

Cepas de *Lactobacillus plantarum* con potencialidades probióticas aisladas de cerdos criollos

Lactobacillus plantarum strains with probiotic potentials isolated from creole pigs



<http://opn.to/a/j3EDB>

Ronald Vera-Mejía^{1*}, José Ormaza-Donoso¹, Jesús Muñoz-Cedeño¹, Fátima Arteaga-Chávez¹, Lilian Sánchez-Miranda^{2**}

¹Carrera de Medicina Veterinaria, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Manuel Félix López, Ecuador.

²Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Apartado 10, CP 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: El objetivo del presente trabajo fue caracterizar, mediante pruebas *in vitro*, dos cepas de *Lactobacillus plantarum* (22 LMC y 41 LMC) aisladas de la mucosa del ciego de cerdos criollos. Se evaluó la actividad probiótica de las cepas mediante pruebas de estabilidad de crecimiento a diferentes temperaturas (30, 37 y 45°C) y pH (3,4; 4; 5,4; 6,7; 7,5), así como la capacidad de acidificación del medio de cultivo, la tolerancia a jugo gástrico artificial y a las sales biliares. Se realizaron pruebas de adherencia como autoagregación e hidrofobicidad y antagonismo microbiano ante cuatro patógenos. Las cepas crecieron en todas las condiciones evaluadas y mostraron potencialidades probióticas por su resistencia al tratamiento con sales biliares hasta las 24 horas; con jugo gástrico artificial se observó crecimiento microbiano desde 4,20 - 5,17 log UFC/ml a los 90 minutos; resultaron ser autoagregantes e hidrofóbicas, e inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. La cepa *L. plantarum* 22 LMC presentó los mejores resultados como probióticos. Se cuantificaron las sustancias inhibitorias producidas por *L. plantarum*, como el ácido láctico (1,05 - 2,68 g.L⁻¹) y el peróxido de hidrógeno (0,20 - 0,28 g. l⁻¹). Se evaluó el perfil de susceptibilidad a 14 antimicrobianos y se evidenció resistencia a cuatro de ellos.

Palabras clave: probiótico, *Lactobacillus plantarum*, cerdos.

ABSTRACT: The objective of the present work was to characterize, by means of *in vitro* tests, two strains of *Lactobacillus plantarum* (22 CML and 41 CML), isolated from the caecum mucosa of Creole pigs. Their probiotic activity was evaluated by the growth stability tests at different temperatures (30, 37 and 45°C) and pH (3.4; 4; 5.4; 6.7; 7.5.), as well as the acidification capacity of the culture medium, tolerance to artificial gastric juice and bile salts. Adherence tests, such as autoaggregation, hydrophobicity and microbial antagonism, were performed in four pathogenic strains. The strains grew in all the conditions evaluated, showing probiotic potentialities for their resistance to the treatment with bile salts until 24 hours. Microbial growth was observed from 4.20 -5.17 log CFU/ml at 90 minutes with artificial gastric juice. They were self-aggregating and hydrophobic, and inhibited the growth of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. The strain *L. plantarum* 22 LMC presented the best results as probiotics. The inhibitory substances produced by *L. plantarum* were quantified as lactic acid (1, 05-2, 8 gL⁻¹) and hydrogen peroxide (0, 20- 0, 28 gl⁻¹). The susceptibility profile to 14 antimicrobials was evaluated, and most of the strains revealed resistance to four of them.

Key words: probiotic, *Lactobacillus plantarum*, pigs.

*Autor para correspondencia: Ronald Vera-Mejía. E-mail: ronaldvm29@hotmail.com

**Autor para correspondencia: Lilian Sánchez Miranda. E-mail: lilian@censa.edu.cu

Recibido: 06/02/2018

Aceptado: 05/05/2018

INTRODUCCIÓN

La productividad animal está ligada a la existencia o no de microorganismos patógenos en su tracto digestivo. El uso de promotores de crecimiento de tipo antibiótico ayuda a controlar el crecimiento de los mismos, además de mantener un equilibrio deseable en la microbiota intestinal. La prohibición o restricción del uso de muchos de estos aditivos ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas, entre las que se encuentran los probióticos (1).

Un probiótico se define como microorganismos vivos que, al ser ingeridos en las cantidades adecuadas, confiere un beneficio al huésped (2). Entre los beneficios se destacan la estimulación de la inmunidad y la optimización del balance nutricional y microbiano en el tracto gastrointestinal (3).

Dentro de los géneros que se incluyen como posibles probióticos se pueden enumerar *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* y algunas levaduras como *Saccharomyces*. El género *Lactobacillus* se reporta como uno de los géneros típicos del ecosistema gastrointestinal de los cerdos (1). A pesar de que estas bacterias se consideran seguras, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda que sean sometidas a pruebas, para que su aplicación no tenga efectos secundarios de forma negativa sobre la salud del huésped (4).

Entre las propiedades más importantes que deben cumplir las cepas candidatas a probióticas están: la capacidad de atravesar la barrera digestiva para que se puedan multiplicar y colonizar el intestino, y poseer actividad antimicrobiana, ya que esta característica hace que cuando se administran en cantidad adecuada, adquieran un potencial para generar una barrera frente a los patógenos (3).

La adhesión a células epiteliales se considera como un factor importante para lograr la colonización y prerrequisito esencial para ejercer una actividad probiótica; sin embargo, Ferreira (5) reporta que un rápido crecimiento del microorganismo puede lograr el mismo resultado. Otro requisito indispensable en el desarrollo de un probiótico es que la cepa candidata debe ser estable durante el proceso de producción y

distribución, para que llegue viva a su destino y cumpla su función.

Las condiciones gastrointestinales de los animales domésticos son un reto para las bacterias que necesiten colonizarlo; los cambios en el pH, los niveles de temperatura y la secreción de bilis y sales biliares son barreras para un crecimiento adecuado de los microorganismos en el sistema digestivo, de ahí que las evaluaciones *in vitro* permitirán tener un primer acercamiento al potencial de la cepa como agente probiótico que pueda dar paso a una investigación a nivel de campo (6,7).

El objetivo del presente trabajo fue realizar la caracterización mediante pruebas *in vitro* de dos cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas de la mucosa del ciego de cerdos criollos, para su uso posterior como probióticas en la producción porcina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo

Cepas de *Lactobacillus plantarum*

Se utilizaron dos cepas de lactobacilos: *Lactobacillus plantarum* (22 LMC) y *Lactobacillus plantarum* (41 LMC), aisladas de la mucosa del ciego de cerdos de 30 días de edad, conservadas en el cepario del Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Ecuador.

Se cultivaron en caldo o agar Mann Rogosa Sharp (MRS, Difco™ EUA) a 37°C durante 24-48 horas, sin agitación; para el crecimiento en agar se empleó una incubadora con una atmósfera de 5 % de CO₂. Como medio de conservación a corto plazo se utilizaron medio agar y caldo MRS a 4-8°C con pases mensualmente. Para la conservación a largo plazo, se utilizó caldo MRS con 30 % de glicerol a -20°C.

Cepas patógenas indicadoras

Como microorganismos patógenos indicadores se utilizaron *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Salmonella* sp. (ATCC 6539) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), obtenidos de la colección de cultivos del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Cuba. Los aislados se conservaron a -20°C en caldo BHI (Brain Heart Infusion Difco ®, EUA).

Crecimiento en condiciones hostiles. Condiciones de crecimiento

A diferentes pH: las cepas aisladas se cultivaron en caldo MRS, al cual se le ajustó el pH inicial a pH 3,4; 4; 5,4; 6,7; 7,5. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 24-48 horas.

A diferentes temperaturas: las cepas se cultivaron en caldo MRS y se incubaron a 15, 30, 37 y 45°C durante 24-48 horas.

El crecimiento de las cepas se determinó por medición de la absorbancia (D.O.) en un espectrofotómetro (T90+ UV/ VI; PG Instruments, Ltd) a una longitud de onda (λ) de 560 nm. Para determinar la viabilidad de las cepas evaluadas a pH ácido de 3,4 se realizó el conteo celular mediante la técnica de diluciones seriadas en agua peptonada; posteriormente, se sembraron en placas con agar MRS y se incubaron bajo condiciones anaeróbicas a 37°C por 48 horas.

Capacidad de acidificación del medio: las cepas se cultivaron en tubos cerrados con caldo MRS durante 24 horas a 37°C bajo condiciones estáticas; se tomaron muestras para medir el pH de los cultivos.

Funcionalidad de las cepas de *L. plantarum*

Para la ejecución de los ensayos de resistencia al jugo gástrico artificial y a sales biliares, las cepas de *L. plantarum* crecieron en caldo MRS por 24 horas. Después del crecimiento, se centrifugaron a 750 x g por 15 minutos, a 4°C (Beckman GS -6R). El sobrenadante se descartó y el concentrado de células se resuspendió en caldo MRS.

El concentrado celular se ajustó a una D.O. de $0,9 \pm 0,2U$, mediante medición a 560 nm (D.O. _{λ 560nm}) en espectrofotómetro. El concentrado de cada cultivo se utilizó para realizar el ensayo de resistencia a jugo gástrico y a sales biliares, según lo descrito por Techima (8).

Ensayo de resistencia a jugo gástrico artificial

El 5 % del concentrado celular de la cepa seleccionada se inoculó en 10 mL de jugo gástrico artificial (2 g/L NaCl, pepsina 3,2 g/L (Merck KGaA, Alemania), pH 2,5), de acuerdo con lo reportado por Neumann (9). Posteriormente, se incubaron a 37°C y el conteo de células viables se efectuó a 0, 60 y 90 min. La

tolerancia se estimó al comparar los conteos de células viables en MRS con y sin jugo gástrico artificial.

El porcentaje de sobrevivencia se calculó según lo descrito por Kociubinski *et al.* (10) donde:

$$R = (\log \text{ UFC/mL CJG}) / (\log \text{ UFC/mL SJG}) \times 100$$

a los 90 minutos de tratamiento. Los resultados se basaron en el cálculo de las medias de tres experimentos independientes. Las cepas se clasificaron como resistentes por encima del 67 % (R), tolerantes entre 34,0 - 66,9 % (T) y sensibles por debajo de 33,9 % (S).

Ensayo de resistencia a sales biliares

Se inoculó el 5 % del concentrado celular ajustado en caldo MRS con y sin 0,3 % de sales biliares (Bacto-Oxgall, Difco®, EUA). Todas las variantes se incubaron a 37°C y se midió el crecimiento celular (D.O. _{λ 560nm}) mediante un espectrofotómetro, a intervalos de dos horas, hasta las 24 horas de incubación (11). Una bacteria se considera resistente a las sales biliares cuando presenta D.O. _{λ 560 nm} $\geq 0,3$ después de 3h de incubación en presencia de 0,3 % de sales biliares. Se determinó el porcentaje de sobrevivencia según lo descrito por Kociubinski *et al.* (10) donde: $R = (\log \text{ UFC/ml CSB } 0,3\%) / (\log \text{ UFC/ml MRS}) \times 100$, a las tres horas de tratamiento.

Las cepas se clasificaron como resistentes por encima del 68 % (R), tolerantes entre 34,0 - 66,9 % (T) y sensibles por debajo de 33,9 % (S).

Determinación de antagonismo de *Lactobacillus plantarum* ante microorganismos patógenos por la técnica de mota en césped

La actividad antagonista de dos cepas *Lactobacillus plantarum* se evaluó mediante el ensayo de difusión en doble capa de agar, como se describe por Teixeira *et al.* (12).

Cada cepa se cultivó en caldo MRS durante 18 horas para obtener 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC/mL). A partir de estos cultivos, se colocó una cantidad de 5 μ L en placas que contenían agar MRS. Después de la incubación, durante 24 horas en condiciones anaerobias, las bacterias crecidas se inactivaron por exposición a vapor de cloroformo durante 30 minutos;

después, el cloroformo residual se dejó evaporar durante un periodo de igual tiempo.

La revelación de la presencia de sustancia antagonista se realizó recubriendo la placa con una capa superpuesta de 3,5 mL del medio BHI agar semisólido (0,7 %) con 100 µL de la bacteria indicadora activada previamente (10^8 - 10^9 UFC/mL), respectivamente.

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), que se midieron con un pie de rey digital (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Japón). A cada valor se le restó el diámetro de los cultivos de las bacterias productoras.

Determinación de hidrofobicidad

Se determinó la hidrofobicidad superficial de las dos cepas de *L. plantarum* mediante la medición de la afinidad por el disolvente orgánico de las células cultivadas en sistema de dos fases agua-disolvente orgánico, como medida predictiva de su capacidad de adhesión a epitelios, para determinar, a través de porcentajes de hidrofobicidad, la tendencia a la adhesión epitelial (mayor porcentaje de hidrofobicidad, mayor adherencia). Cada una de estas cepas crecidas como cultivo fresco en caldo MRS a 37°C se lavaron con solución tampón de fosfato salino (PBS) y se ajustaron a una densidad óptica de 0,6-0,7 a 560 nm ($D.O._{\lambda 560nm}$) y se mezclaron con la misma cantidad de xileno, a temperatura ambiente. Después de un tiempo de separación de 60 min, se midió la absorbancia mediante la lectura de $D.O._{\lambda 560nm}$ de la fase acuosa.

El porcentaje de hidrofobicidad se calculó utilizando la [ecuación](#) descrita por Gutiérrez *et al.* (1).

La actividad de hidrofobicidad de las cepas evaluadas se clasificó como alta (51-100 %), media (30-50 %) y baja (0-29 %), según lo propuesto por Nader-Macías (13).

Ensayos de autoagregación

Los ensayos de autoagregación se realizaron según lo descrito por Kos *et al.* (14). Las dos cepas de *L. plantarum* se cultivaron en medio

MRS durante 18 horas a 37 ° C en condiciones anaeróbicas; se centrifugaron a 5500 x g durante 15 min, se lavaron dos veces y se resuspendieron en PBS hasta una concentración final de 10^9 UFC/mL. Las suspensiones bacterianas (4 mL) se agitaron durante 10 segundos y se determinó la autoagregación después de cinco horas de incubación a temperatura ambiente. Para ello, se transfirieron 0,1 mL de la fase superior de la suspensión a un nuevo tubo que contenía 3,9 mL de PBS y se midió la densidad óptica a 600 nm ($D.O._{600nm}$) a los tiempos 0 ($D.O. 0$) y después de 5 h ($D.O. 5$) (Multiskan Spectrum Thermo Científico). El porcentaje de autoagregación se calculó mediante la ecuación:

$$1 - (D.O.5 / D.O.0) * 100$$

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 lo reportado por Santos *et al.* (15). Los lactobacilos se cultivaron en 10 mL de caldo MRS por 18 horas a temperatura de 37°C en tubos con tapas de roscas y alcanzaron una densidad óptica de 0,9 (10^9 UFC.mL⁻¹). Los cultivos se centrifugaron a 750 xg 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 ácido sulfúrico (H₂SO₄, 10 %) y la preparación se tituló con KMnO₄ 0,1 M. El punto final de la titulación fue el punto en el cual un color violeta suave aparece por 15 segundos antes de la decoloración. Como control positivo se utilizó una cepa de referencia de *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356). Cada mL de KMnO₄ 0,1 M es equivalente a 1,701 mg de H₂O₂ (16). Los resultados se expresaron en g.L⁻¹

Ensayo cuantitativo para la producción ácido láctico

La producción de ácidos orgánicos por los lactobacilos (principal: ácido láctico) se determinó por la titulación ácido-base, según Santos *et al.* (15). Una alícuota de 1 mL de los sobrenadantes de los cultivos incubados se diluyó

$$\% \text{ de Hidrofobicidad} = \frac{D.O._{\lambda 560} \text{ antes de mezclar} - D.O._{\lambda 560} \text{ después de mezclar} \times 100}{D.O._{\lambda 560} \text{ antes de mezclar}}$$

en 9 mL de agua destilada estéril y se homogeneizaron. Posteriormente, la mezcla 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⁻¹.

Susceptibilidad a agentes antimicrobianos

Se utilizó el método modificado de difusión en disco impregnado (Sensidisc DME®, Sao Paulo, Brasil). Los antimicrobianos utilizados fueron: ceftriaxona (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), meropenem (10 µg), oxacilina (1 µg), penicilina G (10 µg), sulfonamidas (300 µg), vancomicina (30 µg), amicacina (30 µg), amoxicilina (10 µg), ampicilina (10 µg), cefalexina (30 µg), cefalotina (30 µg).

Una alícuota de 0,1- 0,2 mL de cada cepa, correspondiente a una concentración celular de 10⁸-10⁹ UFC/mL, se distribuyó en placas de Petri que contenían agar MRS para *Lactobacillus plantarum*. Las cepas evaluadas se clasificaron para cada uno de los antibióticos como sensibles (S), moderadamente sensibles (MS) y resistentes (R), de acuerdo con Charteris *et al.* (17).

Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Para el análisis de los resultados se empleó el Software estadístico INFOSTAT versión 1 (2017). Para el tratamiento estadístico de los datos se realizaron análisis de varianza según diseño completamente aleatorizado; para verificar diferencias se utilizó la prueba de comparación de Duncan (18).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la [Tabla 1](#) se muestra el crecimiento de las dos cepas de *Lactobacillus plantarum* a diferentes pH a las 48 horas de incubación. Los mejores resultados se observaron desde pH 5 hasta pH 7,5; los mejores resultados bajo estas condiciones se obtuvieron con la cepa *L. plantarum* 22 LMC; además, a pH ácido de 3,4 mostró una viabilidad de 1,3 x10⁸ UFC/mL, por lo que en las condiciones extremas evaluadas reveló su resistencia. Jurado y Jarrin (7) reportaron que dos cepas de *L. plantarum*, aisladas del intestino grueso de cerdos adultos, fueron resistentes en estas condiciones y obtuvieron viabilidades de 1,1 x 10¹¹ UFC/mL a las tres horas de tratamiento.

En la [Tabla 2](#) se muestra que las cepas de *L. plantarum* crecieron a diferentes temperaturas hasta las 48 horas de incubación; mostraron mayor crecimiento de células viables a temperaturas de 37 y 45°C (1,3 y 4,5 x 10¹⁰UFC/mL, respectivamente) destacándose la cepa 22 LMC. Estos resultados son similares a los obtenidos por Sánchez *et al.* (19), quienes observaron crecimiento bacteriano de los 17 aislados bacterianos de lactobacilos procedentes del intestino de terneros y mostraron los mayores recuentos de células viables a temperaturas de 37°C. Por otra parte, los estudios de Pérez *et al.* (20) demostraron que dos cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas de líquido ruminal vacuno presentaron crecimiento en un rango amplio de temperaturas, que van desde los 18°C hasta los 40°C; estos resultados le permitieron clasificar a las cepas evaluadas como mesófilas, lo que concuerdan con los resultados del presente trabajo.

Al realizar el tratamiento con jugo gástrico artificial a las dos cepas evaluadas de *L. plantarum* hasta los 90 minutos, se pudo observar

TABLA 1. Crecimiento de cepas de *Lactobacillus plantarum* aislados de cerdos a diferentes pH hasta las 48 horas de incubación a 37 ° C. n=3. / *Growth of Lactobacillus plantarum strains isolated from pigs at different pH until 48 hours.*

Cepas <i>L. plantarum</i>	Crecimiento bacteriano (D.O. _{560nm})					
	pH 3,4	pH 4	pH 5	pH 6,7	pH 7,5	E.E±
22LMC	2,03 ^d	2,3 ^d	3,5 ^{bc}	4,80 ^a	4,45 ^a	0,13
41LMC	1,28 ^d	1,50 ^d	2,15 ^c	2,73 ^c	2,3 ^c	0,13

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

TABLA 2. Crecimiento de cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas de cerdos a diferentes temperaturas hasta las 48 horas de incubación. n=3. / *Growth of Lactobacillus plantarum strains isolated from pigs at different temperatures until 48 hours. n=3.*

Cepa <i>L. plantarum</i>	Crecimiento bacteriano (DO _{560nm})				
	T 15 °C	30 °C	37 °C	45 °C	E.E±
22LMC	0,28	2,40 ^c	4,75 ^a	4,70 ^a	0,03
41LMC	0,25	2,48 ^c	2,59 ^b	3,00 ^b	0,03

DO: densidad óptica; letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) que fueron capaces de sobrevivir en la medida que transcurrió el tiempo (Fig. 1). Se evidenció una disminución de la viabilidad de las cepas en estas condiciones evaluadas que van desde 4,20 - 5,17 log UFC/mL, lo que se debió a las circunstancias drásticas a que fueron sometidas. Asimismo, en la Tabla 3 se pudo constatar que las cepas son resistentes a estas condiciones de jugo gástrico artificial, ya que fueron capaces de traspasar la primera barrera fisiológica del tracto digestivo que corresponde a valores bajos de pH y a la acción de enzimas proteolíticas, en este caso la pepsina.

Song *et al.* (21) describen que algunas cepas tienen numerosas proteínas de choque-ácido que promueven la sobrevivencia; estas son capaces de sobrevivir a ambientes ácidos extremos. Estos

resultados concuerdan con otros estudios que demuestran que las cepas de *Lactobacillus* permanecen viables cuando se exponen a valores de pH de 2,5-4,0, pero exhiben pérdida de viabilidad a valores de pH más bajos (19).

En la Fig. 2 y Tabla 3 se muestran los resultados del tratamiento con concentración de sales biliare de 0,3 % de Ovgall en las cepas de *L. plantarum* a las tres horas. Fueron resistentes a esta concentración evaluada, por lo que se demuestra que las cepas en estudio pudieran también desconjugar a las sales biliare, ya que son capaces de producir la enzima conocida como sal biliar hidrolasa (SBH), que cataliza la hidrólisis de las sales biliare conjugadas en ácidos biliare, glicina y taurina (22).

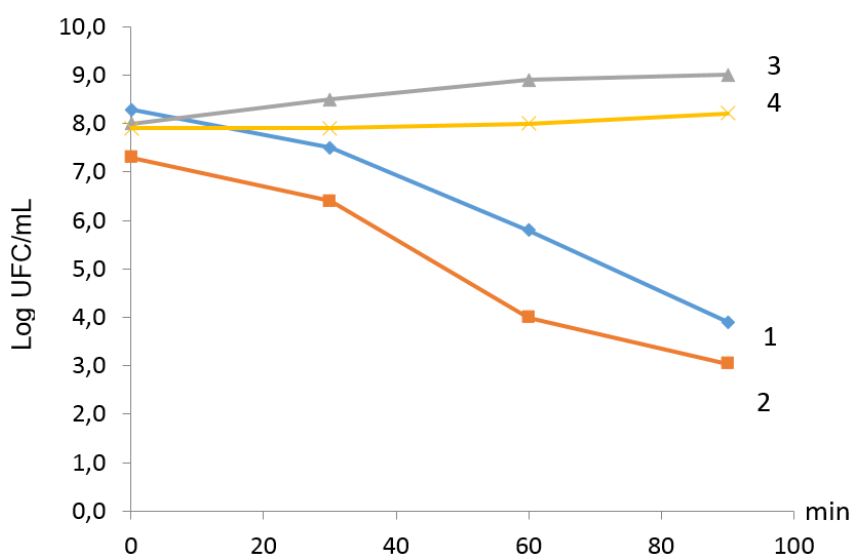
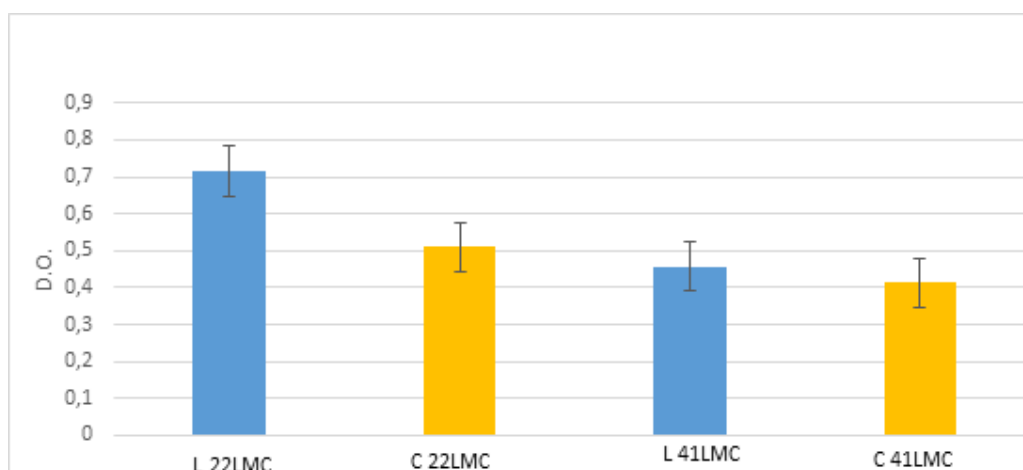


FIGURA 1. Sobrevivencias al jugo gástrico artificial pH 2 (Log UFC/mL) de las cepas de *Lactobacillus plantarum* hasta los 90 minutos de tratamiento. 1- *L. plantarum* 22 LMC con jugo gástrico artificial; 2- *L. plantarum* 41 LMC con jugo gástrico artificial; 3- *L. plantarum* 22 LMC sin jugo gástrico artificial; 4- *L. plantarum* 41 LMC sin jugo gástrico artificial. Los datos representan las medias de dos replicas independientes. / *Survival of Lactobacillus plantarum strains in the presence of artificial gastric juice at pH 2 (log CFU/mL) after 90 minutes of exposure to treatment. 1- L. plantarum 22 LMC with artificial gastric juice; 2- L. plantarum 41 LMC with artificial gastric juice; 3- L. plantarum 22 LMC without artificial gastric juice; 4- L. plantarum 41 LMC without artificial gastric juice. The data represent the means of two independent replicas.*

TABLA 3. Porcentajes de resistencia de cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas del TGI de cerdos al destete en jugo gástrico artificial y sales biliares al 0,3 %. n=3./ *Resistance percentages of Lactobacillus plantarum strains isolated from the TGI of pigs at weaning in artificial gastric juice and bile salts at 0.3%. n = 3*

<i>Lactobacillus plantarum</i>	Resistencia (%)	
	Jugo gástrico	Sales biliares
22 LMC	76,8±0,05 (R)	90,6±1,3 (R)
41LMC	64,8±0,03(T)	63,2± 1,50 (T)

R- resistente T- tolerante



Cada columna representa las medias y las barras el error estándar.

FIGURA 2. Resistencia a sales biliares de las cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas de cerdos. L-Crecimiento en presencia de Ovgall al 0,3 %; C- Control crecimiento *L. plantarum* sin sales biliares./ *Resistance to bile salts of Lactobacillus plantarum strains isolated from pigs. L-Growth in the presence of Ovgall 0,3 %; C- Growth control L. plantarum without bile salts.*

Las sales biliares actúan como detergentes y desestabilizan los lípidos presentes en la membrana citoplasmática. Esta situación trae como consecuencia la formación de poros que perturban la integridad y la fisiología de las células, lo cual puede provocar la muerte. Es probable que en las primeras horas algunas células se afecten mientras se induce la síntesis de la enzima SBH, la que posteriormente actuará en la hidrólisis de las sales biliares conjugadas (SBC) (22). Con la disminución de la concentración de las SBC en el medio, las células comienzan a multiplicarse, por lo que se observó un crecimiento a las 6 y 24 h ($1,5-2,3 \times 10^9$ y $6,4-8,0 \times 10^{11}$ UFC/mL, respectivamente)

Según Brizuela (23), esta capacidad de crecer en presencia de altas concentraciones de bilis a las que se pueden encontrar en el intestino (0,15 %), es un parámetro importante para los microorganismos que componen los preparados administrados por vía oral a animales. Esto les permite pasar a través del tracto gastrointestinal sin sufrir alteraciones en su comportamiento

fisiológico. Un factor que puede favorecer la sobrevivencia de estos microorganismos *in vivo* en el duodeno es la presencia de alimentos, ya que las bacterias pueden no estar expuestas a las sales biliares y de esta forma se podría evitar la toxicidad sobre las membranas.

Cuando se realizó la prueba de inhibición *in vitro* ante los cuatro patógenos indicadores, se demostró la acción antimicrobiana de las cepas de *Lactobacillus plantarum* evaluadas (Tabla 4; Fig. 3) con diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellas, destacándose la cepa 22LMC con los mejores resultados. Para la aplicación en los animales de las BAL, la actividad antagonista es un criterio fundamental para la selección de nuevas cepas, ya que reducen la frecuencia de las infecciones intestinales y de las mucosas (21,24).

Es importante destacar la actividad antagonista de las cepas evaluadas ante *Escherichia coli* y *Salmonella* sp., agentes infecciosos que afectan a los cerdos postdestete.

En este sentido, se reporta por varios autores (25,26) el diagnóstico de estos agentes, donde los

TABLA 4. Resultados de la actividad antagonista de dos cepas de *Lactobacillus plantarum* frente a cepas indicadoras patógenas (Medias de los HI en mm, n=3)./ *Results of the antagonistic activity of Lactobacillus plantarum strains against the pathogenic indicator strains (Means of HI in mm, n = 3).*

Cepas indicadoras	Cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> (HI en mm)	
	22 LMC	41 LMC
<i>Escherichia coli</i>	32,0 ±0,15 ^a	25,09 ±0,15 ^b
<i>Staphylococcus aureus</i>	31,3 ±0,03 ^a	20,3 ± 0,15 ^b
<i>Salmonella sp.</i>	32,5 ±0,04 ^a	15,70 ± 0,56 ^b
<i>Listeria monocytogenes</i>	28,09±0,15 ^a	12,85 ± 0,56 ^b

HI: halos de inhibición; letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$ por filas

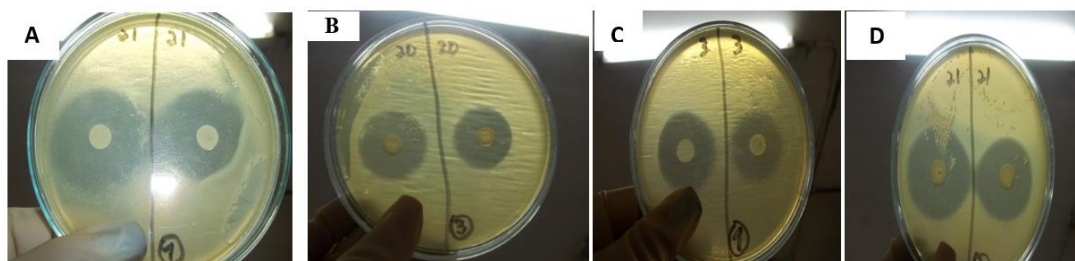


FIGURA 3. Prueba de antagonismo microbiano de la cepa *Lactobacillus plantarum* 22 LMC frente a diferentes patógenos (halos de inhibición): A-*Escherichia coli*; B-*Staphylococcus aureus*; C-*Salmonella sp.*; D-*Listeria monocytogenes*./ *Microbial antagonistic test of Lactobacillus plantarum strains against different pathogens (inhibition halos): A- Escherichia coli; B- Staphylococcus aureus; C- Salmonella sp.; D-Listeria monocytogenes.*

signos clínicos, las necropsias y los resultados de laboratorio sugieren que *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) coloniza el intestino de muchos lechones justo después del destete, lo que ocasiona las típicas alteraciones celulares y la diarrea acuosa y amarilla. Sin embargo, los cambios en la fisiología digestiva del lechón hacen que, en esta fase, puedan actuar tanto aquellos agentes que afectan principalmente al intestino delgado como otros que ejercen su acción patógena, principalmente sobre el intestino grueso (26). Esto incluye la edad del lechón, las circunstancias de aparición de la enfermedad y manifestaciones como son el material fecal alrededor del perineo, la diarrea, la deshidratación y la muerte. Las estrategias para disminuir estas causas son numerosas y dentro de ellas se describen la administración de cultivos bacterianos como probiótico de *Lactobacillus*, para inhibir la adhesión de ETEC, por lo que es una alternativa importante al uso de antibióticos (27).

Al cuantificar algunas de las sustancias inhibitorias producidas por las cepas evaluadas de *L. plantarum* (Tabla 5), se pudo constatar que las dos cepas produjeron peróxido de hidrógeno y ácido láctico; sin embargo, se destacó la cepa 22

LMC con mayor cantidad de este último. 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 (15). La producción del peróxido de hidrógeno por lactobacilos representa uno de los mecanismos más importantes contra la colonización por microorganismos patógenos y oportunistas (28).

En cuanto a la producción de ácido láctico por la cepa 22LMC de *L. plantarum*, coinciden con los halos de inhibición encontrados ante diferentes patógenos evaluados en el presente trabajo. Esta característica incide en la reducción del pH intestinal, lo cual se considera el principal factor en la inhibición del desarrollo de enteropatógenos como *Salmonella sp.* y *Escherichia coli*. Además, la acidificación del lumen intestinal acelera las reacciones bioquímicas de la digestión.

Se describe que los efectos perjudiciales de esta molécula en los microorganismos sensibles se resumen en alteración de la permeabilidad celular, alteración del potencial de membrana, así como descenso del pH intracelular que ocasiona la alteración de funciones celulares importantes

TABLA 5. Determinación de H₂O₂ y ácido láctico por las cepas de *Lactobacillus plantarum*. / *Determination of H₂O₂ and lactic acid by Lactobacillus plantarum strains.*

Cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i>	pH	Ácido láctico (g.L ⁻¹)	H ₂ O ₂ (g.L ⁻¹)
22 LMC	3,51 ± 0,11 ^a	2,68 ± 0,04 ^a	0,28 ± 0,02 ^a
41 LMC	4,70 ± 0,10 ^b	1,05 ± 0,04 ^b	0,20 ± 0,02 ^a
<i>L. acidophilus</i> (ATCC 4356)	3,77 ± 0,01 ^a	2,50 ± 0,04 ^a	0,67 ± 0,11 ^a

Los valores presentados corresponden a la 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, prueba de Duncan). Control positivo: *L. acidophilus* ATCC 4356.

TABLA 6. Resultados a la prueba de adherencia microbiana a hidrocarburo (ensayo de hidrofobicidad) y autoagregación de las cepas de *Lactobacillus plantarum*. n=3. / *Results of the microbial adherence test to hydrocarbon (hydrophobicity test) and autoaggregation of Lactobacillus plantarum strains. n=3.*

Cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i>	Hidrofobicidad (%)	Autoagregación (%)
22L MC	61,405 ± 1,3 ^a	85,5 ± 0,07 ^b
41LMC	51,85 ± 0,55 ^b	81,7 ± 0,02 ^b

Los valores presentados corresponden a la 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, prueba de Duncan)

(19). Por otra parte, las BAL se caracterizan por la producción de ácido láctico a niveles elevados. Varios autores refieren que las BAL son los microorganismos que más se utilizan como probióticos y dentro de este grupo las bacterias homofermentativas, donde hay un predominio de la producción de ácido láctico. Este ácido es altamente palatable e incide directamente en la eliminación de bacterias indeseables a nivel del tracto gastrointestinal.

La capacidad de adhesión a las células epiteliales del intestino constituye un criterio importante a tener en cuenta para la selección de cepas con potencial probiótico. Esta actividad de adhesión a componentes de la mucosa gastrointestinal es considerada como una propiedad fundamental para la colonización y para manifestar los efectos beneficiosos sobre la salud que proveen los probióticos en su interacción con el huésped, de ahí que la autoagregación de cepas probióticas parece jugar un papel fundamental en la adhesión al epitelio intestinal (29).

En la Tabla 6 se observan los ensayos de adhesión a xileno solvente no polares y la autoagregación de las cepas evaluadas; también se muestra una fuerte propiedad *in vitro* dado por los valores encontrados. Algunas características físico-químicas de la superficie celular, como la

hidrofobicidad, también pueden afectar a la capacidad de adhesión bacteriana. Durante la caracterización de cepas de *Lactobacillus plantarum* se muestra un fenotipo de autoagregación. De esta manera, se revela la capacidad para formar agregados visibles tras la agitación vigorosa del cultivo. Así, en este trabajo se observó la correlación entre ciertas propiedades físico-químicas de la superficie celular y la capacidad de adhesión de cepas de *Lactobacillus plantarum*.

El perfil de sensibilidad a antibióticos, de cada una de las cepas seleccionadas, mostró variabilidad en su comportamiento (Tabla 7). Las cepas de *L. plantarum* mostraron resistencia ante los antimicrobianos como amoxicilina, eritromicina, oxacilina, penicilina y sulfonamida. En este sentido, resultados obtenidos por Laurencio *et al.* (30) manifestaron que las cepas de *Lactobacillus*, aisladas de la vagina de vacas lecheras, fueron resistentes a cuatro antibióticos: amikacina, acitromicina, vancomicina y neomicina.

Estas resistencias se han atribuido como un aspecto intrínseco y no transmisible a otras bacterias (20). Sin embargo, no todas las resistencias a los antibióticos en los lactobacilos son intrínsecas; algunos pueden ser codificados por plásmidos, por lo tanto, su resistencia a los

Tabla 7. Perfil de sensibilidad a antimicrobianos de las cepas de *Lactobacillus plantarum*. / *Antimicrobial sensitivity profile of Lactobacillus plantarum strains.*

AGENTE ANTIMICROBIANO	Cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> (Diámetro de los Halos, mm)	
	22 LMC	41 LMC
Amikacina	S 22	S 21
Amoxicilina	R 0	MS 10
Ampicilina	MS 10	MS 12
Cefalotina	S 22	S 24
Ceftriaxone	S 23	MS 10
Ciprofloxacina	S 32	S 30
Cloranfenicol	S 17	S 23
Eritromicina	S 23	R 0
Gentamicina	S 16	MS 15
Oxacina	R 0	R 0
Mepropem	S 30	S 30
Penicilina	R 0	R 0
Sulfonamida	S 25	R 0
Vancomicina	MS 15	R 22

S-sensible; MS-medianamente sensible; R-resistente

antibióticos debe ser cuidadosamente evaluada antes de su uso como probiótico comercial.

Los resultados de las pruebas *in vitro* realizadas demostraron que las cepas evaluadas poseen características fisicoquímicas y biológicas compatibles con un potencial uso como probiótico: resistencia a pH ácido, sales biliares, buenas propiedades hidrofóbicas, autoagregantes, relación con su capacidad de adhesión al epitelio y actividad antimicrobiana como inhibición del crecimiento de cuatro patógenos. No obstante, para corroborar tales hallazgos hay que continuar los estudios *in vivo* de estas cepas, en este caso, su aplicación en cerdos al destete.

REFERENCIAS

- Gutiérrez R, Montoya LA, Vélez ZO. Probióticos: una alternativa de producción limpia y de reemplazo a los antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal. *Producción + Limpia* 2013;8(1):135-146.
- WHO/FAO Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. World Health Organization, London Ontario Canada. 2002; 8. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.
- Narváez-Solarte J, Díaz-López WE. Probióticos en cerdos: resultados contradictorios. *Biosalud*. 2015;14(1):81-90.
- Maron D, Smith T, Nachman K. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Globalization and Health*. 2013;9:1-11.
- Ferreira CLF. Grupos de bacterias lácticas Caracterización y aplicación tecnológicas de bacterias probióticas. En Ferreira CLF, editor. *Prebiótico y probiótico: actualización y prospección*. Viçosa: Minas Gerais; 2003;7-34.
- Sánchez L, Tromps J. Caracterización *in vitro* de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Rev Salud Anim*. 2014; 36(2):124-129.
- Jurado GH, Jarrín JV. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus lactis* y determinación del efecto probiótico en cepas patógenas. *Biosalud*. 2015;14(2):49-62.
- Teshima E. Seleção de bactérias bífidas isoladas de lactentes e modulação da microbiota intestinal por meio de probióticos, prebióticos e simbióticos, [Tese Doutorado]. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2001;113.

9. Neumann E. Comportamento *in vitro* de estirpes de *Lactobacillus acidophilus* sensível e resistente à bacteriocina sob condições do trato digestivo. 1991. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 1991.
10. Kociubinski G, Perez P, De Antoni G. Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J Food Prot.* 1999;62:905-912.
11. Gilliland SE, Staley TE, Bush LJ. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. *J Dairy Sci.* 2004;67:3045-3051.
12. Teixeira GS, Carvalho FP, Arantes RM, Nunes AC, Moreira JL, Mendonça M, Almeida RB, Farias LM, Carvalho MA, et al. Characteristics of *Lactobacillus* and *Gardnerella vaginalis* from women with or without bacterial vaginosis and their relationships in gnotobiotic mice. *J Med Microbiol.* 2012;61:1074-1081.
13. Nader-Macias MEF. Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. *J Ind Microbiol Biot.* 2008;35(11):1387-1395.
14. Kos B, Suskovic J, Vukovic S, Simpraga M, Frece J, Matosic S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol.* 2003;94(6):981-987.
15. Santos CMA, Pires MCV, Sánchez L, Martins F, Nicoli J. Selection of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for vaginitis treatment. *Microbiol.* 2016; 162:1195-1207.
16. 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.
17. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Prot.* 1998;61(12):1636-16437.
18. Duncan B. Multiple ranges and multiple F. Test *Biometrics.* 1955;11:1.
19. Sánchez L, Omura M, Lucas A, Pérez T, Llanes M, Ferreira CL. Cepas de *Lactobacillus* spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. *Rev Salud Anim.* 2015;37(2):94-104.
20. Pérez J, Rocha E, Uzcategui D, Aranguren Y, Machado E. Aislamiento Selección y Caracterización de cepas del género *Lactobacillus* aisladas de líquido ruminal vacuno en la zona sur del Lago Venezuela *Rev Colombiana Cienc Anim.* 2015;7(2):165-170.
21. Song M, Yun B, Moon JH, Park DJ, Lim K & Oh S. Characterization of selected *Lactobacillus* strains for use as probiotics. *Korean J Food Sci An.* 2015;35(4):551.
22. Mojgani N, Hussaini F, Vaseji N. Characterization of Indigenous *Lactobacillus* strains for probiotic properties. *Jundishapur J Microbiol.* 2015;8(2):17523.
23. Brizuela MA. Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos. Tesis Dr. C. Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba. 2003. p. 102.
24. Collins JW, La Region RM, Woodward MJ, Searle LEJ. Application of Prebiotics and Probiotics in Livestock. In: Charalampopoulos D and Rastall RA (eds) *Prebiotic and probiótico Science and technology* Springer New York. 2009;pp.1123-1192.
25. Gutiérrez C, López C, Parra G. Lesiones en órganos de cerdos post destete, inducidas por el lipopolisacárido de *E. coli*. Córdoba-Montería, CO. *Revista MVZ Córdoba.* 2013;18(12).
26. Suárez, Belloch J, and Latorre MA. Nutrición y salud intestinal de los lechones al destete. *IVIS SUIS.* 2014;105:14-19.
27. Hou C, Zeng X, Yang F, Liu H, Hou SQ. Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a review. *J Anim Sci Biotechnol.* 2015; 6(1):14.
28. 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 and Antimicrobial Proteins. 2014; 6(3-4):165-176.
29. Rodrigues NF, Kästle J, Coutinho TJ, Amorim AT, Campos GB, Santos VM, et al. Qualitative analysis of the vaginal microbiota of healthy cattle and cattle with genital-tract disease. Genet Mol Res. 2015;14(2):6518-6528.
30. Laurencio M, Arteaga F, Rondón AJ, Ormaza J, Pinto J, Pazmiño D et al. Potencial probiótico in vitro de cepas de *Lactobacillus* spp. procedentes de la vagina de vacas lecheras. Rev Pastos y Forrajes. 2017; 40(3):206-215.

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

La mención de marcas comerciales de equipos, instrumentos o materiales específicos obedece a propósitos de identificación, no existiendo ningún compromiso promocional con relación a los mismos, ni por los autores ni por el editor.