

## EVALUACIÓN IN VITRO DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE SUERO COSTEÑO

### IN VITRO EVALUATION OF PROBIOTIC POTENTIAL OF LACTIC BACTERIA ACID ISOLATED FROM COASTAL SERUM

María C. Cueto-Vigil<sup>1, 2</sup>, Yudtanduly Acuña-Monsalve<sup>1, 3</sup>, Jacqueline Valenzuela-Riaño<sup>1, 4</sup>

#### Resumen

Un grupo de 53 bacterias ácido lácticas (**BAL**) aisladas del suero costeño, fueron sometidas a estudios preliminares in vitro simulando las condiciones del tracto digestivo, para determinar sus características como potenciales probióticos: se evaluó la tolerancia a pH ácido (MRS pH: 2,0) y sales biliares (MRS con sales biliares al 0,3%) y posteriormente se determinó la población sobreviviente como log UFC/ml. A las cepas tolerantes a las condiciones mencionadas, se les determinó la resistencia a 14 antibióticos de uso comercial, se evaluó la adhesión a mucus intestinal y la producción de ácido láctico por cromatografía líquida de alta precisión (**HPLC**). Se encontró que 54,7% de las BAL evaluadas son tolerantes a las condiciones de pH ácido y 49,1 a 0,3% de sales biliares con una población de  $10^6$  log UFC/ml en promedio. Siete cepas fueron seleccionadas por presentar sensibilidad a vancomicina antibiótico de importancia epidemiológica y se adhirieron a mucus intestinal, reuniendo las condiciones requeridas para considerarse como potencialmente probióticas. Adicionalmente la cuantificación de ácido láctico para las cepas seleccionadas presentó un rango entre  $0,13 \pm 0,05$  y  $1,0 \pm 0,08$  g/l.

*Palabras clave:* ácido láctico, bacterias ácido lácticas, probiótico, resistencia a pH, sales biliares, suero costeño

#### Abstract

A group of 53 lactic acid bacteria (**LAB**) isolated from coastal serum were evaluated with preliminary in vitro studies simulating the conditions of the digestive tract, to determine their characteristics as potential probiotics; acid pH tolerance (MRS pH: 2.0) and bile salts (MRS with 0.3% bile salts) and subsequently the surviving population was determined as log CFU/ml. Strains tolerant to such conditions were evaluated for resistance to 14 antibiotics of commercial use; we assessed adherence to intestinal mucus and the production of lactic acid by high performance liquid chromatography (**HPLC**). It was shown that 54.7% of the LAB evaluated were tolerant to acid pH conditions and 49.1 to 0.3% bile salts with a population of  $10^6$  log CFU/ml on average. Seven strains were selected by antibiotic vancomycin tenderness of epidemiological importance and adhered to intestinal mucus, meeting the requirements to be considered as potentially probiotic. Additionally, the quantification of lactic acid in the selected strains showed a range between  $0.13$  and  $1.0 \pm 0.05 \pm 0.08$  g/l.

*Key words:* acid pH and bile salt resistance, coastal serum, lactic acid, lactic acid bacteria, probiotic

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (**BAL**) se caracterizan por fermentar carbohidratos y producir

ácido láctico como principal producto metabólico. Muchas de ellas poseen propiedades probióticas y están presentes en la alimentación del hombre ya que se encuentran en productos como leches

Recibido: diciembre 2009; aceptado: octubre 2010.

<sup>1</sup> Universidad de La Sabana, Facultad de Ingeniería. Campus Universitario Puente del Común. Km 7, autopista Bogotá-Chía. Cundinamarca, Colombia.

Correos electrónicos: <sup>2</sup> <maria.cueto@unisabana.edu.co>; <sup>3</sup> <yudtanduly@gmail.com>; <sup>4</sup> <jacquelinevari@unisabana.edu.co>.

fermentadas, quesos madurados, cárnicos y hasta en algunas preparaciones de vegetales; son microorganismos comensales de la piel y la mucosa del tracto digestivo y genital de humanos y animales, sitios de donde se han recuperado numerosas especies con frecuencia y distribución variable según el organismo de donde fueron aisladas. Este grupo bacteriano inicia la colonización del sistema digestivo al momento del nacimiento de un nuevo ser, la cual declina con la edad por disminución en la adhesión a la mucosa intestinal (Strompfová y Lauková 2004).

El suero costeño es un producto lácteo de color crema blanco suave, moderadamente fluido que presenta grumos y algo de sinéresis; se obtiene mediante la acidificación espontánea de la leche en calabazos (fruto seco de *Lagenaria vernalis*) por la acción de BAL y otros microorganismos, en procesos artesanales o semindustriales y es consumido en la costa Atlántica colombiana, en la mayoría de los municipios de los departamentos de Bolívar, Cesar, Córdoba, Magdalena y Sucre. El proceso tradicional es producto de la combinación de diversos factores tales como: la temperatura ambiental, que en la región del Caribe es en promedio 28 °C, y de la población microbiana de la leche que se fija naturalmente en el calabazo (Cueto et al. 2007).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentos y la Organización Mundial de la Salud (WHO 2002) definen la palabra probiótico como: “organismos vivos que ingeridos en cantidad adecuada confieren un beneficio saludable en el huésped”. Para ello, se han establecido ciertas características que deben reunir estos microorganismos las cuales aseguran su eficiencia, eficacia y beneficio para el hospedero. Entre estas características se encuentran: no ser patógeno, ni tóxico; estabilidad al contacto con bilis y ácido; adhesión a la mucosa intestinal (Shah 2000). Entre los principales géneros utilizados en la industria

de alimentos como probióticos se encuentran especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. En este estudio se utilizó una metodología in vitro, que simula el paso por el tracto gastrointestinal humano que debe atravesar un microorganismo para ser considerado como potencial probiótico.

Los microorganismos probióticos producen sustancias antimicrobianas como ácidos láctico y acético, que por medio de la acidificación del intestino ayudan a inhibir la proliferación de algunos microorganismos patógenos, así mismo son fuente de metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas (Savadogo et al. 2006).

Los antibióticos son agentes antimicrobianos altamente eficaces en el tratamiento y erradicación de las infecciones bacterianas, sin embargo su efectividad se ha visto reducida debido a que las bacterias son microorganismos adaptables y capaces de desarrollar mecanismos de resistencia. En recientes investigaciones, se ha afirmado que las bacterias comensales incluyendo BAL pueden actuar como reservorios de genes de resistencia a antibióticos similares a los encontrados en patógenos humanos (Mathur y Singh 2005). La principal amenaza asociada con estas bacterias es que pueden transferir los genes de resistencia a bacterias patógenas por medio de elementos móviles como plásmidos o transposones (Mathur y Singh 2005); por este motivo es importante evaluar si la resistencia a antibióticos encontrada en algunas BAL se debe a elementos móviles o a elementos cromosomales, en cuyo caso no presentarían riesgo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Condiciones de crecimiento.** Se evaluaron 53 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas del suero costeño (Cueto et al. 2007), conservadas a -80 °C en caldo Man, Ragosa, Sharpe (MRS) y 30% de glicerol (p/v). Como referencia se utilizó la cepa *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (Cebeci y

Gürakan 2003). Las bacterias fueron activadas por incubación de 24 h en caldo MRS en condiciones aeróbicas a 37 °C y para cada ensayo se verificó la pureza de cada uno de los cultivos que se iba evaluar.

**Simulación de tolerancia a jugo gástrico y sales biliares.** En la evaluación de la tolerancia de estas cepas a pH ácido luego de activar el microorganismo, se tomaron 100 µl del cultivo y se inoculó en caldo MRS ajustado a pH 2,0 con HCL 6 M y se incubó por 2 h a 37 °C (Noriega et al. 2004). En la determinación de la tolerancia a sales biliares de las cepas evaluadas se tomaron 100 µl del cultivo fresco y se inoculó en caldo MRS enriquecido con sales biliares (0,3%) (Sigma B8756) (pH: 7,0) se incubó por 2 h a 37 °C. La confirmación de células viables se realizó con el procedimiento descrito anteriormente.

**Determinación del porcentaje de células viables.** El conteo de células viables se realizó por el método de conteo en placa en agar MRS. Fueron incubados a 37 °C por 24 a 48 h determinando el número unidades formadoras de colonias. El porcentaje de supervivencia fue calculado de acuerdo con la siguiente ecuación:

#### Porcentaje de supervivencia

$$(\%) = \frac{\log \text{UFC } N_1}{\log \text{UFC } N_0} \times 100 \quad (1)$$

Donde  $N_1$  representa el total de células viables después de los tratamientos y  $N_0$  representa el número inicial de BAL inoculadas (Bao et al. 2010).

**Cuantificación del ácido láctico.** Para determinar la concentración de ácido láctico producido por cada BAL se utilizó la metodología de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) descrita por Dubey y Mistre (1996). El sobrenadante de cada cultivo se filtró con un filtro de jeringa de 0,2 µm (Minisart® 0,2 µm). Se adicio-

naron 100 µl de ácido nítrico 0,1 N a 1,5 ml del filtrado, el cual se centrifugó a 1.500 g por 30 minutos a 25 °C. La concentración de ácido láctico se determinó por HPLC (*Bomba BAS Solvandeli system PM- 80*) equipada con una columna para la determinación de ácido láctico (MetaCarb 67H 300 x 6,5 mm, *Varian Inc.*) y un detector de UV de 210 nm, operado a 60 °C con una tasa de flujo de 0,5 ml/minuto y utilizando como fase móvil ácido fosfórico 0,01 N; la cuantificación se realizó por triplicado. El sistema HPLC fue calibrado usando estándares de ácido láctico (Sigma) de 1-4 g/l con un  $r = 0,9948$ .

**Determinación de la resistencia a antibióticos de uso comercial.** Se empleó la prueba de difusión agar recomendada por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* con las cepas activadas en caldo MRS a 37 °C durante 8 h y discos de antibióticos Becton Dickinson, BBL. Estas placas se incubaron a 37 °C por 24 h y luego se determinó el diámetro de inhibición en mm (Canžek y Bogovic 2001). Los antibióticos utilizados fueron: penicilina, cloranfenicol, ampicilina, rifampicina, vancomicina, norfloxacin, clindamicina, ampicilina sulbactam, tetraciclina, cefoxitin, eritromicina, gentamicina, ácido nalidixico y amoxicilina.

**Caracterización bioquímica.** Se utilizó el sistema de identificación bioquímica *Miniaturized Biochemical Test Kits API® 50 CHL Medium (BioMerieux)*. Se tomaron las colonias aisladas en agar MRS provenientes de un subcultivo, que se habían mantenido durante 24 h en incubación y se siguieron las recomendaciones del fabricante. Al comparar el perfil de fermentación de carbohidratos de cada una de las cepas con la bases de datos proporcionada por el fabricante, se identificó la especie para cada una de las bacterias aisladas.

**Adhesión al mucus intestinal.** Para evaluar la adhesión de las BAL se realizaron tres pasos: obtención del mucus intestinal; marcaje de

BAL con fluoresceína (DTAF) y ensayo de adhesión in vitro.

**Obtención del mucus intestinal.** La adhesión se evaluó según el método descrito por Ouwehand et al. (2002) modificado. Para la obtención de mucus de intestino delgado de cerdo se cortó el intestino en trozos de 15 cm, se lavó con agua destilada estéril y luego con *buffer* fosfato salino (PBS) (NaCl 8,0 g, KCl 0,2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O 1,44 g, 0,2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, en 1.000 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril) con 0,01% de gelatina pH 7,4 enseguida se abrieron los trozos de intestino y se obtuvo el mucus por raspado, la muestra fue recolectada en tubos Falcom estériles, se adicionó PBS, se homogeneizó, se centrifugó a 7.400 g por 10 minutos a 4 °C y se retiró el sobrenadante; este procedimiento se realizó dos veces y se almacenó inmediatamente a -80 °C hasta su utilización.

**Marcaje de BAL con fluoresceína.** Para observar la adhesión de las BAL en el mucus intestinal, fueron marcadas con DTAF según el método descrito por Sherr et al. (1987). Las cepas se cultivaron en 30 ml de caldo MRS por 24 h a 37 °C, se centrifugaron a 8.000 g por 10 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 500 µl de PBS y 250 µl de DTAF (10 mg de DTAF Sigma en 50 ml de PBS). La suspensión fue incubada en baño María a 60 °C por 2 h y lavada tres veces con PBS.

**Ensayo de adhesión in vitro.** Para evaluar la adherencia bacteriana a la mucosa intestinal, se tomaron 10 µl de la suspensión de BAL y se centrifugaron a 10.000 g, por 10 minutos a 4 °C; 200 µl del mucus fueron adicionados al pellet, homogeneizando con vortex. Se incubó durante 2 h a 37 °C y seguidamente fue lavado con *buffer* PBS de 3-4 veces; 1 µl fue colocado en una lámina portaobjetos, y visualizado en microscopio de fluorescencia (*Nikon Eclipse 80i*) con filtro de 450-500 nm en 100x y se evaluó la cantidad de BAL adherida por campo.

**Análisis estadístico.** Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos obtenidos se expresaron en términos de desviación estándar. Los valores promedio fueron comparados con una prueba de significancia ANOVA (análisis de la varianza) con  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

De las 53 cepas evaluadas, 29 toleraron el caldo MRS ajustado a pH 2,0 con reducción en promedio de 3 ciclos log, partiendo del crecimiento inicial 9,0 log UFC; y 26 cepas toleraron el caldo enriquecido con sales biliares presentando una disminución de 4 ciclos log postratamiento. El porcentaje promedio de supervivencia de las cepas evaluadas en el medio con pH 2,0 fue de 54% y el obtenido con 0,3% de sales biliares de 63%.

Se seleccionaron inicialmente 26 cepas que presentaron crecimiento en los medios modificados, a las cuales se les cuantificó la producción de ácido láctico, estudio adicional para evaluar la capacidad de éste como agente antimicrobiano. La cepa *L. fermentum* 72, presentó la mayor concentración de ácido láctico  $1,0 \pm 0,08$  g/l. Como control de la técnica HPLC se cuantificó un patrón de 4,00 g/l obteniéndose como resultado 3,98 g/l.

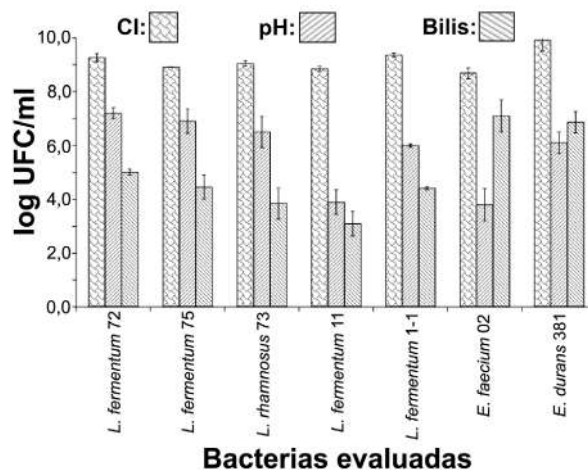
Como criterio de selección para las cepas tolerantes a condiciones de estrés como pH bajo y sales biliares, a estas 26 cepas se les evaluó la resistencia a 14 antibióticos de importancia epidemiológica (tabla 1). Las cepas seleccionadas como potenciales probióticas para este estudio, fueron aquellas que presentaron sensibilidad a los antibióticos vancomicina y cefoxitin. De estas, 5 eran Lactobacilos y presentaron sensibilidad a vancomicina y 2 *Enterococcus* que presentaron sensibilidad tanto a vancomicina como cefoxitin, para un total de 7 cepas.

**Tabla 1.** Sensibilidad a antibióticos presentada por las cepas evaluadas (CS = cepas sensibles; CI = cepas intermedias; CR = cepas resistentes)

Antibióticos	# de CS	# de CI	# de CR
Rifampicina	23	0	3
Ampicilina	26	0	0
Cloranfenicol	26	0	0
Tetraciclina	26	0	0
Norflaxacina	3	4	19
Ácido nalidíxico	1	0	25
Clindamicina	23	0	3
Cefoxitin	1	1	24
Amoxicilina / Ácido calvulánico	25	0	1
Eritromicina	21	1	4
Ampicilina sulbactam	26	0	0
Vancomicina	7	0	19
Gentamicina	14	5	7
Penicilina	26	0	0

Las 7 cepas seleccionadas por presentar sensibilidad a antibióticos fueron caracterizadas inicialmente por fermentación de azúcares y actualmente hacen parte de identificación molecular; las cepas encontradas fueron: *Enterococcus faecium* 02, *E. durans* 381, *Lactobacillus rhamnosus* 73, *L. fermentum* 11, *L. fermentum* 72, *L. fermentum* 1-1 y *L. fermentum* 75.

El efecto causado en las bacterias seleccionadas por la simulación del tránsito gástrico se observa en la figura 1 y tabla 2; en los resultados de la tasa de supervivencia en medio con pH bajo, tres de las cepas seleccionadas evidenciaron alta tolerancia a pH 2,0 durante dos horas presentando porcentaje de supervivencia por encima del 70%, asimismo dos de estas cepas reportaron porcentaje mayor del 60% y las dos últimas mayor al 40%.

**Figura 1.** Comportamiento del crecimiento de las cepas seleccionadas como potenciales probióticos en MRS ajustado a pH 2,0 y sales biliares 0,3% respecto al crecimiento inicial [Crecimiento inicial (CI) ; Crecimiento en medio pH: 2,0 ; Crecimiento en medio enriquecido con 0,3% de sales biliares **Tabla 2.** Porcentaje de supervivencia de las cepas seleccionadas según tolerancia a pH ácido

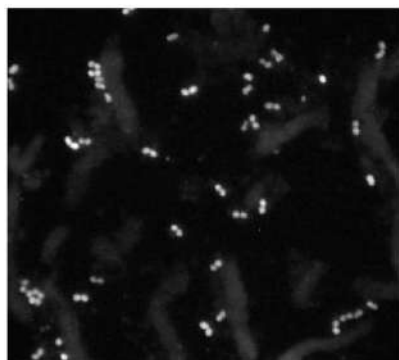
Cepas	Tolerancia a pH bajo (pH: 2,0) log UFC/ml		
	0 h	2 h	% de supervivencia
<i>L. fermentum</i> 72	9,3 ± 0,2	7,2 ± 0,2	77,7
<i>L. fermentum</i> 75	8,9 ± 0,0	6,9 ± 0,2	77,4
<i>L. rhamnosus</i> 73	9,1 ± 0,1	6,5 ± 0,0	71,8
<i>L. fermentum</i> 11	8,8 ± 0,1	3,9 ± 0,2	44,1
<i>L. fermentum</i> 1-1	9,4 ± 0,1	6,0 ± 0,4	64,1
<i>E. faecium</i> 02	8,7 ± 0,2	3,8 ± 0,2	43,8
<i>E. durans</i> 381	9,8 ± 0,4	6,1 ± 0,3	61,5

La tolerancia a 0,3% de sales biliares de las cepas seleccionadas se observa en la figura 1 y tabla 3; en los resultados del porcentaje de supervivencia se nota que las sales biliares tienen mayor efecto que el pH ácido en la inhibición del crecimiento de las cepas seleccionadas, aunque una de las cepas presenta alta tolerancia (80%); tres cepas presentaron un porcentaje de supervivencia mayor al 50%, dos superior al 40% y una con 35%.

**Tabla 3.** Tolerancia a 0,3% de sales biliares de las cepas seleccionadas

Cepas	Tolerancia a sales biliares (0,3%) log UFC/ml		
	Medio no suplementado	Medio con 0,3% (p/v) Oxgall	% de supervivencia
<i>L. fermentum</i> 72	9,3 ± 0,2	5,0 ± 0,1	54,1
<i>L. fermentum</i> 75	8,9 ± 0,0	4,5 ± 0,5	50,0
<i>L. rhamnosus</i> 73	9,1 ± 0,1	3,8 ± 0,6	42,5
<i>L. fermentum</i> 11	8,8 ± 0,1	3,1 ± 0,5	35,0
<i>L. fermentum</i> 1-1	9,4 ± 0,1	4,4 ± 0,1	47,2
<i>E. faecium</i> 02	8,7 ± 0,2	7,1 ± 0,6	81,7
<i>E. durans</i> 381	9,8 ± 0,4	6,9 ± 0,4	69,2

A estas siete cepas, siguiendo con los criterios de selección in vitro de probióticos se les evaluó la adhesión al mucus intestinal, contando las BAL adheridas en 10 campos microscópicos (tabla 4); el ensayo demostró que en su totalidad las BAL se adherieron a la mucosa intestinal (figura 2).

**Figura 2.** Adhesión al mucus intestinal de *Enterococcus durans* 381 marcado con DTAF**Tabla 4.** Promedio del recuento de bacterias ácido lácticas adheridas al mucus intestinal en 10 campos microscópicos

Cepas seleccionadas	BAL X campo
<i>L. fermentum</i> 75	192
<i>L. fermentum</i> 11	96
<i>L. fermentum</i> 72	79
<i>L. fermentum</i> 1-1	55
<i>L. rhamnosus</i> 73	88
<i>E. faecium</i> 02	78
<i>E. durans</i> 381	140

## DISCUSIÓN

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentos (**FAO**) y la Organización Mundial de la Salud (**OMS**), establecieron en 2002 criterios de selección de microorganismos probióticos en el “Informe del grupo de trabajo sobre la redacción de directrices para la evaluación de los probióticos en los alimentos” (WHO 2002). Uno de los criterios de selección in vitro es la resistencia a la acidez estomacal y a las sales biliares de intestino delgado (Park et al. 2006). En el presente estudio preliminar, este criterio fue el primero en ser evaluado para seleccionar las cepas con potencial probiótico, para luego seleccionar las cepas tolerantes a estas condiciones por su resistencia a antibióticos de interés epidemiológico.

De los 53 aislamientos obtenidos del suero costeño, 54,7% resistieron pH 2,0 y 49,1% resistieron sales biliares al 0,3% características que se pueden correlacionar con la supervivencia in vivo a través del tracto gastrointestinal. En condiciones normales el tiempo de tránsito gastrointestinal comprende de 2 a 4 h y varía según el individuo (Macfarlane y Dillon 2007). El estrés celular inicia en el estómago a pH de 1,5 previo a la ingestión de alimentos; las bacterias pasan a través del estómago, entran al tracto intestinal donde son secretadas las sales

biliares (Cebeci y Gürakan 2003; Chou y Weimer 1999). Gilliland et al. (1984) consideraron que la concentración crítica para determinar la resistencia de cepas era de 0,3% de sales biliares (Erkkilä y Petäjä 2000).

En la tabla 3 se observa que la cepa más tolerante a la acidez gástrica fue *L. fermentum* 72 presentando porcentaje de supervivencia de 77,7%, luego de dos horas de incubación, Bao et al. (2010) reportaron en su estudio 11 cepas de *L. fermentum* con alta tolerancia a la acidez gástrica con porcentaje de supervivencia del 80% luego de 3 h de incubación a pH 2,5; asimismo citan los resultados reportados por Conway et al. (1987) donde *L. acidophilus* NCFM disminuye cuatro ciclos log al ser inoculado en buffer fosfato por 3 h a pH 3,0. Teniendo en cuenta esto, *L. fermentum* 72 presenta alta tolerancia a la acidez y *L. fermentum* 75, *L. rhamnosus* 73 y *L. fermentum* 1-1 tuvieron un comportamiento superior a *L. acidophilus* NCFM.

El porcentaje de supervivencia en los *Enterococcus* seleccionados bajo estas condiciones hostiles fue de 43 y 61% para *E. faecium* 02 y *E. durans* 381, respectivamente, tolerancia a la acidez de acuerdo con los resultados obtenidos por Stropfová et al. (2004); aunque estas cepas se incluyen en los resultados como potenciales probióticos, deben ser evaluadas con estudios más detallados para establecer su seguridad en el hospedero. Adicionalmente, en estudios reportados por Maragkoudakis et al. (2006), en los cuales se evalúa el potencial probiótico de cepas aisladas de lácteos se encontró que la cepa *L. rhamnosus* ACA-DC 112 presenta porcentaje de supervivencia del 80%, inoculada en medio ajustado a pH 2,0 después de 2 h, que comparándolo con la supervivencia obtenida por la cepa de *L. rhamnosus* evaluada en este estudio en las mismas condiciones de crecimiento, presenta valores en el mismo rango.

En la tolerancia a sales biliares se observa que el porcentaje de supervivencia de las bacterias

clasificadas como *E. faecium* 02 y *E. durans* 381 inoculadas en medio ajustado al 0,3% de sales biliares, presentaron porcentaje en células viables del 80% en promedio; este porcentaje se encuentra en el rango reportado por Marciňáková et al. (2010) de *Enterococcus* sp. aislados de heces de conejo que presentaron en promedio 80-90% de tolerancia a 0,3% de sales biliares (tabla 3); Maragkoudakis et al. (2006), reportan una tasa de supervivencia para BAL tolerantes a 0,3% de sales biliares de 0% de acuerdo con estos resultados los *Lactobacillus* evaluados presentaron alta tolerancia.

Los resultados obtenidos para la cuantificación de ácido láctico de las cepas seleccionadas de tolerancia a pH ácido y sales biliares oscilaron en un rango de  $0,018 \pm 0,08$  a  $1,008 \pm 0,17$  g/l valores que se encuentran en el rango reportado por Adesokan et al. (2009), los cuales obtuvieron una producción entre  $0,65 \pm 0,4$  a  $1,35 \pm 0,04$  g/l de ácido láctico de *Lactobacillus* sp., cultivados en medios enriquecidos.

La siguiente etapa de selección se realizó de acuerdo con la sensibilidad a antibióticos presentada por cada una de las cepas, donde se obtuvieron 7 cepas como potenciales probióticos por presentar sensibilidad a vancomicina y cefoxitin considerados de importancia epidemiológica e influyente en la seguridad del hospedero.

En este estudio solo se trabajó con las 7 cepas seleccionadas, las cepas restantes y dos de las cepas seleccionadas del género *Enterococcus*, serán evaluadas en un estudio molecular donde se determinará si la resistencia presentada se debe a elementos genéticos móviles como plásmidos o trasposones, así como también se evaluarán las cepas de *Enterococcus* que no presentaron dicha resistencia, para reducir el riesgo de que exista transferencia de resistencia a antibióticos con microorganismos patógenos presentes en la microflora intestinal. Actualmente, existen pocos estudios que investiguen

los mecanismos de resistencia a antibióticos en BAL provenientes de los alimentos, en la mayoría dichas investigaciones se concentran en *Enterococcus* patógenos, mientras que el número de estudios sobre *Lactococcus* y *Lactobacillus* es limitado (Mathur y Singh 2005).

En años recientes se han incrementado las cepas multiresistentes a antibióticos como la metilicina, cefoxitin, vancomicina, entre otros, evidenciando un problema epidemiológico (Pultz et al. 2006). Estas cepas provienen en su mayoría de aislamientos clínicos causando infecciones nosocomiales (Kaufmann y Fairchild 2004).

Cabe la posibilidad de encontrar BAL en alimentos de elaboración artesanal como el suero costeño y de estar presentes en productos lácteos fermentados y cultivos iniciadores, de forma que pueden ser ingeridos en grandes cantidades para interactuar con la microflora intestinal. La introducción comercial de probióticos que incluyan genes con resistencia a los antibióticos también puede tener consecuencias negativas, por ejemplo, cuando la resistencia se transfiere a patógenos intestinales (Mathur y Singh 2005). Entre las cepas de mayor importancia epidemiológica se encuentran los *Enterococcus* vancomicina resistentes (**VRE**) y los *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes (**MRSA**). Los *Enterococcus* y *Staphylococcus* comparten un nicho ecológico común como el tracto gastrointestinal según lo demostraron Naoko y Kenji (1996) y Ray et al. (2003), donde el 62% de los pacientes colonizados con VRE y *S. aureus*, presentaron resistencia a la vancomicina evidenciando la transferencia de genes de resistencia. Hasta la fecha no se ha reportado ningún caso de MRSA y vancomicina resistente, razón por la cual en este estudio las cepas pertenecientes al género *Enterococcus* spp. que presentaron resistencia al cefoxitin y la vancomicina no fueron seleccionadas como potenciales probióticos, teniendo en cuenta que el antibiótico de elección para tratar MRSA es la vancomicina. El criterio

de selección de cepas de *Lactobacillus* sp. fue la sensibilidad a la vancomicina.

Las siete cepas que se encontraron con características probióticas según clasificación *API*<sup>®</sup> 50 *CHL* son: *Enterococcus durans* 381, *E. faecium* 02, *Lactobacillus fermentum*, *L. fermentum* 72, *L. fermentum* 1-1, *L. fermentum* 75 y *L. rhamnosus* 73.

La capacidad de adhesión de las bacterias con potencial probiótico es una característica importante debido a que las cepas que se pueden adherir a la mucosa intestinal podrán colonizar y ejercer un efecto benéfico al huésped y competir con microorganismos patógenos. A estas cepas, siguiendo con los criterios de selección in vitro de potenciales probióticos, se les evaluó la adhesión al mucus intestinal contando las BAL adheridas en 10 campos microscópicos (tabla 4); el ensayo demostró que en su totalidad las BAL se adhirieron a la mucosa intestinal (figura 2).

Las 7 cepas seleccionadas por presentar tolerancia a pH ácido y sales biliares, sensibilidad a los antibióticos de importancia epidemiológica y adhesión a mucus intestinal, reúnen las condiciones requeridas para considerarse como potencialmente probióticas según los criterios estipulados por la FAO y una de estas cepas produjo cantidades importantes de ácido láctico, característica probiótica que también podría ser importante en el ámbito industrial. Este estudio es un primer paso de caracterización que deberá ser complementado con una evaluación in vivo que confirme los resultados obtenidos para considerar estas cepas como probióticas y poderse incluir en una matriz alimentaria.

## CONCLUSIONES

De los 53 aislamientos evaluados fueron seleccionados 26 por su sobrevivencia en medios hostiles (pH 2,0 y sales biliares), y 7 se seleccionaron como potenciales probióticos debido



a la sensibilidad que presentaban a antibióticos de importancia epidemiológica.

El antibiograma realizado a las 26 cepas seleccionadas, demostró que algunas de estas cepas identificadas bioquímicamente como *Enterococcus* presentaron resistencia a la vancomicina considerando este resultado de importancia clínica debido a que puede generar resistencia en la microbiota del hospedero, por esta razón no fueron consideradas para continuar con su caracterización como potenciales probióticos. Siete cepas cumplieron con las condiciones in vitro seleccionadas para este estudio, razón por la cual se sugiere continuar con las pruebas in vivo en un modelo animal para complementar el estudio. Adicionalmente, realizar el estudio de los genes de resistencia de las cepas descartadas. Así mismo, estas cepas caracterizadas previamente por *API*<sup>®</sup> 50 *CHL*, serán caracterizadas por técnicas moleculares, siendo esta la prueba más certera para la identificación de microorganismos.

De las cepas seleccionadas *L. fermentum* 72, *L. fermentum* 11 y *L. rhamnosus* 73, tuvieron producción de ácido láctico por encima de 0,46 g/l, característica que les confiere un valor agregado a estas cepas

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de La Sabana la financiación del proyecto ING-35-2007.

## REFERENCIAS

- Adesokan Y, Odetoyinbo B, Okanlawon B. 2009. Optimization of lactic acid production by lactic acid bacteria isolated from some traditional fermented food in Nigeria. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8 (5): 611-615.
- Bao Y, Zhang Y, Zhang Y, Liu Y, Wanga Y, Dong X, Wang Y, Zhang H. 2010. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 21 (5): 695-712.
- Canžek A, Bogovic B. 2001. Antibiotics influence on lactic acid bacteria inhabiting gastrointestinal tract. *Mljekarstvo*, 51 (2): 119-134.
- Cebeci A, Gürakan C. 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology*, 20 (5): 511-518.
- Chou L, Weimer B. 1999. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 82 (1): 23-31.
- Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science*, 70 (1): 1-12.
- Cueto C, García D, Garcés F, Cruz J. 2007. Preliminary studies on the microbiological characterization of lactic acid bacteria in suero costeño, a Colombian traditional fermented milk product. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 49 (1-2): 12-18.
- Dubey U, Mistry V. 1996. Growth characteristics of bifidobacteria in infant formulas. *Journal of Dairy Science*, 79 (7): 1146-1155.
- Erkkilä S, Petäjä E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*, 55 (3): 297-300.
- Gilliland S, Staley T, Bush L. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. *Journal of Dairy Science*, 67 (12): 3045-3051.
- Kaufmann D, Fairchild K. 2004. Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants. *Clinical Microbiology*, 17 (3): 638-680.
- Macfarlane S, Dillon JF. 2007. Review, microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 102 (5): 1177-1436.
- Maragkoudakis A, Zoumpoulou G, Miarisa C, Kalantzopoulou G, Potb B, Tsakalidou F. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16 (3): 189-199.
- Marcíňáková M, Klingberg T, Lauková T, Budde B. 2010. The effect of pH, bile and calcium on the adhesion ability of probiotic enterococci of animal origin to the porcine jejunal epithelial cell line IPEC-J2. *Anaerobe*, 16 (2): 120-124.
- Mathur S, Singh R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105 (3): 281-295.
- Naoko KM, Kenji O. 1996. Gastrointestinal colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in immunosuppressed mice. *Infection and Immunity*, 64 (10): 4231-4235.
- Noriega L, Gueimonde M, Sánchez B, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG. 2004. Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glucosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (1): 79-86.

- Ouwehand A, Suomalainen T, Tölkö S, Salminen S. 2002. In vitro adhesion of propionic acid bacteria to human intestinal mucus. *Lait* 82 (1): 123-130.
- Park S, Hwang Y, Kim Y, KIM J, Song J, Lee K, Jeong K, Rhee M, Kim K, Kim T. 2006. Comparison of pH and bile resistance of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22 (1): 35-37.
- Pultz N, Vesterlund S, Ouwehand AC, Donskey CJ. 2006. Adhesion of vancomycin-resistant *Enterococcus* to human intestinal mucus. *Current Microbiology*, 52 (3): 221-224.
- Ray A, Pultz N, Bhalla A, Aron D, Donskey C. 2003. Coexistence of vancomycin-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* in the intestinal tracts of hospitalized patients. *Clinical Infectious Diseases*, 37 (7): 875-881.
- Savadogo A, Ouattara C, Bassole I, Traore SA. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria —minireview. *African Journal of Biotechnology*, 5 (9): 678-683.
- Shah N. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83 (4): 894-907.
- Sherr B, Sherr E, Fallon R. 1987. Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate in situ protozoan bacterivory. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (5): 958-965.
- Strompfová V, Lauková A. 2004. Antibiotic resistance of acid lactic bacteria from canine faeces. *Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy*, 48: 215-218.
- Strompfová V, Lauková A, Ouwehand A. 2004. Selection of enterococci for potential canine probiotic additives. *Veterinary Microbiology*, 100 (1-2): 107-114.
- WHO (World Health Organization) [Internet]. 2002. 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. Food and Agriculture Organization. Fecha de acceso: 17 de diciembre de 2010. Disponible en: <[http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf)>.