



## EFFECTO INHIBITORIO DE *Lactobacillus acidophilus* SOBRE EL ENTEROPATOGENO *Vibrio cholerae* 01 OGAWA, *in vitro*

Milena Guerrero F.<sup>1</sup>, Sofía Guzmán S.<sup>1</sup>, Nubia Yandar B.<sup>1</sup>, Alvaro Pazos M.<sup>2</sup>

### RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas son comúnmente utilizadas para producir una variedad de productos alimenticios fermentados conocidos como probióticos y su metabolismo conduce a obtener productos con una mejor vida en conservación y con propiedades organolépticas particulares, además contribuye a posibles beneficios nutricionales y en la salud tales como el mejoramiento de la digestión de lactosa y el alivio de ciertos tipos de diarrea, esta última considerada como un problema de salud muy frecuente en cualquier parte del mundo y es particularmente significativa en los países subdesarrollados. La presente investigación buscó probar *in vitro* la capacidad inhibitoria de un sustrato fermentado con una bacteria láctica que tuviera propiedades probióticas sobre *Vibrio cholerae* 01 OGAWA, para lo cual se desarrollaron cuatro fases metodológicas: inicialmente se realizó el aislamiento de una bacteria láctica de tracto intestinal humano; posteriormente, se seleccionó el sustrato melaza con leche en polvo, que proporcionó las condiciones óptimas para el crecimiento y desarrollo de la cepa probiótica, con este se realizó un ensayo de inhibición antagónica *in vitro* contra la cepa patógena *Vibrio cholerae* 01 OGAWA. El aislado fue identificado morfológica, fisiológica y bioquímicamente como *Lactobacillus acidophilus*, el cual mediante la prueba de significancia de TUKEY mostró los mejores resultados para la prueba de degradación del almidón, además de un alto rendimiento de ácido láctico característica que podría ser de importancia a nivel industrial. El fermento láctico inhibió el crecimiento del patógeno de mejor manera en la dilución  $10^{-1}$  con una densidad celular de  $35 \times 10^6$  bacterias/ml respecto al sustrato puro y a las diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , así lo demostró la prueba de significancia de TUKEY. Se pudo concluir finalmente que la bacteria láctica es capaz de inhibir el crecimiento de *Vibrio cholerae in vitro*, por tanto se proponen estudios encaminados a probar el efecto probiótico en humanos.

### INTRODUCCIÓN

En la última década, Colombia se ha caracterizado por una alta incidencia de enfermedades diarreicas agudas constituyendo una de las principales causas de hospitalización infantil. El cólera se encuentra dentro de este grupo enfermedades que ha afectado en gran parte regiones costeras y lugares donde las condiciones sanitarias no son adecuadas. Hasta ahora los tratamientos adoptados son en gran medida vulnerables y no han logrado controlar este tipo de afecciones.<sup>1,5</sup>

La microbiota gastrointestinal humana juega un papel importante en la salud del individuo. La composición y actividad de los microorganismos son responsables de funciones metabólicas, de barrera e interacciones con el huésped. En este sentido, las bacterias ácido lácticas autóctonas de tracto gastrointestinal humano, contribuyen a posibles beneficios nutricionales en la salud tales como el mejoramiento de la digestión de lactosa y el alivio de ciertos tipos de diarrea.<sup>5,8</sup>

1. Bióloga con Énfasis en Microbiología, Universidad de Nariño. e-mail: milenague@latinmail.com nubesina@latinmail.com; sandrasofia@latinmail.com  
2. M.Sc. Microbiología, Profesor asistente, Departamento de Biología, Universidad de Nariño e-mail: alpazmo@hotmail.com

Por tanto, la presente investigación propuso probar el efecto inhibitorio *in vitro* de un sustrato fermentado con *Lactobacillus acidophilus* aislado de tracto intestinal humano, sobre la cepa patógena de referencia *Vibrio cholerae*.

## MATERIALES Y METODOS

El desarrollo del presente trabajo se llevó a cabo en cuatro fases:

1. En el laboratorio No 4 de microbiología de la Universidad de Nariño, se realizó el aislamiento, purificación, conservación y activación de bacterias ácido lácticas de tracto intestinal humano a partir de muestras de materia fecal provenientes de cinco individuos correspondientes a una población infantil, estas fueron colectadas en recipientes plásticos estériles durante cinco días consecutivos para un número total de 25 muestras. Todas las muestras se sembraron en agar MRS modificado con azul de anilina.

2. Se determinó la capacidad amilolítica de las bacterias purificadas de las cuales, se escogió una de acuerdo a los halos de hidrólisis de mayor tamaño, para esto se cultivaron los aislados en agar MRS almidón 20 g/L por punción puntual y múltiple, se incubaron durante cinco días a 35° C y al cabo de este período las cajas fueron expuestas a vapores de yodo bisublimado el cual reacciona ante la presencia del almidón virando su color a un complejo café-azulado, dejando visualizar ampliamente las zonas de hidrólisis de este polisacárido.

Luego de escoger el microorganismo con mejor capacidad amilolítica se realizó la identificación por evaluación de la morfología celular mediante coloración de Gram, comparación de las características macroscópicas de las colonias y pruebas bioquímicas de degradación de carbohidratos en galerías API CH 50 en el laboratorio No 4 de microbiología - Universidad de Nariño. Además se realizaron pruebas bioquímicas convencionales en el laboratorio de bacteriología del Departamento de Microbiología-Universidad del Valle.

3. Se estableció el mejor sustrato para el crecimiento de *L. acidophilus* al realizar fermentaciones *in batch* de seis sustratos (harina de trigo, harina de plátano, harina de soya y arroz, harina de yuca, almidón de yuca y melaza) y tres diferentes fuentes de nitrógeno (Extracto de carne, extracto de levadura y leche en polvo descremada), tomándose como control el medio comercial MRS.

Para la elección del sustrato y la cinética de crecimiento se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros de fermentación: Evaluación de pH, formación de biomasa, producción de proteínas, consumo de azúcares y rendimiento de ácido láctico, y la determinación de estos dos últimos parámetros se llevó a cabo por el método del HPLC en el laboratorio de bioconversiones de la Universidad del Valle.

4. Finalmente se realizaron ensayos de inhibición antagónica *in vitro* mediante la técnica de micropocillos utilizando la bacteria indicadora *V. cholerae* 01 OGAWA, la cual fue suministrada por el laboratorio de Salud Pública de Nariño- Hospital Civil, donde además se realizó la serotipificación del patógeno.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

De cada muestra de materia fecal se purificaron 15 bacterias en agar MRS modificado con azul de anilina para un total de 75 aislados correspondientes a colonias cremosas, de borde entero, superficie elevada, pigmentadas de color azul compatibles con la morfología típica de bacterias ácido lácticas. La pureza de los cultivos se verificó en base a la coloración de Gram buscando siempre bacilos Gram positivos.

### CONSERVACIÓN Y ACTIVACIÓN

Las bacterias lácticas se conservaron bien en agar MRS almidón 5 g/L a 4°C y se activaron en caldo MRS comercial. Por su parte el patógeno *V. cholerae* se conservó bien en agar nutritivo con ajuste de pH

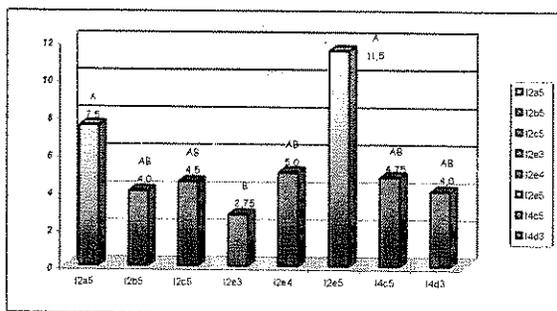
a 8.4 y se activó de mejor manera en caldo tripticasa.

### DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD AMILOLÍTICA

Se encontró que de los 15 aislados, solo 8 respondieron positivamente a la prueba de hidrólisis del almidón, su acción posiblemente estuvo influenciada por enzimas  $\alpha$ -amilasas,  $\beta$ -amilasas o amiloglicosidasas.

La bacteria láctica que presentó la mejor degradación del almidón, de acuerdo con el análisis de varianza mediante la prueba de TUKEY con un  $P < 0.5$  (Gráfico 1), fue identificada como *L. acidophilus*; la realización de esta prueba fue importante para escoger una sola bacteria láctica que fue empleada en la fermentación de sustratos amiláceos.

Gráfico 1. Promedios de los halos de hidrólisis del almidón para las bacterias lácticas y Prueba de TUKEY.



Promedios con la misma letra no presentan diferencias significativas.

### ELECCIÓN DEL SUSTRATO

Al comparar los resultados obtenidos de los seis sustratos se escogió el medio Melaza con leche en polvo ya que presentó los mejores porcentajes de ponderación, cabe anotar que en este sustrato se obtuvo la más alta producción de ácido láctico a las 24 horas de fermentación con un valor de 67.3 g/L, hecho que podría atribuirse al desdoblamiento de los azúcares totales disponibles que contiene este sustrato, esta cantidad puede ser considerada representativa como producto final del metabolismo que realiza *L. acidophilus* y debido a su alto rendimiento el microorganismo aislado podría ser de gran importancia a nivel industrial (Tabla 1 y Gráfico 2). El recuento en placa presentó a este medio con la mejor formación de biomasa lo cual es muy importante en la elección de un sustrato adecuado como probiótico, ya que este debe conllevar una carga pesada de bacterias viables, según Raimbault (1996).<sup>7</sup>

Gráfico 2. Cromatograma obtenido por HPLC para el medio de melaza con leche en polvo a las 24 horas de fermentación.

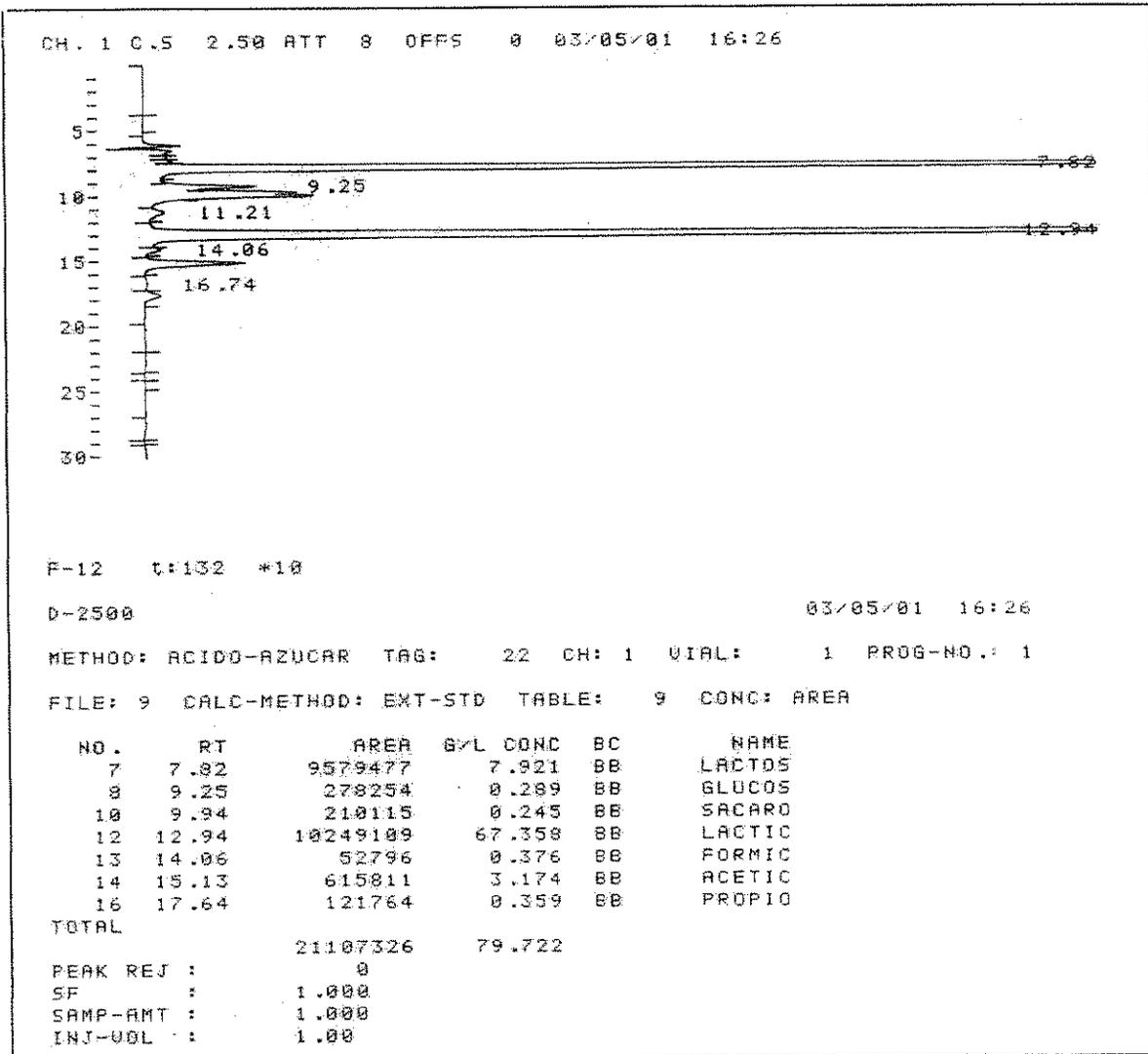


Tabla 1. Elección de sustrato interensayos

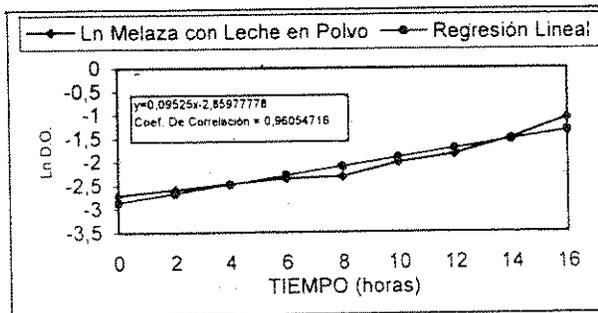
Sustratos	A <sub>1</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>1</sub>	D <sub>1</sub>	E <sub>1</sub>	F <sub>3</sub>	Ponderación	Elección
Parámetros Fermentación								
PH	5.28	7.23	4.74	5.28	4.65	6.83	5%	E <sub>1</sub>
Azúcares Consumo (g/l)	7.38	0.47	5.04	2.49	4.61	1.43	10%	A <sub>1</sub>
Ácido Láctico rendimiento (g/l)	5.20	2.78	8.57	21.9	5.90	5.67	10%	D <sub>1</sub>
Proteína Total producción (g/l)	3.6	5.28	2.39	7.48	2.66	4.31	50%	D <sub>1</sub>
Biomasa (UFC/ml) netas	37x10 <sup>8</sup>	21x10 <sup>7</sup>	30x10 <sup>8</sup>	87x10 <sup>8</sup>	82x10 <sup>8</sup>	20x10 <sup>8</sup>	25%	D <sub>1</sub>
Sustrato Elegido	Melaza con leche en polvo descremada						85%	D <sub>1</sub>

Fuente: esta investigación

Evaluación de la cinética de crecimiento para *L. acidophilus* en el medio melaza con leche en polvo

Este medio le proporcionó a la bacteria los nutrientes necesarios para continuar su fase exponencial de crecimiento aunque la bacteria altera su comportamiento al tomar los nutrientes y secretar productos metabólicos en un alto nivel de concentración como el ácido láctico. La velocidad de crecimiento permaneció constante durante esta fase con un valor de 0.09 h<sup>-1</sup> (Gráfico 3).

Gráfico 3. Comportamiento cinético de *L. acidophilus* en el medio de melaza con leche en polvo descremada. Ln (Logaritmo natural), D.O. (Densidad óptica).



El tiempo de duplicación de 7.24 horas, define que *L. acidophilus* en este sustrato es de crecimiento lento. Se concluyó además que la trofofase e idiofase

están separadas en el tiempo por lo cual se clasifica la fermentación como *in batch* tipo II. Al estimar la masa celular y la producción de proteína se determinó el tiempo de cosecha a las 14 horas, registrándose una biomasa de 75 x 10<sup>8</sup> UFC/ml y una concentración proteica de 14.5 g/L.

Ensayo de inhibición antagonica *in vitro*

De acuerdo con los resultados obtenidos en el medio melaza con leche en polvo *L. acidophilus* inhibe el crecimiento del patógeno *V. cholerae* de mejor manera en la dilución 10-1 con una densidad celular de 35x 10<sup>6</sup> bacterias/ml respecto al sustrato puro y a las diluciones 10-2 y 10-3, así lo demostró el análisis de varianza mediante la prueba de TUKEY con un P<0.1 (Tabla 2, Gráfico 4, Foto 1).

Tabla 2. Resultados del ANDEVA para los halos de inhibición antagonica en mm del sustrato probiótico sobre *Vibrio cholerae* 01 OGAWA.

FV	GL	SC	CM	FC	FT	
					5%	1%
Tratamiento	7	144	20.571	7.074**	2.16	2.94
A	1	0.055	0.055	0.018NS	3.99	7.07
B	3	114.65	38.216	13.143**	2.75	4.12
A x B	3	29.74	9.9133	3.409*	2.75	4.12
Error	65	189	2.9076			
Total	79	333				

FV =	Factor variable	**	Diferencias altamente significativas
GL =	Grados de libertad	*	Diferencias significativas
SC =	Suma de cuadrados	NS	No hay diferencias significativas
CM =	Cuadrado medio		
FC =	Frecuencia calculada	a1 =	Melaza con leche en polvo; a2 = MRS
FT =	Frecuencia tabulada	b1 =	Sustrato puro; b2 = Dilución 10-1; b3 = Dilución 10-2; b4 = Dilución 10-3
A =	Sustratos		Promedios con la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas.
B =	Niveles		

Gráfica 4. Promedios de halos de inhibición antagonica del producto probiótico sobre *V. cholerae* 01 OGAWA y prueba de TUKEY.

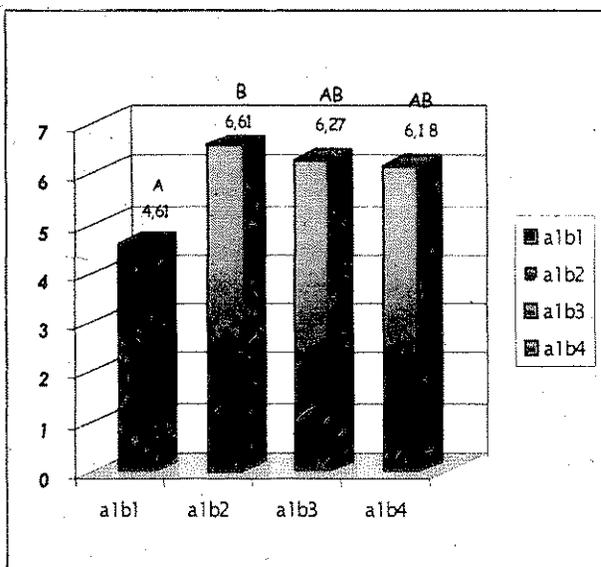


FOTO 1. MRS fermentado con *L. acidophilus* vs. *V. cholerae*



## CONCLUSIONES

El *L. acidophilus* se puede considerar como un microorganismo probiótico debido a que diferentes estudios, aparte del presente, han determinado que su consumo en ciertas cantidades puede proporcionar diversos beneficios en la salud, son resistentes a los ácidos y a la bilis y cuando se ingieren son capaces de sobrevivir a su paso a lo largo del tracto gastrointestinal.

Los ensayos de fermentación permitieron conocer la respuesta metabólica de la bacteria *L. acidophilus* al someterse a diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. Esto se pudo evidenciar a través del análisis por ponderaciones de los diferentes parámetros en cada sustrato y se determinó que en los medios con harina de trigo, harina de soya y arroz, almidón de yuca y melaza, la mejor fuente de nitrógeno fue

la leche en polvo, debido posiblemente a que este sustrato contiene un alto porcentaje de carbohidratos necesarios para la síntesis de material celular y para la producción de productos metabólicos.

Los azúcares consumidos del medio de cultivo, favorecieron la producción de ácido láctico en altas concentraciones, lo que permitió determinar el carácter homofermentativo de la bacteria *L. acidophilus*. Azúcares como glucosa y lactosa podrían haber participado a su vez en la formación de otros ácidos orgánicos como acético, cítrico, fórmico, isobutírico, propiónico y succínico que se encuentran en poca concentración pero que pudieron influenciar de alguna manera en el metabolismo bacterial.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. B.R.M. (2000). "Prebiotics and probiotics: ¿Are they functional foods?" American Journal of clinical nutrition 71: 1682s-1687s.
2. BACKER, J. M. (1999). Biotecnología: curso de prácticas de laboratorio. Zaragoza España.
3. BARNEY, C. E. (1996). Bacterias lácticas bactericinogénicas efecto sobre bacterias patógenas asociadas a alimentos. Facultad de Salud. Cali Colombia, Universidad del Valle.
4. CDC; OPS; OMS., Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*. 1994.
5. PARADA, J. L., Bacterias lácticas: Usos en fermentaciones y como probióticos. En: Congreso internacional de microbiología industrial. 1999. Universidad Javeriana.
6. PAZOS, A.J., Protección intestinal contra patógenos específicos a través de sustratos fermentados con *Lactobacillus casei subsp rrmnosus*. Departamento de Microbiología. Universidad del Valle. 2000.
7. RODRIGUEZ, B.S., Producción de biomasa láctica a partir de harinas de yuca. En: Facultad de ciencias Departamento de Biología. Universidad del Valle. Cali. Colombia. 1995.
8. ROLFE, R.D., The Role of Probiotics culture in the control of gastrointestinal health. Journal of Nutrition. 2000. 130: p. 3965-4025.

