; Etchechoury, V.E. Potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus* aisladas de quesos ovinos patagónicos. **Salus**, 2008, v. 9, no. 4.

Vargas, E.; Gómez, C; Parra, M.; Romero, M. Producción de microorganismos probióticos como aditivo para alimentos concentrados para ganado vacuno (primera parte). **Rev Ing Univ de Los Andes**, 2004; 20: 23-33

Zavaglia, A. et al. Isolation and characterization of Bifidobacterium strains for probiotic formulation. **Journal of Food Protection®**, 1998, v. 61, no 7, p. 865-873.

Cómo citar: Jurado-Gámez, H.; Martínez-Benavides, J.; Morillo-Garcés, J.A.; Romero-Benavides, D.A.; Orbes-Villacorte, A.E.; Mesías-Pantoja, L.N. Determinación de la cinética de fermentación en dos medios probióticos, pruebas de desempeño in vitro y efecto de inhibición de *Lactobacillus plantarum*. **Revista Veterinaria y Zootecnia**, v. 10, n. 1, p. 23-41, 2016. DOI: 10.17151/vetzo.2016.10.1.3

Esta obra está bajo una [Licencia de Creative Commons Reconocimiento CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

