



# Efecto del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* sp. sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis*

Effect of the culture supernatant of *Lactobacillus* sp. on the growth of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* and *Salmonella enteritidis*

Giovana Bustamante Saldaña y Pedro Alvarado Salinas

<sup>1</sup>Tesista, Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú. <sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT.

## RESUMEN

Se determinó el efecto del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* sp. aislado a partir de heces de neonatos sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhi*. Se recolectaron 15 muestras de heces de neonatos, de las cuales se aislaron e identificaron siete cultivos de *Lactobacillus* sp. La capacidad antagonista de los siete cultivos fue evaluada contra las bacterias patógenas mediante el método de difusión en agar. Se encontró que los cultivos de *Lactobacillus* sp. codificados como LMA-1, LMA-4, LMA-7, LMA-9 y LMA-13 presentan evidente capacidad antagonista, ya que inhibió todos los patógenos evaluados, mientras que el cultivo de *S. aureus* presentó resistencia frente a los cultivos de *Lactobacillus* sp. codificados como LMA-2 y LMA-10. Se concluye que el sobrenadante de los cultivos de *Lactobacillus* sp. aislado de heces de neonatos presenta efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhi*, pero no sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

**Palabras clave:** *Lactobacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, antagonismo

## ABSTRACT

The effect of the culture supernatant of *Lactobacillus* sp. isolated from feces of infants on the growth of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhi* was determined. 15 stool samples from neonates, which were isolated and identified seven cultures of *Lactobacillus* sp. were collected. The ability of antagonist of seven cultures against pathogenic bacteria was assessed by the agar diffusion method. It was found that *Lactobacillus* sp. coded as AML-1 AML-4 AML-7-9 and AML AML-13 showed evident antagonist capacity since all pathogens tested, while the *S. aureus* culture showed resistance against *Lactobacillus* sp. cultures coded as AML-2 and AML-10. It was concluded that the culture supernatant of *Lactobacillus* sp. isolated from stool of newborns has inhibitory effect on the growth of *S. enteritidis* and *S. typhi*, but not on the growth of *S. aureus*.

**Keywords:** *Lactobacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, antagonism

## INTRODUCCIÓN

En el tracto intestinal existe una gran variedad de bacterias (más de 1000 especies distintas) que ayudan a prevenir que microorganismos patógenos lo colonicen. Además en el intestino se cuenta con barreras como la acidez, movimientos peristálticos y la eliminación de microorganismos extraños por medio de la mucosa intestinal. Este tipo de mecanismos de defensa ayudan en muchas ocasiones a combatir la colonización de microorganismos patógenos.

*Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* conforman el grupo de bacterias ácido lácticas (BAL) usadas como probióticos en humanos. Las primeras se pueden encontrar en el intestino delgado y la vagina de los seres humanos y algunas especies son consideradas benéficas debido a que producen vitamina K, lactasa y sustancias antimicrobianas como acidolina, acidofina, lactocidina, las cuales ayudan a combatir y prevenir infecciones en sus hospedadores.

Sin embargo, la actividad antimicrobiana principal de las BAL se debe a la producción de ácido láctico, ácido acético  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , acetaldehído, entre otros. El ácido acético y propiónico producidos a través de la vía heterofermentativa, pueden interactuar con las membranas celulares y causar acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas; estos compuestos antimicrobianos son más efectivos que el ácido láctico debido a los elevados valores de pKa (ácido láctico 3.08, ácido propiónico 4.87 y ácido acético 4.75), por lo tanto, tienen un mayor rango de actividad antimicrobiana contra levaduras, mohos y bacterias. Al mismo tiempo, se ha observado que el ácido acético es más efectivo contra el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y la germinación de *Bacillus cereus* que el ácido láctico y ácido cítrico y que el crecimiento de *S. typhimurium* se reduce cuando se utiliza a los ácidos láctico y acético combinados, lo que demuestra su actividad sinérgica.

El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), por su lado, es producido en presencia de oxígeno por las BAL a través de la acción de flavoproteína oxidasa o NADH peroxidasa y su efecto antimicrobiano se debe a la oxidación de los grupos sulfhidrilo causando la desnaturalización de enzimas: el  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido por *Lactobacillus* y *Lactococcus* es capaz de inhibir cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp. y varios microorganismos psicrotrofos en alimentos; en leche cruda, activa el sistema lactoperoxidasa, produciendo hipotiocianato ( $\text{OSCN}^-$ ), oxiácidos ( $\text{O}_2\text{SCN}^-$  y  $\text{O}_3\text{SCN}^-$ ) y productos intermediarios de oxidación que tienen un amplio espectro de inhibición contra bacterias Gram negativas y Gram positivas.

El dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) es producido principalmente por la vía heterofermentativa de las BAL y a la concentración del 10% puede disminuir el recuento de bacterianas totales hasta un 50% y a concentraciones de 20-50% tiene una fuerte actividad antifúngica; asimismo, tiene un efecto antibacterial contra aerobias Gram negativas como es el caso de *Pseudomonas*.

El acetaldehído es producido por varias cepas de *Lactobacillus* y *Bulgaricus* mediante la acción de una treonina aldolasa, la cual transforma la treonina en acetaldehído y glicina; sin embargo, debido a que estas bacterias y *Streptococcus thermophilus* presentes en el yogurt no pueden metabolizar el acetaldehído, éste se acumula en el producto aumentando la concentración a 25 ppm y a concentraciones entre 10-100 ppm el acetaldehído inhibe el crecimiento de *S. aureus*, *S. typhimurium* y *E. coli* en productos lácteos<sup>22</sup>.

Los Lactobacilos también producen bacteriocinas, que son proteínas o complejos de proteínas, actúan formando poros en la membrana citoplasmática, provocando la salida rápida de metabolitos requeridos para la biosíntesis de la célula. En efecto, los péptidos se unen a la membrana citoplasmática a través de uniones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente, luego se insertan a la membrana con una reorientación que depende del potencial de membrana, el cual está influenciado por el pH y la composición fosfolípida. Los monómeros de bacteriocina forman agregados proteicos generando la formación del poro con la consecuente salida de iones (principalmente potasio y magnesio), pérdida de la fuerza motriz de protones (FMP), salida de ATP y aminoácidos, ocasionando la inhibición de la síntesis de macromoléculas y la producción de energía dando como resultado la muerte celular.

El género *Lactobacillus*, de difícil cultivo, es considerado como GRAS “Generalmente reconocido como seguro” (Generally Recognized as Safe, GRAS). Es un microorganismo probiótico debido a que tiene características que favorecen la salud humana, no tiene efectos negativos, es decir, es inocuo y,

además, colabora en la prevención de diferentes enfermedades humanas, así como en las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).

Las ETA son causadas principalmente por *Salmonella* y *Staphylococcus* y sus características patogénicas, modos de transmisión y alimentos en los cuales se encuentran han sido ampliamente documentados, así como, la importancia de *Lactobacillus* como agente antimicrobiano de microorganismos patógenos, entre ellos, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae*, considerados de gran importancia en la salud pública debido a los brotes de infecciones e intoxicaciones generados por el consumo de alimentos contaminados con estas bacterias. Teniendo en cuenta que no hay referencias respecto de la capacidad bactericida del probiótico en referencia, se hizo una investigación orientada a determinar el efecto del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* sp sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis*, buscando de esta manera una estrategia natural para combatir bacterias patógenas transmitidas por alimentos debido a la creciente resistencia a los antibióticos por parte de estas y al aumento de enfermedades causadas por dichas bacterias a nivel mundial.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material de estudio:

- Sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* sp. Obtenido de materia fecal de neonatos del Hospital Regional Docente de Trujillo
- Cultivo de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhi* proporcionados por el Laboratorio de Alimentos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.

### Obtención y transporte de la muestra fecal de neonatos (MFN).

Se tomó la muestra directamente del pañal con un hisopo previamente humedecido en SSFE tratando de obtener la mayor cantidad posible de material fecal. Las muestras fueron tomadas con el respectivo consentimiento y participación de los padres. Las muestras obtenidas se trasladaron al Laboratorio de Microbiología y Tecnología de Alimentos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo, para su respectivo procesamiento y análisis respectivo dentro de las tres primeras horas de recolectadas.

### Enriquecimiento de la MFN

Las muestras colectadas fueron sembradas en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS), para su respectivo enriquecimiento, luego se incubó a 37°C por 12 horas en condiciones de microaerofilia<sup>18</sup>.

### Aislamiento, selección e identificación de *Lactobacillus* sp

Luego del enriquecimiento de las muestras, estas se sembraron por estría en agar MRS, a pH 5.5, se incubó por 48 horas a 37°C en atmósfera de microaerobiosis entre 5-10% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)<sup>[42]</sup>. Los cultivos de *Lactobacillus* se seleccionaron teniendo como base la las características macroscópicas y microscópicas mediante tinción Gram, forma bacteriana, formación de esporas, prueba de la catalasa al 3%<sup>18</sup>.

Los cultivos puros fueron sometidos a las siguientes pruebas bioquímicas: producción de ácido y gas a partir de la glucosa, formación de H<sub>2</sub>S, producción de indol, prueba de oxidación-fermentación, fermentación de la glucosa que están indicadas en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology<sup>23</sup>.

#### • Producción de ácido, H<sub>2</sub>S y gas.

Los cultivos puros fueron sembrados en agar TSI, se incubó a 37°C en microaerobiosis por 24 horas; el cambio de color del medio de rojo a amarillo y negro y la presencia de gas se tomó como una reacción positiva.

#### ○ Fermentación de la glucosa

Los cultivos puros fueron sembrados en el medio de Oxidación-Fermentación (O/F) según Hugh y Leifson suplementado con glucosa<sup>13</sup>, se incubó a 37°C por 24 horas en microaerobiosis y las lecturas se realizaron por el viraje del indicador.

### Pruebas para determinar factores de virulencia

#### • Prueba de la gelatina nutritiva

Los cultivos puros fueron sembrados en medio Gelatina Nutritiva [44], se incubaron a 37°C por 24 horas en microaerobiosis. Posteriormente se colocaron los cultivos en refrigeración (5°C) por 2 horas y pasado este tiempo se realizó la lectura observándose si se produce licuefacción.

#### • Producción de hemolisinas

Los cultivos puros fueron sembrados por estría en agar MRS con sangre de carnero al 5% y se incubó a 37°C por 48h en condiciones de microaerobiosis. Luego se realizó la lectura observando la presencia de hemólisis.

#### Obtención del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* sp.

Los cultivos de *Lactobacillus* sp se inocularon en tubos de Caldo MRS, posteriormente se incubaron por 24 horas a 35-37°C en microaerobiosis. Pasado el tiempo de incubación cada cultivo se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos; y se almacenó en refrigeración (8 °C) para su uso posterior.

#### Pruebas de inhibición

Los ensayos de inhibición se harán con el sobrenadante de cada una de los *Lactobacillus* sp. identificados, y frente a los cultivos patógenos de *S. aureus*, *S. enteritidis* y *S. typhi* pertenecientes al Laboratorio de Microbiología y Tecnología de los Alimentos. El método utilizado fue el método de difusión en agar<sup>24</sup>. Para ello se vertió en cada placa una capa de Plate count Agar de doble concentración, seguidamente después de su solidificación se sirvió Plate count Agar a concentración simple. Posteriormente se sembró *S. aureus*, *S. enteritidis* y *S. typhi* (previamente incubadas en agar nutritivo durante 24 h a 37°C). Seguidamente, en cada placa que contenga los cultivos se abrieron pocillos, en los que se depositaron 50 µL del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* sp. Luego se incubaron por 24 horas a 37°C en condiciones de microaerobiosis, hasta detectar el crecimiento y la aparición de los halos de inhibición. Se detectará la inhibición del crecimiento por la presencia de un halo de inhibición alrededor del pozo y se consideró inhibición cuando la medida del halo sea mayor a 8mm de diámetro. El control negativo de inhibición de crecimiento se realizó con suero salino estéril.

#### Mantenimiento de cultivos

Los cultivos se mantuvieron en agar MRS inclinado (Merck) y se conservaron en refrigeración a menos de 10°C.

#### Análisis estadístico

Se realizó el análisis de Varianza ( $p = 0,05$ ).

## RESULTADOS

Las colonias seleccionadas para la identificación de *Lactobacillus* sp fueron aquellas de bordes regulares, blancas sin pigmentos, circulares, cremosas, convexas y con márgenes enteros, de consistencia mucosa, coincidiendo con la descripción del género *Lactobacillus*.

En cuanto a las características morfológicas y tintoriales, los siete cultivos aislados fueron bacilos Gram-positivos, con producción positiva de ácido a partir de glucosa, catalasa negativos, producción de indol, producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa y sulfuro de hidrógeno negativos (Tabla 1).

Respecto de las pruebas de virulencia, se encontró que no producen licuefacción de la gelatina, pero que eran  $\alpha$ -hemolíticos (Tabla 2).

Se observó que el cultivo de *Lactobacillus* 2 (LMA-2) y *Lactobacillus* 10 (LMA-10) no presentan inhibición frente al de *S. aureus*, a diferencia de *S. typhi* y *S. enteritidis* las cuales fueron inhibidas por todas los cultivos de *Lactobacillus* sp, ya que presentaron un halo de inhibición mayor a 8 mm; asimismo, que el mayor halo de inhibición se alcanzó frente a *S. aureus* (Fig. 1).

## DISCUSIÓN

Si se han logrado aislar siete cultivos de *Lactobacillus* sp., indica que este microorganismo es un miembro importante de la microbiota intestinal de los recién nacidos. Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores como Martín y colaboradores quienes han demostrado la presencia de bacterias ácido lácticas y la predominancia de *Lactobacillus* sp en la microbiota intestinal de neonatos, en donde estas bacterias tienen un papel protector para el recién nacido respecto a las enfermedades infecciosas intestinales<sup>26</sup>.

**Tabla 1:** Características morfológicas, tintoriales y bioquímicas de cultivos de *Lactobacillus* sp aislados heces de neonatos.

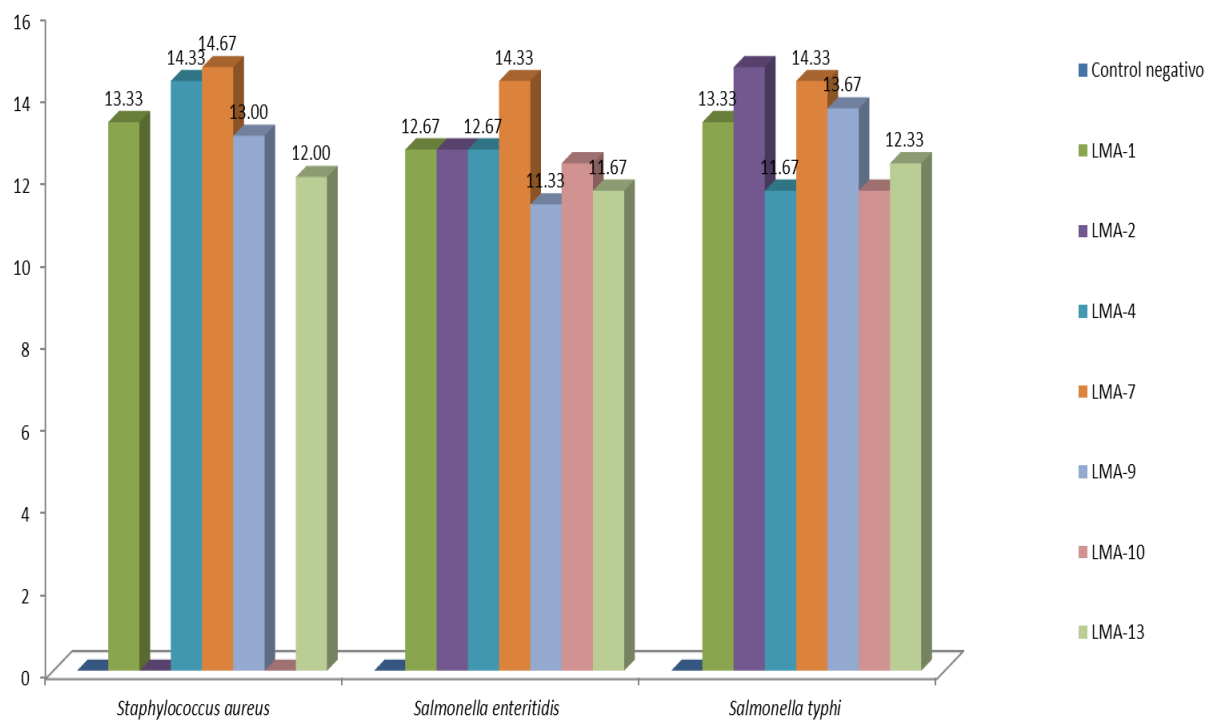
Cultivos de <i>Lactobacillus</i> sp	PRUEBAS DE VIRULENCIA	
	Gelatinasa	Hemolisis
LMA-1	-	-
LMA-2	-	-
LMA-3	-	-
LMA-4	-	-
LMA-5	-	-
LMA-6	-	-
LMA-7	-	-

+: Presencia, -: ausencia

**Tabla 2:** Pruebas de virulencia de cultivos de *Lactobacillus* sp aislados heces de neonatos.

Cultivos de <i>Lactobacillus</i> sp	Características morfológicas, tintoriales y bioquímicas						
	Esporas	Gram	Catalasa	Acidez	Gas	H <sub>2</sub> S	Oxidativo/ Fermentativo
LMA-1	-	+	-	+	-	-	Fermentativo
LMA-2	-	+	-	+	-	-	Fermentativo
LMA-3	-	+	-	+	-	-	Fermentativo
LMA-4	-	+	-	+	-	-	Fermentativo
LMA-5	-	+	-	+	-	-	Fermentativo
LMA-6	-	+	-	+	-	-	Fermentativo
LMA-7	-	+	-	+	-	-	Fermentativo

+: Reacción Positiva, -: Reacción negativa



**Fig 1:** Inhibición de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* por el sobrenadante de *Lactobacillus* sp mediante la técnica de la difusión en agar, según promedios. (el 0,2,4,.....16 representa el diámetro promedio de halo inhibición del sobrenadante del cultivo *Lactobacillus* sp (mm))

Al mismo tiempo, el hecho de que no se presentó licuefacción de la gelatina tras el tiempo de incubación de los cultivos de *Lactobacillus* en gelatina nutritiva, es concordante con lo que aparece dentro de la actividad gelatinasa en el manual Bergey's: "el género *Lactobacillus* no posee dicha actividad debido a que comúnmente no es patógeno".

La capacidad de generar sustancias antimicrobianas juega un rol significativo en la habilidad de los probióticos para competir con los microorganismos residentes a lo largo del tracto intestinal y modificarlo beneficiosamente, esto es corroborado con la investigación de Ouwehand quien demostró que el ácido láctico y las bacteriocinas producidas por las BAL crean un ambiente hostil que inhibe el crecimiento de algunas bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Shigella sonnei*<sup>13</sup>. En la presente investigación se corroboró tal apreciación, porque se presentó inhibición de *S. aureus*, *S. typhi* y *S. enteritidis* por el sobrenadante de *Lactobacillus* sp. mediante la técnica de la difusión en agar, más bien, es bueno hacer notar que los siete cultivos de *Lactobacillus* aislados de heces de neonatos presentan importante actividad antimicrobiana contra los microorganismos patógenos probados.

En concordancia con investigaciones previas, de los cultivos de *Lactobacillus* sp probados, el 71.42% mostraron actividad inhibitoria contra al menos dos de los microorganismos de prueba y el 28, 52% de los cultivos no inhibieron a *S. aureus*; es decir, el mayor efecto inhibitorio se presentó contra los cultivos de *S. typhi* y *S. enteritidis*, la primera de las cuales resultó ser la más sensible a los cultivos de *Lactobacillus* aislados mientras que el cultivo *S. aureus* presentó resistencia al no ser inhibida por los cultivos de *Lactobacillus* LMA-2 y LMA-10. Se sabe que las propiedades antagónicas que ocurren en el intestino por parte de *Lactobacillus* sp y los microorganismos son atribuidas a la acumulación de los productos finales de la fermentación, tales como, el ácido láctico, el dióxido de carbono, el peróxido de hidrógeno y a la producción de bacteriocinas<sup>47</sup>; entonces, si las

bacterias probióticas son metabólicamente activas durante su pasaje a través del intestino, es muy probable que se produzca alguna de estas sustancias<sup>18</sup>. Se considera que la reducción en el pH es el principal efecto inhibitorio debido a la producción de ácidos orgánicos<sup>19</sup>.

Al mismo tiempo, el hecho de que la mayor inhibición del crecimiento se presentó mayormente en las bacterias Gram negativas, coincide con los resultados de la actividad inhibitoria analizada por González y col. (2004). Esto posiblemente se pudo haber originado por metabolitos de bajo peso molecular los cuales pueden penetrar con facilidad la membrana exterior de la bacteria Gram negativa o por bacteriocinas siendo estas compuestos de alto peso molecular que inhiben el desarrollo de especies relacionadas con la cepa productora de estos compuestos<sup>25</sup>. Asimismo, si los cultivos LMA-2 y LMA-10 inhibieron el crecimiento de *S. typhi* y *S. enteritidis*, sucediendo lo contrario con *S. aureus*, significaría que quizá la cantidad y/o concentración de metabolitos producidos no fue lo suficientemente adecuada para provocar un daño celular e inactivación, o bien, los compuestos generados no le provocaron daño a *S. aureus*. Por esto, se sugiere para estudios posteriores la utilización de otro método o la utilización de agentes antimicrobianos como algún agente quelante (EDTA), HCl, o la combinación de bacteriocinas para el tratamiento de estos microorganismos ya que presentaron resistencia ante las BAL. También se puede optar por la acidificación del medio mediante la producción de ácido láctico y la disminución del pH, como lo sugieren estudios realizados<sup>27</sup>, en donde evaluó el efecto del ácido láctico, EDTA, KCN y HCl en la permeabilidad de la membrana de *E.coli* O157:H7, *S. typhimurium* y *P. aeruginosa*, obteniendo como resultado la desintegración de la permeabilidad de la membrana exterior.

Existen reportes que presentan estudios sobre la sensibilidad de microorganismos patógenos y/o deterioradores ante las BAL<sup>28,29</sup>. Los autores mostraron la actividad inhibitoria de cepas probióticas, donde la inhibición fue dirigida a ocho microorganismos patógenos (*S. typhimurium*, *S. paratyphi*, *S. enteritidis*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E.coli* O157:H7 y *Yersinia enterocolitica*); en este ensayo se utilizó la técnica de medición de halos de inhibición en placas de agar Luria inoculadas con los diferentes patógenos y como testigos se usaron el cloranfenicol y cultivos sin sobrenadante. De los cultivos analizados en el estudio mencionado anteriormente, los microorganismos patógenos con mayor sensibilidad a los compuestos generados por las cepas probióticas fueron *S. typhi* y *Yersinia enterocolitica* mientras que una cepa de *E. coli* O157: H7 fue la más resistente<sup>29</sup>.

Los resultados obtenidos en el presente estudio pueden deberse a las diferencias que existen entre las bacterias Gram positivas y negativas. Estas diferencias se basan en que las bacterias Gram negativas contienen aparte de la pared celular una membrana externa que actúa como barrera selectiva al paso de algunas sustancias (macromoléculas como las bacteriocinas o enzimas). Esta membrana consiste en una bicapa lipídica que contiene fosfolípidos (capa interna), lipopolisacáridos (capa externa) y proteínas que la atraviesan en todo su espesor y que delimitan poros hidrófilos (porinas) que permiten el paso de sustancias de bajo peso molecular por lo que la sensibilidad también es diferente<sup>28</sup>. Las BAL producen sustancias de bajo peso molecular las cuales pasan a través de las porinas afectando la permeabilidad de la membrana exterior hasta debilitarla o desintegrarla. Las sustancias que pueden generar este daño son la reuterina y el ácido piroglutámico al igual que la presencia de peróxido de hidrógeno, diacetilo y ácido láctico, tal y como lo revelan los estudios realizados por Alakomi y col. (2000)<sup>30</sup>, quienes observaron el efecto del ácido láctico en la permeabilidad de la membrana exterior de *E.coli* O157:H7, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium*, presentando como resultado la desintegración de la membrana exterior.

Se ha observado que cuando se adicionan compuestos como EDTA, HCl o KCN en combinación con bacteriocinas, estos proporcionan barreras que evitan el crecimiento de microorganismos patógenos en los alimentos<sup>30</sup>; para ello, se combinaron bacteriocinas (nisina y pediocina) con ácido láctico y EDTA en contra de *E.coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* de interés en la salud pública: para la primera la combinación nisina-EDTA disminuyó su crecimiento, mientras que para la segunda, la combinación pediocina-EDTA-nisina-ácido láctico, nisina-EDTA-ácido láctico, ácido láctico y nisina-pediocina-ácido láctico.

Aún no se sabe con exactitud qué compuesto o compuestos son los responsables de la inhibición de los microorganismos de prueba, por lo que es necesario realizar estudios posteriores, como la identificación de estos compuestos y de los *Lactobacillus* implicados, así como una purificación de las sustancias inhibitorias para determinar con mayor precisión si la actividad mostrada es por la acción de alguna bacteriocina o de algún otro compuesto producido por las BAL; sin embargo, los resultados

mostraron según las pruebas post hoc, de Tukey y Scheffe, que son pruebas que realizan todas las combinaciones posibles entre los diferentes tratamientos, demostrando de esta manera que el sobrenadante de los cultivos de *Lactobacillus* sp (LMA-4) y *Lactobacillus* sp 7 (LMA7) presentan mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *S. aureus*, mientras que el sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* sp 2 (LMA2) presenta mayor efecto inhibitorio frente al crecimiento de *S. typhi*, por lo cual se proponen como potenciales probióticos o agentes biocontroladores. Estos cultivos podrían ser investigados para su uso en el control de patógenos y microorganismos “deterioradores” en la industria de los alimentos. Además, es necesario continuar otros ensayos para demostrar los beneficios de estos microorganismos en la salud humana, para que puedan ser utilizados como probióticos.

## CONCLUSIONES

- El sobrenadante de los cultivos de *Lactobacillus* sp aislado de heces de neonatos mostró efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhi*, pero no sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.
- Las heces de neonato constituye una importante fuente de aislamiento de *Lactobacillus* con potencial probiótico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Salminen S, Bouley C, Bouton R, Cummings J, et al. Functional Food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr.* 1998; 80(1): 147
2. Hoier E. Use of probiotic starter cultures in dairy products. *Food Austr.* 1992; 44 (9):418-420.
3. Mattila S, Myllärinen R, Crittenden G, Mogensen R, et al. Technological challenges for future probiotic foods. *Int Dairy J.* 2002; 12:173-182.
4. Liévin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser J, et al. *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut.* 2000; 47: 646-52.
5. Fernández M, Boris S, Barbés C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol.* 2003; 94: 499-55.
6. McCracken V, Gaskins H. Probiotics and the immune system. *Probiotics: A Critical Review* ISBN 1-898486-15-8 .1999; pp.85-111.
7. Batista M, Miukiabe J. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. *J Pediat.* 2006; 86: 189-97
8. Guarner F, Malagelada J. Gut flora in health and disease. *The Lancet.* 2003; 360: 512-519.
9. Macfarle S, Dillon J. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol.* 2007; 102: 1187-1196.
10. Gibson G, Wang X. Regulator y effects of Bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J Appl Bacteriol.* 1994; 77: 412-20.
11. Mejía G. Obtención de cepas de Lactobacilos. Su caracterización (in vitro) como potenciales prebióticas. Tesis de Magister Scientiae en Biotecnología de Microorganismos, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. 2001.
12. Ouwehand A. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: *Lactic Acid Bacteria.* Edit Marcel Dekker, Nueva York.1993; pp.139-154.
13. Ried K. Gastrointestinal Health. The role of pro and pre-biotics in standard foods. *Clin Practic.* 2004; 33(4): 388-393.
14. Yang Z. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: Structures and properties University of Helsinki. Department of Food Technology. 2000; 9-13.
15. Sánchez O. Uso del permeado de suero suplementando en la producción de bacteriocinas y su aplicación en la bioconservación. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Querétaro. México. 2003; 5-15.
16. Holzapfel W, Wood B. Lactic acid bacteria in contemporary perspective, En: *The genera of lactic acid bacteria.* Gran Bretaña: Chapman and Hall Press. 1995; 1-5.
17. Lyhs U. Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. Food and Environmental Hygiene Department, Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki. 2002; 9-10.
18. Gonzales B; Gómez M; Jiménez Z. Bacteriocinas de probióticos. *Rev. Salud Pública y Nutrición.* 2003; 4(2): 17
19. Guglielmetti S, Tamagnini I, Minuzzo M, Arioli S, et al. Study of the adhesion of *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 to human intestinal cells. *Curr Microbiol.* 2004; 59:167-72.



20. Espinoza J. Aislamiento e identificación de *Lactobacillus* sp. de queso fresco y caracterización in vitro con potenciales prebióticos. Tesis Biólogo Microbiólogo. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2009.
21. Mac Faddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ra ed. Buenos Aires: Edit. Médica Panamericana; 2003.
22. Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr*. 2003; 143: 754-58.
23. Lindgren S, Dobrogoz W. Antagonic activities of Lactic Acid Bacteria in Food and Feed Fermentation. *FEMS. Microbiol. Rev.* 1990; 87: 149-164.
24. Ouwehand A, Kirjavainen P, Shortt C, Salminen S. Probiotics: mechanisms and establish effects. *Int. Dairy J.* 1999; 9: 43-52.
25. Carrasco M, Scarincini H, Simonetta A. Antibacterial Activity of Lactic Acid bacteria Isolated from Argentinian Dairy Products. *Aust J Dairy Technol.* 2002; 57(1): 15-19.
26. Klaenhammer T. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 1988; 70: 337-349.
27. Alakomi H, Skyttä E, Saarela M, Mattila S, Latva K, Helande I. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Biotechnology. Finland.* 2000; 165-185
28. Savadogo A, Ouattara C, Bassole I, Traore A. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. *Pakistan J Nutr.* 2004; 3(3): 174-179.
29. González M, Gómez T, Jiménez S. Bacteriocinas de probióticos. *Rev Salud Pub y Nut.* 2004; 4: 10-20.
30. Mendoza G, López G, Escuderm A. Efecto de la combinación de nisina, pediocina y ácido láctico sobre patógenos en alimentos. *Rev Salud Pública y Nut.* 2004; 32-35.