

ANTAGONISMO MICROBIANO DE *Lactobacillus plantarum* SOBRE *Salmonella spp.*

Barrón-González MP, Quiñones-Gutiérrez Y, Eguiarte Lara DJ,
Rodríguez-Garza RG

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Cuerpo Académico de Biología Celular y Genética. Ciudad Universitaria, Pedro de Alba S/N, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, CP.66455. maría.barrongn@uanl.edu.mx

RESUMEN: *Salmonella spp.* es considerada como una bacteria patógena de gran importancia debido a los múltiples brotes de intoxicación alimentaria de los cuales es causante, así como de infecciones gastrointestinales que afectan a los humanos. Recientes estudios de la OMS y la FAO revelan que estos microorganismos se están haciendo resistentes a múltiples fármacos, de ahí la gravedad del problema, por lo tanto, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para su tratamiento y control. Numerosos trabajos demuestran que las bacterias ácido-lácticas (BAL) consideradas como probióticos ayudan en el tratamiento y prevención de trastornos digestivos en el hombre al tener numerosas sustancias antimicrobianas específicas como ácido láctico, ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas. En este trabajo se midió la interferencia microbiana del Liofilizado de Medio Condicionado con *Lactobacillus plantarum* (LMCLp) a distintas concentraciones sobre *Salmonella spp.* Empleando los métodos espectrofotométricos y recuento bacteriano en placa, obteniendo como resultado la óptima inhibición a la dosis de 59.94 mg/mL. Los resultados que se obtuvieron se suman a las diversas investigaciones con probióticos encaminados al tratamiento de infecciones gastrointestinales y nos insta a investigar con mayor profundidad los metabolitos que se ven implicados en esta actividad inhibitoria presentes en el LMCLp y así obtener los tratamientos adecuados para controlar las enfermedades que se desarrollan con estos microorganismos.

INTRODUCCIÓN

En 1998 el ILSI (International Life Science Institute, de la Unión Europea) en Bruselas definió a los probióticos como “microorganismos vivos, que cuando son ingeridos en cantidades suficientes, tienen efectos beneficiosos sobre la salud, lo que va más allá de los efectos nutricionales convencionales”. Actúan benéficamente a una o varias funciones del organismo, proporcionan un mejor estado de salud y bienestar y/o reducen el riesgo de enfermedad. Pueden ser funcionales para la población en general o para grupos particulares de la misma. Hay que mencionar que, para ser considerada como probiótico, una bacteria tiene que sobrevivir el medio fuertemente ácido del estómago y colonizar el intestino delgado y grueso (15).

Se ha demostrado que *Lactobacillus casei* disminuye las enzimas relacionadas con cáncer de colon. Las enzimas β -glucuronidasa, nitroreductasa y ácido glicólico hidrolasa, incrementan la velocidad de conversión de células pro-carcinógenas a carcinógenas en el intestino, y a niveles elevados incrementan el riesgo de cáncer de colon. Estudios en humanos revelaron que después de consumir 10^{10} a 10^{11} UFC al día de una cepa de *L. casei* los niveles de dichas enzimas retornaron a la normalidad (21). En estudios con niños con diarrea aguda que fueron tratados con *L. casei* se encontró que se elevaron los niveles de varias inmunoglobulinas (<http://www.atcc.org>). Se ha observado que el *Lactobacillus Gorbach-Goldin* (1985), conocido, como *Lactobacillus GG* (LGG), es una cepa resistente al ácido y a la bilis, puede colonizar la mucosa intestinal, ha sido usado para manejar la diarrea en los niños. Se ha observado que estas bacterias se adhieren a las células intestinales, colonizan el tracto intestinal humano, son resistentes al ácido y la bilis, producen una sustancia antibiótica llamada piro-

glutamato. Los estudios realizados revelan que esta sustancia tiene un efecto beneficioso en la salud del ser humano (11).

Resultados descritos por Saad *et al.*, 2001, al estudiar la inhibición de *Escherichia coli* O157:H7 en queso minas (queso fresco típico de Brasil) con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, se encontró que las bacterias lácticas disminuyen significativamente la cantidad del patógeno. Se realizó un trabajo sobre la inhibición de *Salmonella enteritidis* var. *Typhimurium* en quesos frescos. Observándose que los probióticos ejercieron una inhibición transitoria en el desarrollo de salmonella en las diferentes concentraciones inoculadas. Estos resultados muestran un panorama alentador para el uso de los probióticos como estrategia para contribuir al logro de la inocuidad alimentaria, además de los efectos en la salud que ya se han demostrado (<http://eprints.uanl.mx/576/1/salmonella.pdf>).

En un estudio sobre la prevención de diarrea infecciosa en los niños admitidos en cuidados crónicos, una fórmula estándar infantil fue suplementado con dos cepas de bacterias probióticas (*Bifidobacteria bifidumand* y *Streptococcus thermophilus*). Niños con edades mayores de dos años aleatoriamente recibieron la fórmula con el suplemento probiótico o la fórmula estándar y fueron seguidos para observar el desarrollo de diarreas y el desarrollo de infección por rotavirus.

En los sujetos del grupo de probióticos desarrolló una proporción estadísticamente menor tanto en diarreas (7 % vs 31 %) como infección por rotavirus (10 % vs. 39 %) (20).

Un estudio efectuado en 49 niños con gastroenteritis por rotavirus asignados aleatoriamente para recibir *Lactobacillus G.G.*, los pacientes que recibieron LGG tenían una disminución en la duración de la diarrea, pero también mostraron un incremento significativo en el número de células secretoras de IgA contra el rotavirus. El mecanismo de este efecto inmunomodulador aún es desconocido (14). Sin embargo, recientemente se ha reportado un posible mecanismo de respuesta acerca de la interacción probióticos-células epiteliales (3) (ver Fig.4). Se ha encontrado en estudios que la bacteria probiótica *Lactobacillus salivarius* puede ser antagonista del *Helicobacter pylori*. Estudios *in vitro* han demostrado que inhibe la habilidad del *H. pylori* para colonizar la mucosa del estómago del ratón (12). En la práctica clínica, un ensayo clínico triple terapéutico con y sin la adición de *L. acidophilus* fue conducido entre 120 pacientes con *H. pylori*. Las tasas de erradicación fueron significativamente más altas (87 % contra 70 %) en el grupo suplementario con probióticos. Una evaluación más profunda es necesaria; sin embargo, estos resultados iniciales son prometedores(4).

Se han evaluado el efecto de diferentes tipos de cultivos probióticos en yogurt sobre poblaciones desconocidas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. Los dos tipos diferentes de yogurt comercial utilizados fueron: sin probióticos adicionados y con probióticos (*Lactobacillus casei* CRL-431 y *L. acidophilus* CRL-730). Se inoculó aproximadamente 10^9 UFC/mL de cada bacteria potencialmente patógena en los diferentes tipos de yogurt, se mantuvo en refrigeración a 4 °C durante la vida útil de cada uno de estos alimentos (aproximadamente 30 días) y se realizó un recuento bacteriano cada cuatro días incluyendo el mismo día de la inoculación. Los resultados obtenidos demuestran que, existe diferencia en cuanto a inhibición entre los yogures sin probióticos y el yogurt comercial con probióticos, observándose un efecto inhibitorio evidente, por parte del segundo sobre las poblaciones de *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*. Este estudio confirma el efecto antagonístico que poseen los cultivos probióticos sobre bacterias potencialmente patógenas para el ser humano y animales que pueden estar contenidas en alimentos (<http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid>).

En otros estudios se ha evaluado el efecto probiótico de *Bifidobacterium BLC* sobre el crecimiento de *Salmonella typhi* en helado. Se establecieron cuatro sistemas, tres de control y un sistema problema donde se agregaron ambas bacterias en muestras de 100 g de helado a una concentración final de 3×10^8 UFC/mL. Las muestras fueron incubadas en refrigeración (4 °C) y evaluadas a los 0, 5, 10, 15 y 20 días mediante recuento de UFC/g de las bacterias inoculadas. *Bifidobacterium BLC* reduce hasta

3 logaritmos la población inicial de *Salmonella typhi* y mantiene su población hasta los 20 días de evaluación. Esto permite concluir que el probiótico se constituye en una alternativa para proteger los alimentos refrigerados de la contaminación con *S. typhi* (www.facbio.unitru.edu.pe/index.php).

En experimentos realizados con *Giardia lamblia*, se ha demostrado que los factores extracelulares liberados por parte de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus johnsonii*, inhiben el crecimiento *in vitro* *Giardia lamblia* en la fase G1 impidiendo que se forme el quiste que es la forma infectiva (17). Por otra parte, en recientes estudios se ha demostrado la actividad antagonista de diversas bacterias ácido-lácticas como inhibidoras del crecimiento de diversas bacterias patógenas para el humano como *Listeria monocytogenes* (6), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus Beta-hemolíticos* (10), *Helicobacter pylori* (22), sin embargo existen escasos estudios acerca de la acción de bacterias ácido-lácticas sobre otros agentes causales de diarreas en el humano como es el protozoario parásito patógeno *Entamoeba histolytica*. Se evaluó en un estudio reciente la disminución en la evacuación de quistes en pacientes con amibiasis al suministrarles liofilizados de *Saccharomyces boulardii*, y en estudios *in vitro* se observó que al agregar el sobrenadante de cultivos de *Lactobacillus johnsonii* a los cultivos de *Giardia lamblia* (sinónimo: *Giardia intestinalis*) inhibió el crecimiento de este parásito (2).

En reciente investigación se realizó un estudio sobre la actividad antagónica de 6 cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas de pastizal de finca lechera. De las seis cepas de *L. plantarum* estudiadas las cepas 1, 20 y 37 inhibieron tanto a *Salmonella typhi* como a *Listeria monocytogenes*, mientras que la 4 y 58, lo hicieron exclusivamente con *Listeria*, cinco de las seis cepas de *L. plantarum* estudiadas mostraron capacidad antagónica, de las cuales, cuatro fueron por la producción de ácidos orgánicos. El comportamiento de *L. plantarum* 37 contra *Salmonella typhi* permite inferir sobre la presencia de una sustancia de naturaleza proteica estable al calor, pero frente a *Listeria*, sobre la existencia de un ácido orgánico, convirtiéndose en una cepa interesante, que debe seguir estudiándose con el objeto de establecer con mayor claridad los componentes de su sobrenadante (1).

Los estudios que se han hecho hasta ahora señalan que los probióticos pueden usarse como parte del tratamiento y prevención de algunos padecimientos, teniendo así, alternativas útiles para lograr el sano desarrollo de los individuos y mejorar la calidad de vida, pero se necesitan muchas más investigaciones en este campo para explotar al máximo los beneficios que nos pueden aportar los probióticos (<http://www.fepale.org/lechosalud/Revista>).

Las epidemias de infección intestinal por *Salmonella spp.* hoy en día son uno de los problemas más comunes en todo el mundo, principalmente en países en desarrollo. En México este tipo de infecciones es frecuente y principalmente en la región noreste del país, en donde las condiciones ambientales son propicias para el desarrollo de este microorganismo en alimentos, aunado al escaso control que se tiene en la manufactura y distribución de alimentos. El tratamiento de este agente es a base de fármacos, pero su uso tiene como desventaja la generación de resistencia por parte del microorganismo, así como la manifestación de efectos secundarios desfavorables en los pacientes. En este trabajo se busca demostrar la inhibición del crecimiento mediante la interferencia microbiana de *Lactobacillus plantarum* sobre *Salmonella spp.*

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar *in vitro* el efecto de los liofilizados del medio condicionado de *Lactobacillus plantarum* sobre el crecimiento de *Salmonella spp.*

Objetivos específicos

Bacterias

- a) Determinar la cinética de crecimiento de *Salmonella spp.* y de *Lactobacillus plantarum*
- b) Obtención del liofilizado del medio condicionado con *L. plantarum* (LMCLp)

Bioensayos

Determinar el antagonismo microbiano del LMC-Lp sobre *Salmonella spp.*

Realizar el análisis estadístico empleando el ANOVA $P < 0.05$, programa SPSS para Windows® 2007.

Determinar el valor CI50 del LMCLp contra *Salmonella spp.*

MATERIAL Y MÉTODOS

Métodos 3.1.1 *Lactobacillus plantarum*

Mantenimiento: A partir de una cepa que se mantiene en refrigeración a 4°C en el medio MPT-caldo, se inocula con una asada el medio MPT-caldo para el cultivo de probióticos alicuotados en tubos de 5mL, el cual procedió a incubarse a 37 por 17 h.

Cinéticas de crecimiento de *L. plantarum*: Se dispone de 9 tubos con tapón de rosca conteniendo 5mL de MPT-caldo, y frente al mechero, se inoculan con 50 µL de cultivo de la cepa probiótica para después incubarse en un baño de agua a 37 °C y cada hora se realizan las lecturas de absorbancia empleando un espectrofotómetro (Spectronic Genesis) a una longitud de onda de 635nm durante un lapso de 10 h, se registra y grafica cada lectura.

Obtención de Medio Condicionado con *L. plantarum* (MCLp): Después de 9 horas de incubación de la cepa de *L. plantarum*, se agrega un inoculó de 10 mL a 2 litros del medio MPT para bacterias y se incuba 24 h a 37°C, posteriormente se centrifuga a 2500 rpm por 20 min. empleando recipientes de plástico de 250 mL, inmediatamente se somete a un proceso de prefiltración con bomba de vacío empleando filtros Whatman no.1 con matraz Kitasato de 1000 mL. Después se realiza una segunda centrifugación a 2500 rpm por 20 min. empleando tubos cónicos, a continuación, se filtra por duplicado empleando filtro Millipore de 0.22 µm. Posteriormente se realiza una prueba de esterilidad, tomando un alícuota y colocándola en MPT-caldo e incubándolo a 37°C/24 h, cuando la prueba resulta positiva para esterilidad el sobrenadante obtenido se emplea como medio condicionado con *L. plantarum* (MCLp). Se almacena a 4°C por 1 día, a -20 °C por 4 días y a -70 °C por 15 días hasta su liofilización.

Obtención del liofilizado del MCLp. El Medio Condicionado con *L. plantarum* (MCLp) se almacena a 4°C por 1 día, a -20°C por 4 días y a -70 °C por 15 días y se procede a liofilizar empleando un equipo Labconco a 0,133 mBar a una temperatura programada de -46 °C, mediante este proceso se obtienen 8,35 g del liofilizado los cuales se diluyen en 15 mL de agua desionizada pH 7 en condiciones de esterilidad, posteriormente se filtra la solución con filtros millipore de 0,22 µm. se almacena hasta su uso y se realizan pruebas de esterilidad.

Preparación de la solución madre del (LMCLp). Se pesan 5 gramos del (LMCLp) y se disuelven bajo condiciones de esterilidad en 10 mL de agua desionizada estéril pH 7, se esteriliza empleando filtro millipore 0,22 µm, se somete a prueba de esterilidad. Una vez que la prueba de esterilidad resulta positiva la solución madre se almacena a 4 °C hasta su uso. A partir de esta solución madre se obtienen las concentraciones de 1,10, 50, 70 y 200 mg/ml.

Salmonella spp.

Mantenimiento. A partir de una cepa que se mantiene en refrigeración a 4°C, se hacen resiembras sucesivas en tubos de 13x100mm de borosilicato con tapón de rosca, que contenían 5mL de caldo nutritivo a los cuales se les inocula con 30 µL de la cepa, enseguida se incuban a 37°C por 24 h.

Cinética de crecimiento: Se dispone de 9 tubos de borosilicato de 13x100 con tapón de rosca, los cuales contienen 5 mL de caldo nutritivo, se inoculan con 30 µL de *Salmonella spp.*, la cual previamente se reactivó por dos resiembras sucesivas con el mismo volumen de inoculo, enseguida se incuban en un baño de agua a 37 °C y cada hora se realizan las lecturas de absorbancia a 635nm durante un lapso de 24 h, se registra y grafica cada lectura. Este ensayo se realiza efectuando tres eventos independientes por triplicado.

Bioensayos

Método espectrofotométrico: Se realizó el bioensayo conforme a la Tabla III y enseguida se incubaron a 37 °C por 5 h, se realizaron las lecturas de absorbancia a 570nm, e inmediatamente se registraron y graficaron las lecturas. Este ensayo se realizó efectuando tres eventos independientes por triplicado.

Método de Recuento Bacteriano en Placa (RPB): Después del periodo de incubación se escoge un tubo con la dosis seleccionada de acuerdo a los resultados y se plaquean por triplicado cada una de las concentraciones en diluciones de 10^{-1} a 10^{-10} , las cajas Petri inoculadas, se incuban a 37 °C por 24 h, y posteriormente se realiza el conteo de placas.

Determinación del CI50 del LMCLp contra *Salmonella spp.* mediante PROBIT: Este método se basa en la cuantificación de la vulnerabilidad de los individuos ante efectos físicos de una magnitud determinada que se suponen conocidos. El método consiste en la aplicación de correlaciones estadísticas para estimar las consecuencias desfavorables sobre la población u otros elementos vulnerables para los distintos niveles o dosis de los estímulos. La respuesta de una población ante un fenómeno físico se distribuye según una ley log-normal. El modelo es aplicable solo para aquellos fenómenos de los que se dispone de la "ecuación Probit" (9). Las absorbancias de los bioensayos que se obtuvieron de cada una de las dosis del LMCLp sobre *Salmonella spp.* se analizaron de acuerdo con el programa PASW Statistics 18.

Análisis estadístico: Para determinar *in vitro* el efecto del Liofilizado de Medio condicionado con *Lactobacillus plantarum* (LMCLp) sobre el cultivo de *Salmonella spp.*, los bioensayos se realizan mediante tres eventos independientes por triplicado, los resultados se analizan mediante el Análisis de varianza con un $P < 0.05$ empleando el paquete estadístico SPSS para Windows 2007

RESULTADOS

Lactobacillus plantarum

Cinética de crecimiento mediante el método indirecto de turbidez: En la Figura 1 se observa la cinética de crecimiento de *L. plantarum* la cual no presenta fase de adaptación, inicia desde las primeras horas con una fase logarítmica teniendo su máximo rendimiento hasta la hora 9 con una lectura aproximada de 1,2 nm, a partir de esta hora comienza una ligera fase estacionaria. Durante las primeras 8 horas se puede observar entre cada lectura una marcada diferencia significativa, sin embargo, entre las lecturas de la hora 9 y 10 no presentan diferencia significativa.

Salmonella spp.

Cinética de crecimiento mediante el método indirecto de turbidez: En la Figura 2 se observa la cinética de crecimiento de *Salmonella spp.* A la primera hora de crecimiento se observa una ligera fase de adaptación, seguida de la fase logarítmica la cual se extiende hasta la hora 4 con aproximadamente 1.01 de absorbancia, inmediatamente se observa acortamiento en la fase logarítmica, pero sí se observa ligero aumento en la absorbancia con aproximadamente 1,1 absorbancia. Durante las primeras 4 horas de crecimiento de *Salmonella spp.* sí se observa marcada diferencia significativa entre los puntos de lectura. De la hora 4 a la hora 10 de crecimiento se observa una ligera diferencia significativa, aunque si se incrementó el valor de la absorbancia. Analizando esta gráfica se puede afirmar que las células de *Salmonella spp.* se encuentran viables y en condiciones de crecimiento favorable.

Bioensayo

4.3.1 Actividad biológica de LMCLp contra *Salmonella spp.*

Método de Turbidez: En la Figura 3 se muestra la lectura de absorbancia de las concentraciones 1, 10, 50, 70 y 200 mg /mL y el control a las 5 horas de incubación. Podemos observar que las dosis, muestran un marcado efecto inhibitorio en descenso al ir reduciendo gradualmente la población celular de *Salmonella spp.* en comparación con el control. Dicho efecto inhibitorio se aprecia a partir de

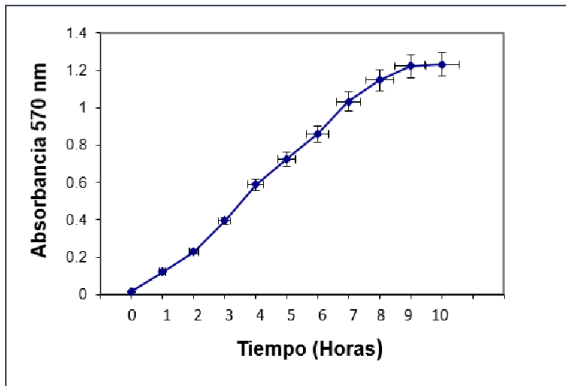


Figura 1. Cinética de Crecimiento de *Lactobacillus plantarum*.

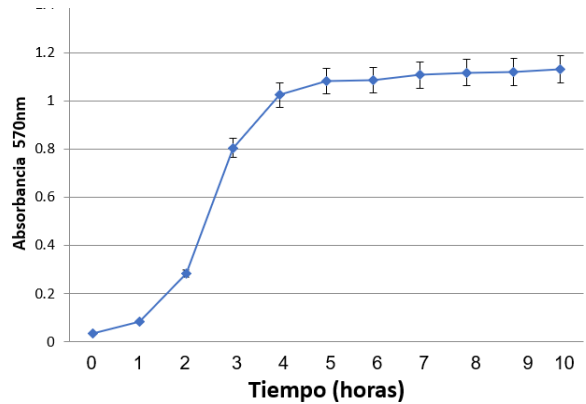


Figura 2. Cinética de crecimiento de *Salmonella* spp.

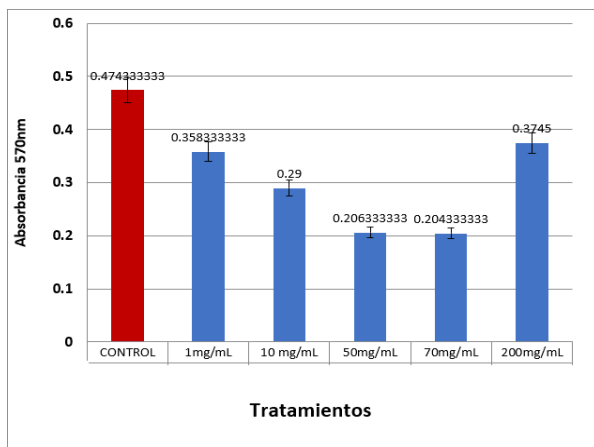


Figura 3. Actividad biológica de LMCLp contra *Salmonella* spp.

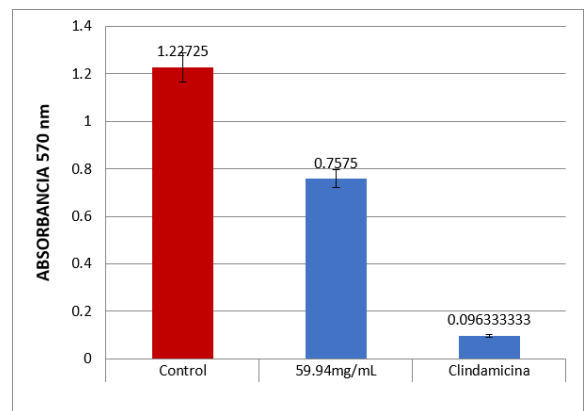


Figura 4. Evaluación de la concentración CI50 de LMCLp sobre *Salmonella* spp.

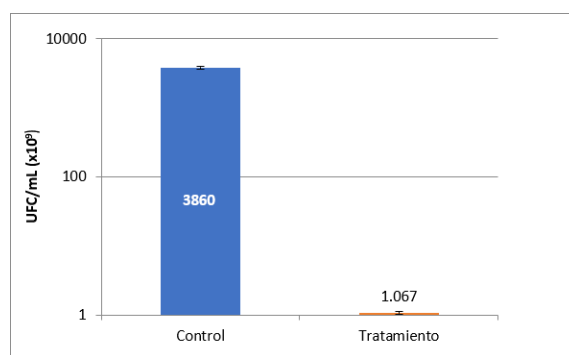


Figura 5. Comparación de las UFC/mL de *Salmonella* spp con respecto al control y bajo el Tratamiento.

la concentración de 1mg/mL, siendo mejor la inhibición del rendimiento celular al emplear 10 mg/mL, estas dos concentraciones presentan una diferencia significativa entre sí, y también con respecto al control, de una manera más evidente la inhibición del rendimiento celular es muy marcada al emplear la concentración de 50 mg/mL obteniéndose una inhibición de aproximadamente 58 % y al emplear la concentración de 70 mg/mL la inhibición es muy similar con aproximadamente 0,2 de absorbancia,

estas dos concentraciones no presentan diferencia significativa entre sí, pero con respecto a las concentraciones de 1 y 10 mg/mL y el control sí presentan muy marcada diferencia significativa (ANOVA $P < 0.05$); todo lo contrario a esto la dosis 200 mg/mL fue la menos efectiva con respecto al control, dando a evidenciar que a mayor dosis no se logra la inhibición deseada.

Evaluación de la CI50 de LMCLp sobre Salmonella

Se realizó el análisis de datos relacionados a la Figura 3, mediante el paquete estadístico PROBIT y los resultados se presentan en el Anexo I. En la Figura 4 se muestran las lecturas de absorbancia del control, del Tratamiento con la concentración CI50 y del antibiótico clindamicina sobre *Salmonella spp.* Donde observamos una muy buena inhibición de crecimiento del Tratamiento guardando una relación aproximada del CI50 con respecto al control además de apreciar un marcado descenso por parte del antibiótico esto demuestra que las células son sensibles a este.

Determinación de UFC/mL a la CI50 LMCLp por el Método de RBP

En la figura 5 y Tabla 1 se muestra los valores e imágenes respectivamente de UFC/mL de *Salmonella spp.* en el control y con el tratamiento; en el control se obtuvieron $3,860 \times 10^9$ UFC/mL y al aplicar una concentración de 59,94 mg/mL (CI50 LMCLp) se obtuvieron 1.067×10^9 UFC/mL.

DISCUSIONES

Los probióticos producen numerosas sustancias antimicrobianas específicas como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas;

Tabla 5. Comparación de las UFC/mL de *Salmonella spp.* con respecto al control y bajo el Tratamiento a la concentración de 59.94 mg/mL de LMCLp.

Condición del Bioensayo	UFC / mL
Control	$3.860.000 \times 10^9$
Tratamiento (LMCLp) [59.94 mg/mL]	1.067×10^9
Clindamicina	0.0

compuestos que reducen el número de células viables, afectan el metabolismo bacteriano o la producción de toxinas de diferentes bacterias patógenas como *E. coli*, *Streptococcus* y *Salmonella* (7).

Según Saloff-Coste, *L. plantarum* resiste niveles bajos de pH y es capaz de sobrevivir a las concentraciones de bilis del intestino produciendo un ambiente ácido que evita el crecimiento bacteriano, en este trabajo se demostró la capacidad inhibitoria de los factores extracelulares o metabolitos secundarios de *L. plantarum*, que se ha demostrado que estas sustancias inhiben el crecimiento de bacterias patógenas por acción antagonica (8).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la capacidad de interferencia microbiana del Liofilizado de medio condicionado con *L. plantarum* sobre *Salmonella spp.*, mostrando una mayor capacidad inhibitoria sobre *Salmonella spp.* a la concentración de 59,94 mg/mL. En la Figura 3 se muestran los resultados de la inhibición del crecimiento de *Salmonella spp.* a las 5 h de incubación en presencia de liofilizado del medio condicionado con *Lactobacillus plantarum*. En la Figura 3 se observa que las dosis aplicadas (1, 10, 50, 70, 200 mg /mL), muestran un marcado efecto inhibitorio en descenso

al ir reduciendo gradualmente la población celular de *Salmonella spp* en comparación con el control. Dicho efecto inhibitorio se aprecia a partir de la concentración de 1mg/mL, siendo mejor la inhibición del rendimiento celular al emplear 10 mg/mL, estas dos concentraciones presentan una diferencia significativa entre sí, y también con respecto al control, de una manera más evidente la inhibición del rendimiento celular es muy marcada al emplear la concentración de 50 mg/mL obteniéndose una inhibición de aproximadamente 58 % y al emplear la concentración de 70 mg/mL la inhibición es muy similar, estas dos concentraciones no presentan diferencia significativa entre sí, pero con respecto a las concentraciones de 1 y 10 mg/mL y el control sí presentan muy marcada diferencias significativa (ANOVA $P < 0.05$); todo lo contrario, a esto la dosis 200 mg/mL fue la menos efectiva con respecto al control, dando a evidenciar que a mayor dosis no se logra la inhibición deseada. Sin embargo, comparando estos resultados con la droga de clindamicina se observa marcada diferencia significativa (Figura 4).

Los resultados aquí obtenidos muestran una clara tendencia a la inhibición del crecimiento de *Salmonella spp.*, además de que se apega a las necesidades que ha externado recientemente la OMS, en donde está recomendado la búsqueda de agentes biocidas a través de Terapias de Interferencia Microbiana (TIM) empleando derivados de microorganismos inoocuos al humano, como es el caso de *Lactobacillus plantarum*. (5).

Lactobacillus plantarum es componente normal del microbiota intestinal en los individuos sanos. El efecto antagonista de este probiótico sobre *Salmonella spp*. Sugiere que la ecología microbiana en el intestino puede ser modulada a través de la administración de este probiótico el cual podría ser considerado en la prevención o tratamiento de la salmonelosis, a través de mecanismos antagónicos aún desconocidos (Khin H.,2008). El uso de antibióticos puede alterar, de manera importante nuestro microbiota intestinal nativa, por lo menos temporalmente. Los probióticos serían una alternativa viable para minimizar esta alteración. Se ha reportado que *L. plantarum* reduce la duración o severidad de las enfermedades al igual que la longitud de la propagación rotaviral en las deposiciones, por otra parte, cuando se suministra este probiótico se reduce la incidencia de diarreas agudas en grupos de alto riesgo como niños hospitalizados o niños pequeños que asisten a guarderías (23)

El efecto inhibitorio de las bacterias ácido lácticas como lo es *Lactobacillus plantarum* aquí estudiada puede atribuirse a su capacidad para producir sustancias como las bacteriocinas, las

cuales pudieron haber quedado suspendidas en el medio condicionado que fue liofilizado, estos péptidos pueden provocar actividad antimicrobiana (interferencia microbiana) por diversos mecanismos que incluyen desestabilización de la membrana, lisis celular, degradación como ácidos nucleicos e inhibición de procesos biológicos como síntesis de proteínas, ADN, ARN y peptidoglicano. Lo que invita a estudiar estas bacterias probióticas, sus metabolitos y sus efectos benéficos en contra de bacterias o parásitos causantes de enfermedades al hombre (1).

Además, aunque resulta relativamente sencillo determinar el pH, este no se considera como un parámetro 100 % confiable para presumir la inhibición del crecimiento de algunos microorganismos, ya que solo es la ilustración parcial de la concentración de ácidos débiles en un medio y puede que algunos compuestos no se disocien en función del pH (18). Los resultados aquí obtenidos dan evidencia de que *Lactobacillus plantarum*, exhibe una muy buena capacidad inhibitoria sobre el cultivo *in vitro* de *Salmonella spp*, lo que podría ser una alternativa para el tratamiento o prevención de la salmonelosis en lugar de los fármacos actualmente utilizadas y así evitar los efectos colaterales que dichas drogas provocan en los pacientes además actualmente los microorganismos están generando múltiples mecanismos de resistencia a estas sustancias, este hecho destaca la importancia de este trabajo.

CONCLUSIONES

El liofilizado de medio condicionado con *Lactobacillus plantarum* inhibe el crecimiento *in vitro* de *Salmonella sp*

BIBLIOGRAFIA

1. Alvarado-Rivas CC, Díaz-Rivero CG. Efecto antagonístico de *Lactobacillus plantarum* aislado de pastizal de finca lechera, Revista Electrónica de Salud Pública Y Nutrición. 2009; II (1): 1-7.
2. Barrón-González MP, Serrano-Vázquez GC, Villarreal-Treviño L, Mata-Cárdenas BD, Verduzco-Martínez JA & Morales-Vallarta MR. Acción inhibitoria de probióticos sobre el crecimiento axénico in vitro de *Entamoeba histolytica*. Revista Electrónica De Salud Pública y Nutrición 2008; II (2):1-9.
3. Bron PA, Lee I-C, Marco ML, Wels M, van Bokhorst-van de Veen H Bron PA, et al. Modulation of *Lactobacillus plantarum* Gastrointestinal Robustness by Fermentation Conditions Enables Identification of Bacterial Robustness Markers. PLoS ONE. 2012; 7(7): e39053. DOI: 10.1371/journal.pone.0039053.
4. Canducci Rarmuzzi A, Cremonini F. A liophilized and inactivated culture of *Lactobacillus acidophilus* increases *Helicobacter pylori* eradication rates. Aliment Pharmacol Ther. 2000; 14:1625-9.
5. De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. Probiotics: Compensation for Lactase Insufficiency. Am J Clin Nutr. 2001; 73:421.
6. De Waard RJ, Garssen G, Bokken and JG. Vos. Antagonistic activity of *Lactobacillus casei* strain shirota against gastrointestinal *Listeria monocitogenes* Infection In Rats. Int. J. Food Microbiol. 2002; 73:93-100.
7. Escudero-Abarca BI & Sanchez-Ezquivel S. Bacteriocinas de bacterias lácticas: biosíntesis y transporte. Revista de educación bioquímica. 2002; 21(1): 12-20.
8. Ezendam J, van Loveren H. Probiotics: immunomodulation and evaluation of safety and efficacy. Nutrition Reviews. 2006; 64(1):1-14.
9. Ferrán Aranaz M. SPSS para Windows. Análisis Estadístico. Editorial Mcgraw-Hill Interamericana de España. Impreso en España. 2001: 255-264.
10. Glück U & Jan-Olaf G. Ingested probiotics reduce nasal colonization with pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and beta-hemolytic streptococci). Am. J. Clinical Nutrition. 2003; 77:517-520.
11. Hilton E, Kolakowski R, Singer C, Smith M. Efficacy Of *Lactobacillus Gg* As A Diarrheal Preventative In Travelers. J Travel Med. 1997; 4: 41-3.
12. Kabir Am, Aiba Y, Takagi A. Prevention Of *Helicobacter pylori* infection By *Lactobacilli* In A Gnotobiotic Murine Model. Gut. 1997; 41:49-55.
13. Majamaa H, Isolauri E, Saxelin M. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. Pediatr Gastroenterol Nutr. 1995, 20:333-8.
14. Marquina D & Santos A. Probióticos, Prebióticos Y Salud. Universidad Complutense Departamento de Microbiología Facultad de Biología Madrid. 1998.
15. Saad SMI, Vanzin C, Oliveira, M.N. & Franco, B.D.G.M., (2001). Influence of lactic acid bacteria on survival of *Escherichia coli* O157:h7 in inoculated minas cheese during storage at 8.5°C. J Food Protect. 64(8):1151-1155.
16. Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, (1994). Feeding of *Bifidobacterium bilidurn* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. Lancet; 344: 1046-9.
17. Saloff-Coste. Cathy J. Health benefits of fermented milks and probiotics: An overview. Danone World Newsletter. <http://www.danonenewsletter.fr/nw15.html>.
18. Sgouras D, Maragkoudakis P, Petraki K, Martínez-González B, E. Michopoulos, G. Kalantzopoulos, E. Tsakalidou and A. Mentis. (2004). In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain shirota. Appl. Environ Microbiol. 70:518-526.
19. Tojo-Sierra, R., R Leis-Trabazo y R Tojo-González, (2001). Alimentos funcionales o nutracéuticos. Revista Española de Pediatría, Volumen 57, 03 -12.

[www. Eprints.Uanl.Mx/576/1/Salmonella.Pdf](http://www.eprints.uanl.mx/576/1/Salmonella.Pdf)

[www. pearlslife.eu/history/index.php?locale=eswww.atcc.org](http://www.pearlslife.eu/history/index.php?locale=eswww.atcc.org)

www.corpoica.org.co/sitioweb/documento/jatrophacontrataciones/analisisbromatologico.pdf

www.facbio.unitru.edu.pe/index.php?option=com...task... www.fepale.org/lechosalud/revista %20mlms %20 %20 %ba3 %20html/07 %20articulos %20mexico.Htm

www.inta.cl/Consumidor/Probioticos.Htm www.Medicinenet.Com/Salmonella/Page3.Htm#Treated www.Scielo.Org.Ve/SciELO.Php?Pid=S000406222007000100007&Script=Sci_Arttext www.vidasana.es/2009/02/probioticos-parte-1-que-son-y-que-hacen/