

ARTÍCULO ORIGINAL

## Actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* spp. contra patógenos causantes de mastitis bovina

Lilian Sánchez Miranda, Joan Peña Rodríguez

Dirección de Salud Animal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: [lilian@censa.edu.cu](mailto:lilian@censa.edu.cu).

**RESUMEN:** El tratamiento de la mastitis bovina con el uso de antibióticos genera residuos en la leche, por lo que afecta la calidad de los subproductos lácteos destinados a la alimentación de la población. Las bacterias ácido lácticas se han propuesto como una alternativa para evitar el uso de antibióticos. Se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* por difusión sobre capas de agar y difusión en disco del sobrenadante de seis cepas de *Lactobacillus* spp. contra patógenos productores de mastitis bovina. Después de la neutralización con NaOH, de los tratamientos térmico (100°C y 121°C durante 5 min) y enzimático al sobrenadante libre de células, se comprobó que la actividad antagonista de tres cepas se mantuvo activa. Se cuantificaron las sustancias inhibitorias como el ácido láctico (1,08- 2,68 g.l<sup>-1</sup>) y el peróxido de hidrógeno (0,05 - 0,26 g.l<sup>-1</sup>). Los resultados mostraron que cuatro cepas tienen potencial inhibitorio ante cepas patógenas de *Staphylococcus* spp. productoras de mastitis; se destacó la cepa ML5 por tener mayores halos de inhibición (54-65 mm) ante patógenos de aislados clínicos como *Staphylococcus chromogenes* y *Staphylococcus hyicus*, por lo que es un candidato potencial para ser evaluado en la prevención de la mastitis bovina.

**Palabras clave:** antagonismo BAL, péptidos antimicrobianos, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus hyicus*.

---

### Antimicrobial activity of *Lactobacillus* spp. strains against pathogens causing bovine mastitis

**ABSTRACT:** Treatment of bovine mastitis with antibiotic generates residues in milk that affects the quality of dairy products for the population feeding. The lactic acid bacteria have been proposed as an alternative to avoid use of antibiotics. The *in vitro* antimicrobial activity of six strains of *Lactobacillus* spp. was evaluated against bovine mastitis pathogens by diffusion on agar layers and disk diffusion of the supernatant. After neutralization with NaOH and heat (100 and 121°C for 5 min) and enzymatic treatments, the antagonistic activity of the cell-free supernatants of the three strains studied remained active. The inhibitory substances lactic acid (1.08 - 2.68 g.l<sup>-1</sup>) and hydrogen peroxide (0.05 - 0.26 g.l<sup>-1</sup>) were quantified. Four strains showed inhibitory potential against pathogenic strains of *Staphylococcus* spp. causing mastitis. The strain ML5 stood out for having greater inhibition halos (54-65 mm) against clinical isolates of pathogens such as *Staphylococcus chromogenes* and *Staphylococcus hyicus*, and, thus, showed to be a potential candidate to be evaluated in the prevention of bovine mastitis.

**Key words:** antagonism BAL, antimicrobial peptides, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus hyicus*.

---

### INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es una enfermedad de gran importancia en la industria lechera; constituye la primera causa de pérdidas económicas en la producción de leche a nivel mundial (1). Por definición, la mastitis bovina es la

inflamación del tejido mamario de la vaca y la provoca, fundamentalmente, las bacterias patógenas de más de 100 especies (2). Sin embargo, la mayor prevalencia se concentra en pocas especies en dependencia de la región de estudio y se destacan, indistintamente, especies de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* (3).

La estrategia tradicional para el control de la enfermedad es la terapia con antibióticos; sin embargo, entre los principales inconvenientes se encuentra la preocupante emergencia de resistencia a antibióticos, los bajos niveles de cura para determinados patógenos (4) y la presencia de residuos de estas sustancias en leche y carne vacuna (5), por lo que se hace evidente la búsqueda de otras alternativas efectivas de tratamiento con sustancias diferentes a los antibióticos tradicionales.

Aunque no están disponibles comercialmente, existen alternativas de tratamiento de la mastitis, como es el empleo de quitosan y antimicrobianos peptídicos aislados de plantas, pero son solo eficientes en el tratamiento de mastitis por *Staphylococcus* (6). El antibiótico antimicrobiano peptídico sintetizado por *Lactococcus lactis subsp. lactis* DPC3147 pertenece al grupo de la bacteriocina ribosomal y se caracteriza por poseer actividad demostrada contra bacterias patógenas productoras de mastitis, sobre todo contra variedades resistentes a antibióticos (7, 8, 9). De este grupo, se ha reportado que solo la nisina y la lacticina se usan para el tratamiento de mastitis; pero algunas bacterias productoras de mastitis han creado la resistencia a estas bacteriocinas (7, 10, 11).

Las bacterias ácido lácticas probióticas (BAL) constituyen una opción favorable para el tratamiento de enfermedades infecciosas en humanos y en animales, donde se han comprobado los beneficios asociados a la instauración de dichas bacterias al tracto intestinal y a la mucosa vaginal (12, 13). También se destacan como un potencial para el control de la mastitis bovina, según resultados previos obtenidos *in vitro* (14, 15). Además de la producción de bacteriocinas, dichas bacterias probióticas poseen otras características deseables como son: capacidad de adherencia a tejidos, producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, ser seguras y no patogénicas, entre otras (16).

El objetivo del presente trabajo está dirigido a evaluar la actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* spp. y sus metabolitos contra patógenos productores de mastitis bovina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos y condiciones de cultivo

#### Cepas de *Lactobacillus*

Se seleccionaron seis cepas de *Lactobacillus* spp. de terneros neonatos, identificadas y caracterizadas por Sánchez *et al.* (17); estas presentaron las mejores características fenotípicas y propiedades probióticas *in vitro*.

Las cepas seleccionadas se cultivaron en caldo y agar Mann Rogosa Sharp (MRS, BioCen, Cuba) a 37°C durante 24-48 horas, y para el crecimiento en agar se emplearon jarras de anaerobiosis bajo una atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub>. Para la conservación de cada cepa a -20°C, se utilizó el medio conformado por leche descremada (10%), extracto de levadura (1%) y glucosa (1%), descrito por Sánchez *et al.* (17).

#### Cepas patógenas indicadoras

Se utilizaron las cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, además de las cepas aisladas de campo *Streptococcus agalactiae* 345, *Staphylococcus chromogenes* 18.1 y *Staphylococcus chromogenes* 16.1 y *Staphylococcus hyicus* 14.1. Todas pertenecen a la colección del CENLAC (Laboratorios de Ensayos para la Calidad de los Alimentos, CENSA, Cuba).

Todos los aislados de campo se obtuvieron de animales con mastitis subclínica severa y se identificaron a nivel de especie mediante el sistema API 20 Strep (BioMerieux, 69280 Marcy l'Etoile, Francia) para *S. agalactiae* y para el resto de las cepas, mediante espectrometría de masas a través del sistema MALDI-TOF (Bruker Daltonics, GmbH). Todas las cepas se conservaron a -20°C en Caldo Triptona Soya (BioCen, Cuba) con 30% de glicerol.

#### Determinación de la actividad antagonista microbiana *in vitro*

##### Ensayo antimicrobiano de los cultivos

Las seis cepas de lactobacilos seleccionados, previamente crecidos en caldo MRS durante 18-24 horas, se inocularon en el medio agar MRS (1,5%). Posteriormente, las placas se incubaron a 37°C por 48 horas. Después de la formación de colonias visibles, se vertieron sobre las mismas 10 ml de agar semisólido de BHI (0,7%, *Brain Heart Infusion*, Difco, EUA), que contenían 0,01 ml de la cepa patógena indicadora con una concentración de 10<sup>7</sup> - 10<sup>6</sup> UFC/ml y luego se incubaron a 37°C por 48 horas, según la técnica descrita por Fleming *et al.* (18). La actividad de antagonismo para el crecimiento microbiano de los patógenos evaluados se verificó por la formación de zonas transparentes alrededor de las colonias mayores de 1 mm (Halo de Inhibición (HI)).

##### Ensayos antimicrobianos de los sobrenadantes libres de células

Para conocer la naturaleza química o proteica de la inhibición, a las cepas de *Lactobacillus* que dieron positivas a la prueba de antagonismo microbiano ante los patógenos indicadores se cultivaron en caldo MRS

a 37°C hasta alcanzar la fase estacionaria (24-36 h). Luego del periodo de incubación, los medios se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min y los sobrenadantes se esterizaron por filtración. Los sobrenadantes libres de células se emplearon en el ensayo antimicrobiano mediante el método de difusión en placa (19). Se colocaron 5 µl de los sobrenadantes en las placas de agar BHI sembrados previamente con 50 µl de un cultivo de 18 horas (0,5 de la escala Mc Farland) de los patógenos indicadores y se incubaron a 37°C durante 24 horas en condiciones de aerobiosis; por último, se observaron las placas para medir los halos de inhibición mayores (HI) que 1 mm.

### Indicios de la naturaleza química del (los) compuesto(s) antagonico(s)

La inhibición por ácidos orgánicos y por compuestos proteicos se determinó según lo descrito por Vallejo *et al.* (20). Los sobrenadantes crudos se trataron con NaOH 0,5 N hasta alcanzar pH de 6,5; posteriormente, se sometieron a una temperatura de 100 y 121°C durante 5 min. Se tomó una alícuota de los sobrenadantes que mostraron actividad antagonica después de ser neutralizados y se le ajustó el pH a 7,5. Luego se trató con 2 mg/ml de Tripsina (Merck) (disuelta en tampón fosfato de sodio 0,01 M a pH 7,2), se incubó durante 2 horas a 37°C y posteriormente a 65°C por 30 minutos para determinar la inhibición por compuesto de naturaleza proteica. En todos los casos se determinó la actividad de antagonismo microbiano residual por el procedimiento previamente descrito (19).

### Ensayo cuantitativo para la producción de peróxido de hidrógeno

La producción de peróxido de hidrógeno se cuantificó por volumetría de óxido-reducción de acuerdo con Edema y Sanni (21). Los lactobacilos se cultivaron en 10 ml de caldo MRS por 18 h a temperatura de 37°C en tubos con tapas de roscas y alcanzaron una densidad óptica de 0,9 ( $10^9$  UFC.ml<sup>-1</sup>). Los cultivos se centrifugaron a 5500 x g por 25 min a 4°C. Posteriormente, a los sobrenadantes obtenidos se les adicionó 90 ml de agua destilada estéril, se homogenizaron y se tomaron 25 ml de las mezclas que se colocaron en frascos de 100 ml. Se le adicionaron 25 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10%) y la preparación se tituló con 0,1 M de KMnO<sub>4</sub>. El punto final de la titulación fue en el cual un color violeta suave aparece por 15 s antes de la decoloración. Como control positivo se utilizó una cepa de referencia de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Cada ml de KMnO<sub>4</sub> 0,1 M es equivalente a 1,701 mg de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (22). Los resultados se expresaron en g.l<sup>-1</sup>.

### Ensayo cuantitativo para la producción de ácidos orgánicos (ácido láctico)

La cantidad de ácidos orgánicos producida por los lactobacilos (principal: ácido láctico) se determinó por la titulación ácido-base, de acuerdo con Edema y Sanni (21). Una alícuota de 1 ml de los sobrenadantes de los cultivos (incubado conforme al párrafo anterior) se diluyó en 9 ml de agua destilada estéril y se homogeneizaron. Posteriormente, esa mezcla (10 ml) se tituló con NaOH 1M y se utilizó como indicador la fenolftaleína. Las cantidades de ácidos orgánicos equivalentes están dadas por el consumo de NaOH 1M en ml. Cada ml de NaOH 1M equivale a 90,08 mg de ácido láctico. La cepa de referencia *L. acidophilus* ATCC 4356 se utilizó como control y los resultados se expresaron en g.l<sup>-1</sup>.

### Análisis estadístico

Se empleó el diseño completamente aleatorizado. Para el tratamiento estadístico de los datos se realizaron análisis de varianza; las medias se constataron mediante la prueba de comparación múltiple de Duncan (23), además de un análisis de conglomerados del efecto antagonista de cada cepa. Se empleó el Programa estadístico INFOSTAT versión 1.1 (2002).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se observan los resultados de los halos de inhibición de las seis cepas de *Lactobacillus* spp. evaluadas ante patógenos indicadores productores de mastitis bovina, lo que demuestra que estas cepas producen, *in vitro*, metabolitos con efectos inhibitorios. Se destaca la cepa M5 con mayor halo de inhibición (Fig. 1). Se observan que cuatro cepas de *Lactobacillus* spp. son las de mayor actividad (M5, M7, M8 y M10), aunque en M10 no se encontró respuesta ante un aislado.

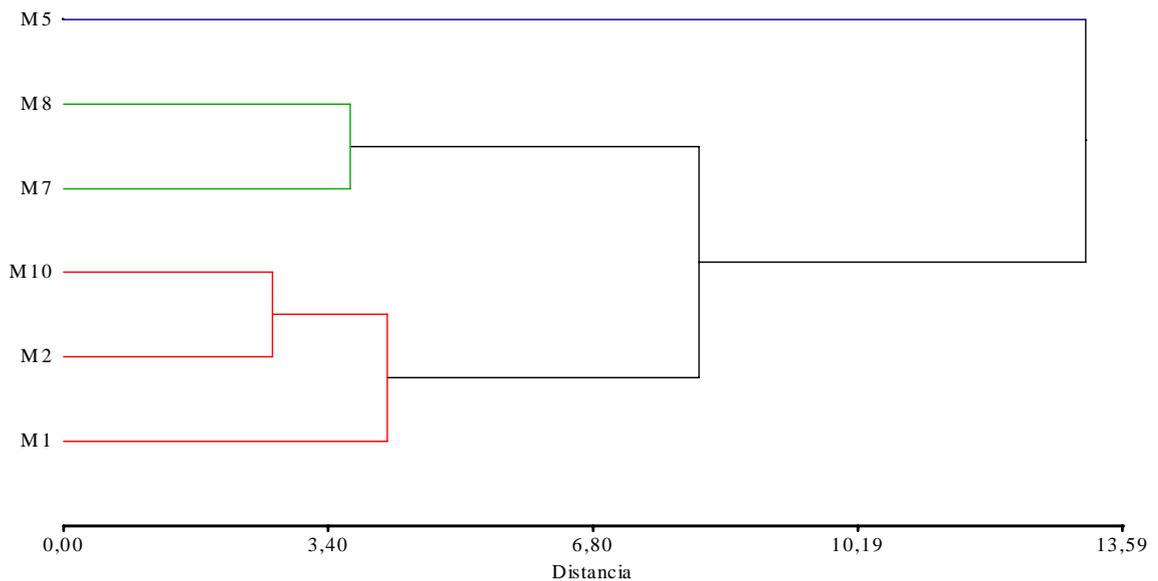
Resulta relevante que en el 72% de los casos el resultado fue superior a lo reportado por Geetha *et al.* (15), donde se determinó que la actividad inhibitoria de péptidos antimicrobianos purificados, frente a patógenos de la mastitis bovina, producía halos entre 11,66 y 12,66 mm. Hay que destacar que para las cepas M5 y M7 el valor de inhibición siempre estuvo por encima de dicha referencia.

Según los resultados existen hubo variaciones en la actividad antimicrobiana a varios niveles, entre las diferentes especies y entre cepas de la misma especie, lo que resalta la importancia de involucrar a varios aislados del mismo grupo taxonómico, así como de

**TABLA 1.** Actividad antagonista de cepas de *Lactobacillus* spp. frente a cepas indicadoras patógenas y aislados clínicos productores de mastitis bovina (Medias de los HI en mm, n=3)./ *Antagonistic activity of strains of Lactobacillus* spp. on pathogenic indicator strains and clinical isolates causing bovine mastitis.

Cepa Indicadora	Cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. (HI en mm)					
	M 1	M 2	M5	M7	M8	M10
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	10,3±0,02 <sup>c</sup>	25,14±0,02 <sup>b</sup>	31±0,03 <sup>a</sup>	24,5±0,06 <sup>b</sup>	23,05±0,01 <sup>b</sup>	21,12±0,02 <sup>b</sup>
<i>S. aureus</i> ATCC® 25923	10,5±0,02 <sup>d</sup>	18,00±0,03 <sup>c</sup>	37,6±0,06 <sup>a</sup>	18,3±0,02 <sup>c</sup>	11,4±0,01 <sup>d</sup>	23,00±0,02 <sup>b</sup>
<i>S. agalactiae</i> 345	19,43±0,025 <sup>c</sup>	15,36±0,01 <sup>d</sup>	30,8±0,015 <sup>a</sup>	16,75±0,03 <sup>d</sup>	22,4±0,003 <sup>b</sup>	14,5±0,05 <sup>d</sup>
<i>S. chromogenes</i> 18.1	6,5 ±0,02 <sup>e</sup>	1,5±0,02 <sup>f</sup>	65,5±0,02 <sup>a</sup>	42,5±0,01 <sup>b</sup>	33,5±0,02 <sup>c</sup>	20,5±0,01 <sup>d</sup>
<i>S. chromogenes</i> 16.1	4,2 ±0,05 <sup>e</sup>	9,2±0,04 <sup>d</sup>	50,5±0,02 <sup>a</sup>	28,5±0,01 <sup>b</sup>	27,5±0,05 <sup>b</sup>	16,5±0,01 <sup>c</sup>
<i>S. hyicus</i> 14.1	No hay HI	No hay HI	54,5±0,05 <sup>a</sup>	32,5±0,02 <sup>b</sup>	22,5±0,01 <sup>c</sup>	No halos

Medias con letras diferentes en la misma fila son significativamente diferentes (p< 0,05)



**FIGURA 1.** Análisis de Conglomerados del efecto de cada cepa de *Lactobacillus* spp. (M1, M2, M5, M8, M7 y M10) frente a las cepas indicadoras y aislados de patógenos de mastitis bovina. La distancia horizontal grafica la actividad antagonista del crecimiento general de cada BAL./ *Cluster analysis of the effect of each of the Lactobacillus* spp. strain (M1, M2, M5, M8, M7 y M10) on the indicator strains and pathogenic isolates causing bovine mastitis. The horizontal distance graphs the antagonistic activity of the general growth of each LAB.

cepas de campo además de las indicadoras, limitante que tienen algunos estudios de evaluación de antimicrobianos alternativos frente a patógenos de la mastitis, donde solo se reportan resultados usando algunas cepas de referencia, fundamentalmente de *S. aureus* y/o *S. agalactiae* (15, 24).

En estudios recientes se reporta que *Staphylococcus* Coagulasa Negativo (SCN) es la causa más común de infecciones intramamarias y las especies que lo constituyen se describen como patógenos emergentes de la mastitis bovina (25, 26, 27). De ahí la importancia de evaluar las especies de *S. chromogenes* y *S. hyicus*. Esta última especie resultó la menos susceptible a la acción de las cepas probióticas estudiadas; no obstante, frente a M5, M7 y M8 hubo inhibición del crecimiento.

Los resultados de los sobrenadantes tratados, procedentes de las cepas seleccionadas contra los patógenos productores de mastitis, se pudo observar en la Tabla 2. Se demuestra la naturaleza de la inhibición relacionada, principalmente, con la presencia de ácidos orgánicos, en este caso ácido láctico (Tabla 3), generados por el metabolismo del género *Lactobacillus*, perteneciente al grupo de las bacterias ácido láctico, pues la mitad de los sobrenadantes neutralizados con NaOH perdieron la actividad antagónica, excepto los correspondientes a las cepas M5, M7 y M8.

Por otra parte, el efecto antimicrobiano no se afectó cuando los sobrenadantes de las cepas M5, M7 y M8 se sometieron, luego de la neutralización, a una temperatura de 100°C o 121°C durante 5 minutos, lo

**TABLA 2.** Efecto antagónico de sobrenadantes de *Lactobacillus* spp. con diferentes tratamientos contra patógenos productores de mastitis bovina, n= 2./ *Antagonistic effect of Lactobacillus* spp. supernatants with different treatments on pathogens causing bovine mastitis, n=2.

Cepas antagónicas	<i>S. chromogenes</i> (A.C. 18.1) (HI en mm)				<i>S. chromogenes</i> (A.C 16.1) (HI en mm)				<i>S. aureus</i> (ATCC 6538) (HI en mm)				<i>Streptococcus agalactiae</i> (A.C 345) (HI en mm)			
	SST	SN	ST	SC	SST	SN	ST	SC	SST	SN	ST	SC	SST	SN	ST	SC
M1	7,2	0	0	0	16,3	0	0	0	14,5	0	0	0	0	0	0	0
M2	10,5	0	0	0	9,35	0	0	0	8,35	0	0	0	16,45	0	0	0
M5	27	27	15	25	30,5	26	9	28	33,5	28,5	10	28	34,2	30	0	29,3
M7	18,3	19,01	0	18,04	14	13,3	0	13,3	14	13,3	0	13,3	15	14,3	0	14,3
M8	22	21,4	3,4	19,5	14	13,3	0	13,3	11,5	10,3	0	13,3	20,5	20,0	18	18,3
M10	14,6	0	0	0	14	0	0	0	15,3	14,3	0	13,3	18	0	0	0

SST: Sobrenadante sin tratamiento; SN: Sobrenadante neutralizado; ST: Sobrenadante tratado con 2 mg/ml de Tripsina; SC: sobrenadante tratado con calor.

**TABLA 3.** Producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH y ácido láctico por las cepas *Lactobacillus* spp./ *Productions of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH and lactic acid by Lactobacillus* spp. strains.

Cepas de <i>Lactobacillus</i> spp.	pH	Ácido láctico (g.l <sup>-1</sup> )	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (g.l <sup>-1</sup> )
M 1	3,5 ± 0,18 <sup>b</sup>	1,09 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,07 ± 0,00 <sup>c</sup>
M 2	4,5 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>c</sup>
M 5	3,11 ± 0,11 <sup>b</sup>	2,38 ± 0,04 <sup>a</sup>	0, 26± 0,02 <sup>b</sup>
M 7	4,00 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,08 ± 0,04 <sup>b</sup>	0, 20 ± 0,02 <sup>b</sup>
M 8	4,05 ± 0,18 <sup>a</sup>	2,50 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,02 <sup>b</sup>
M10	4,14 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,51 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>c</sup>
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	3,77 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,51± 0,04 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,11 <sup>a</sup>

Los valores presentados corresponden a las media ± error estándar de tres experimentos independientes. Medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes (p<0,05 por One-way ANOVA, test de Duncan). Control positivo: *L. acidophilus* ATCC 4356.

que demostró la estabilidad del principio activo, al calor, en las condiciones impuestas. En las mismas cepas se puede observar también que el efecto antimicrobiano disminuyó drásticamente luego del tratamiento con tripsina (Tabla 2).

Por las razones anteriores se demuestra que la causa de inhibición del crecimiento, en estas cepas, es de naturaleza proteica; probablemente por bacteriocinas y péptidos de bajo peso molecular que ejercen su actividad antimicrobiana por diferentes mecanismos que incluyen desestabilización de membrana, lisis celular, degradación de macromoléculas como ácidos nucleicos e inhibición de procesos biológicos como síntesis de proteínas, ADN, ARN y peptidoglucano y/o peróxido de hidrógeno, que es una molécula con gran capacidad antagonista y que puede ejercer su acción sobre una gran variedad de microorganismos (28). Estos péptidos antimicrobianos también pueden ejercer efecto inmunomodulador en el hospedero (14), aspecto que no se ha estudiado lo suficiente en el contexto de la glándula mamaria, según la bibliografía disponible y que pudiera tener relevancia si se evalúan *Lactobacillus* como producto para el control de la mastitis bovina.

Al cuantificar algunas de las sustancias inhibitorias, producidas por las cepas BAL (Tabla 3), se pudo constatar que las cepas M5 y M8 tienen las mayores cantidades de peróxido de hidrógeno, de ahí los resultados superiores encontrados en la actividad antagonista frente a las cepas productoras de mastitis. Sin embargo, según estos datos de ácido láctico y  $H_2O_2$ , ambas cepas tendrían similar actividad antagonista, lo cual no se cumple por la mayor producción de sustancias antimicrobianas de origen proteico de M5 al analizar los sobrenadantes tratados.

Hay que destacar que las cantidades de  $H_2O_2$  producidas por las cepas del presente trabajo son semejantes a las encontradas en otros estudios que analizaron propiedades probióticas de lactobacilos (13, 29). La producción del peróxido de hidrógeno por lactobacilos representa uno de los mecanismos más importantes contra la colonización por microorganismos patogénicos y oportunistas (13). Hasta aquí, los datos aportados señalan que el conjunto de componentes encontrado en el sobrenadante de las cepas de *Lactobacillus* en estudio contribuye con la actividad antimicrobiana.

Las cepas ensayadas que poseen capacidad antagonista deben seguir estudiándose, particularmente, *Lactobacillus* spp. M5 y M8 por su marcada acción inhibitoria contra los patógenos productores de mastitis bovina, dado el conjunto de productos que libera al

medio. Los presentes resultados, aunque promisorios, se obtienen *in vitro*, por lo que se impone a seguir hacia los experimentos *in vivo*, donde el efecto antimicrobiano se puede ver obstaculizado por otros factores, como son la solubilidad en la leche, la estabilidad en glándula mamaria, la estabilidad en la formulación del tratamiento, la inactivación por otras sustancias, entre otras (4, 24, 30). Un producto natural de este tipo para el tratamiento de la mastitis bovina sería un gran aporte a los esfuerzos que se realizan para disminuir el uso de antibióticos tradicionales en el manejo de los rebaños lecheros (31).

Se puede concluir que la actividad antagonista de las cepas de *Lactobacillus* spp. evaluadas es variable frente a los patógenos de mastitis bovina de elección, aunque se encontró la cepa M5 con un marcado potencial para el control de la enfermedad, donde los péptidos antimicrobianos son de los principios activos más notorios.

## REFERENCIAS

1. Huijps K, Lam TJ, Hogeveen H. Costs of mastitis: facts and perception. *J Dairy Res.* 2008;75(1):113-120.
2. Keane OM, Budd KE, Flynn J, McCoy F. Pathogen profile of clinical mastitis in Irish milk-recording herds reveals a complex aetiology. *Vet Rec.* 2013;173(1):17. doi: 10.1136/vr.101308. Epub 2013 May 21.
3. Fernández G, Barreal ML, Pombo MB, Ginzo-Villamayor MJ, González-Manteiga W, Prieto A, et al. Comparison of the epidemiological behavior of mastitis pathogens by applying time-series analysis in results of milk samples submitted for microbiological examination. *Vet Res Commun.* 2013 Dec;37(4):259-67. doi: 10.1007/s11259-013-9570-1. Epub 2013 Jun 19.
4. Gruet P, Maincent P, Berthelot X, Kaltsatos V. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;50(3):245-259.
5. Ruegg P, Oliveira L, Jin W, Okwumabua O. Phenotypic antimicrobial susceptibility and occurrence of selected resistance genes in gram-positive mastitis pathogens isolated from Wisconsin dairy cows. *J Dairy Sci.* 2015;98(7):4521-4534. doi: 10.3168/jds.2014-9137.

6. Ochoa-Zarzosa A, Loeza-Angeles H, Sagrero-Cisneros E, Villagómez-Gómez E, Lara-Zárate L, López-Meza JE. Antibacterial activity of thionin Thi2. 1 from *Arabidopsis thaliana* expressed by bovine endothelial cells against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 2008;127(3):425-430.
7. Ryan MP, Meaney WJ, Ross RP, Hill C. Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(6):2287-2290.
8. Twomey D, Wheelock A, Flynn J, Meaney W, Hill C, Ross R. Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lacticin 3147. *J Dairy Sci.* 2000;83(9):1981-1988.
9. dos Santos Nascimento J, Fagundes PC, de Paiva Brito MA, dos Santos KR, do Carmo de Freire Bastos M. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 2005;106(1-2):61-71.
10. Papagianni M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol Adv.* 2003;21(6):465-499.
11. Wirawan RE, Klesse NA, Jack RW, Tagg JR. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Appl Environ Microb.* 2006;72(2):1148-1156.
12. Jimenez E, Fernandez L, Maldonado A, Martin R, Olivares M, Xaus J, et al. Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Appl Environ Microb.* 2008;74(15):4650-4655.
13. Abramov V, Khlebnikov V, Kosarev I, Bairamova G, Vasilenko R, Suzina N, et al. Probiotic Properties of *Lactobacillus crispatus* 2,029: Homeostatic Interaction with Cervicovaginal Epithelial Cells and Antagonistic Activity to Genitourinary Pathogens. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2014;6(3-4):165-176.
14. Gulbe G, Valdovska A, Saulite V, Jermolajevs J. *In Vitro* Assessment for Antimicrobial Activity of *Lactobacillus helveticus* and its Natural Glycopeptides against Mastitis Causing Pathogens in Dairy Cattle. *Open Biotechnology Journal.* 2015;9(Suppl 1M6):61-66. DOI: 10.2174/1874070701509010061.
15. Geetha R, Sathian C, Prasad V, Gleeja V. Efficacy of purified antimicrobial peptides from lactic acid bacteria against bovine mastitis pathogens. *Asian Journal of Dairy and Food Research.* 2015;34(4):259-264.
16. Soleimani NA, Kermanshahi RK, Yakhchali B, Sattari TN. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Afr J Microbiol Res.* 2010;4(20):2169-2173.
17. Sánchez L, Tromps J. Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Rev. Salud Anim.* 2014;36(2):124-129.
18. Fleming H, Etchells J, Costilow R. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Appl Microbiol.* 1975;30(6):1040-1042.
19. Tomasinsig L, De Conti G, Skerlavaj B, Piccinini R, Mazzilli M, D'Este F, et al. Broad-spectrum activity against bacterial mastitis pathogens and activation of mammary epithelial cells support a protective role of neutrophil cathelicidins in bovine mastitis. *Infect Immun.* 2010;78(4):1781-1788.
20. Vallejo M, Etchehoury V, Horiszny C, Marguet E. Inhibición de *Escherichia coli* O157: H7 por cepas *Lactobacillus* aisladas de queso ovino. *Analecta Veterinaria.* 2009;29(1):15-19.
21. Edema MO, Sanni AI. Functional properties of selected starter cultures for sour maize bread. *Food Microbiol.* 2008;25:616-625.
22. Sanni AI, Fapounda EM, Onilude AA. Characteristic properties of lactic acid bacteria isolated from the rumen of Maradi goats. *Chem Microbiol Technol Lebensm.* 1995;17:99-104.

23. Duncan DB. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*. 1955;11(1):1-42.
24. Wanjiru Maina J. Isolation, Identification and Screening of *Bacillus* species from *Rastrineobola argentea* (Omena) for Production of Bacteriocins active against Bovine Mastitis Pathogens (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*): Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology; 2015.
25. Ruiz AK, González D, Peña J. Situation of bovine mastitis in Cuba. *REDVET*. 2012;13(12).
26. Pyorala S, Taponen S. Coagulase-negative staphylococci-Emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol*. 2009;134(1-2):3-8.
27. Hosseinzadeh S, Saei HD. Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the North West of Iran: emerging of coagulase-negative staphylococci. *Int J Vet Sci Med*. 2014;2(1):27-34.
28. López-Meza JE, Aguilar AO-ZJA, Loeza-Lara PD. Antimicrobial peptides: diversity and perspectives for their biomedical application: INTECH Open Access Publisher; 2011.
29. Gil NF, Martinez RC, Gomes BC, Nomizo A, De Martinis EC. Vaginal lactobacilli as potential probiotics against *Candida spp*. *Braz J Microbiol*. 2010;41(1):6-14.
30. Were LM, Bruce BD, Davidson PM, Weiss J. Size, stability, and entrapment efficiency of phospholipid nanocapsules containing polypeptide antimicrobials. *J Agr Food Chem*. 2003;51(27):8073-8079.
31. Breen J. The responsible use of antimicrobial therapy in the control of bovine mastitis in dairy herds. *Livestock*. 2014;19(2):83-90.

Recibido: 2-2-2016.

Aceptado: 5-8-2016.