

Capacidad probiótica preliminar de bacterias ácido lácticas aisladas de diferentes fuentes

Antonia Alelí Vázquez-Ortiz, Alfredo Vázquez-Ovando*, Sonia Ruiz-González, Gemelli López-Martínez, María Guadalupe De Gyves-Córdova, José David Mejía-Reyes

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

Resumen

El consumo regular de bacterias probióticas resulta en beneficio de la salud. Los objetivos de este estudio fueron primeramente aislar bacterias ácido lácticas (BAL) de diversas fuentes y evaluar su capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, y posteriormente caracterizar preliminarmente su capacidad probiótica junto a 9 cepas aisladas de trabajos previos. De este estudio, se aislaron 34 cepas de diferentes fuentes en agar MRS, de las cuales 16 fueron catalasa y oxidasa negativas y Gram positivas. A estas cepas se les evaluó su capacidad para inhibir a *Salmonella* sp. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. El total de las cepas presentó actividad antibacteriana. Las cepas que mostraron actividad antimicrobiana inhibieron a uno o más patógenos. La cepa IAMm4 destacó por inhibir a los cuatro patógenos, además de obtener el valor más alto del halo de inhibición contra *S. aureus* (25.37 mm). Similarmente, la cepa TEJ10m3 exhibió un halo de 24.37 mm contra *Salmonella* sp. y la cepa AGCm3 un halo de 24.47 mm contra *E. coli*. Además de las 16 cepas aisladas se incluyeron 6 cepas aisladas en un trabajo previo. A las 25 cepas se evaluó su capacidad para crecer a pH 6.5, 3.0 y 2.5 y la susceptibilidad a antibióticos. Las cepas CM4.C2.2 y FM4.CI.2, logran sobrevivir a pH 3.0 y las cepas AGCm3 y QM2C1 lograron sobrevivir a pH 2.5. Para ninguno de los antibióticos empleados se observó resistencia en el total de las 25 cepas evaluadas. Estos resultados demuestran que las cepas pueden ser usadas como potenciales probióticos. Estudios complementarios pueden ayudar a clarificar la naturaleza probiótica, así como la identidad de las cepas aquí presentadas.

Palabras clave:

Listeria monocytogenes
Resistencia a antibióticos
Salmonella sp.
Staphylococcus aureus
Tolerancia a pH

Keywords:

Listeria monocytogenes
Resistance to antibiotics
Salmonella sp.
Staphylococcus aureus
pH tolerance

Preliminary probiotic ability of lactic acid bacteria isolated from several sources

Abstract

Regular consumption of probiotic bacteria results in health benefits. The objectives of this study were: firstly, to isolate lactic acid bacteria (LAB) from various sources and evaluate their ability to inhibit the growth of pathogenic bacteria, and secondly to preliminarily characterize their probiotic capacity together with 6 strains isolated from previous work. From this study, 34 strains were isolated from different sources on MRS agar, of which 16 were catalase and oxidase negative and Gram positive. These strains were evaluated for their ability to inhibit *Salmonella* sp. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. All the strains showed antibacterial activity inhibited one or more pathogens. The IAMm4 strain stood out for inhibiting the four pathogens, in addition to obtaining the highest value of the inhibition diameter against *S. aureus* (25.37 mm). Similarly, strain TEJ10m3 exhibited a diameter of 24.37 mm against *Salmonella* sp. and the AGCm3 strain a diameter of 24.47 mm against *E. coli*. In addition to the 16 isolates, 6 isolates from a previous study were included to assess their ability to grow at pH 6.5, 3.0 and 2.5 and their susceptibility to antibiotics. The CM4.C2.2 and FM4.CI.2 strains managed to survive at pH 3.0 and the AGCm3 and QM2C1 strains managed to survive at pH 2.5. For none of the antibiotics used, resistance was observed in the total of the 25 strains evaluated. These results demonstrate that the strains can be used as potential probiotics. Complementary studies can help to clarify the probiotic nature, as well as the identity of the strains.

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,
Universidad Autónoma de
Chiapas.
Boulevard Príncipe Akishino
sin número, Colonia
Solidaridad 2000, CP.
30798.
Tapachula, Chiapas, México.
Teléfono: + 52 9626427972.
Correo-electrónico:
jose.vazquez@unach.mx

1. Introducción

Las bacterias ácido lácticas (BAL) desempeñan un papel importante en los sectores alimentarios, agrícolas y clínicos (Szutowaska y Gwiazdowska et al., 2021). Este grupo de bacterias incluye a cuatro géneros que son las más ampliamente utilizadas, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (Zheng et al., 2020). Su actividad metabólica consiste en utilizar el azúcar disponible para producir además de los metabolitos primarios una serie de metabolitos secundarios entre los que se encuentran los de naturaleza antimicrobiana como ácidos orgánicos (principalmente ácido láctico y acético), diacetaldehído, reuterina y bacteriocinas (Lavermicocca et al., 2021). Muchas de las BAL son consideradas bacterias probióticas, principalmente aquellas que han demostrado alto potencial para ejercer efectos benéficos para la salud humana (Dos Santos et al., 2021). Dentro de los principales beneficios, se ha reportado que ayudan a la reducción del pH en el intestino, producen enzimas digestivas, recolonizan y restablecen la biota intestinal, producen péptidos bioactivos, mejoran la absorción de calcio, son resistentes al ácido y la bilis además de estimular la respuesta inmune del hospedador e influir en actividades metabólicas tales como la producción de vitaminas y asimilación de colesterol (Lemme et al., 2021). Sin embargo, su uso también supone una preocupación y es referente a la transmisión de genes de resistencia a antibióticos hacia bacterias patógenas en el intestino; por lo tanto, es altamente deseable que los probióticos sean sensibles a los antibióticos prescritos comúnmente en baja concentración (Fernández-Roblero et al., 2020).

En la actualidad, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), ocasionan problemas de salud a nivel mundial, ya que alrededor del 70% de las diarreas se originan por la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos (Zúñiga et al., 2017). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, en el mundo, la incidencia anual de diarreas es de 1 500 millones de casos, y 3 millones de niños menores de cinco años mueren anualmente por esta misma causa (Olea et al., 2019). Las especies de microorganismos más comúnmente implicadas en estos casos son *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. (Bai et al., 2021). Ante el problema de resistencia a los antibióticos, las BAL probióticas son una opción viable para controlar patógenos, por lo que existe una búsqueda constante de este tipo de microorganismos.

La búsqueda de tales probióticos ha llevado a que sean aislados de diversas fuentes, principalmente de alimentos y bebidas fermentados, frutas y vegetales (Swain et al., 2014). Verón et al. (2017) aislaron a partir del jugo de nopal fermentado 17 BAL y reportan que la mayoría de las cepas fueron resistentes a pH 3, pero solo 3 cepas (S-22, S-811 y S-TF2) sobrevivieron a pH 2. Del mismo modo, Sakandar et al. (2019) aislaron tres cepas de BAL de frutas (melocotón, plátano y kiwi) y cinco de flores (girasol, narciso, rosa amarilla y rosa rosa); todas las cepas mostraron

supervivencia a los diversos niveles de pH probados (2, 2.5, 3 y 7.4). También se reporta que *L. kunkeei* presenta elevada tolerancia a las sales biliares mientras que *L. plantarum* ATCC 14917 exhibe tolerancia media (Sakandar et al., 2019). Los entornos relacionados con las abejas melíferas (*Apis mellifera*) también han sido fuente de BAL con potencial probiótico; Bulgasem et al. (2016) aislaron 25 BAL de muestras de miel, cuatro de estas cepas mostraron actividad antimicrobiana contra *Candida* spp. y se identificaron como *Lactobacillus plantarum*, *L. curvatus*, *Pediococcus acidilactici* y *P. pentosaceus*. Hamdy et al. (2017) aislaron dos cepas de BAL (N4 y N5) a partir del intestino de abeja y miel, éstas cepas demostraron ser termo y halo tolerantes, además que exhibieron resultados prometedores en las pruebas de tolerancia a condiciones ácidas, alcalinas, sales biliares y pancreáticas, prueba de susceptibilidad a antibióticos. Karami et al. (2017) evaluaron el efecto antagonista de BAL aisladas de productos lácteos y reportan efecto inhibitorio contra *S. aureus*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* con halos de inhibición mayores a 15 mm. Falfán-Cortés et al. (2022) aislaron cepas de BAL con actividad antagonista contra *L. monocytogenes* y *S. aureus*, las cepas con mayor actividad antagonista fueron nueve aislados de muestras de pulque, frijoles germinados, queso rancho y queso Tenate con halos de inhibición de entre 17.0 y 19.3 mm.

Muchos estudios han demostrado que las BAL son las mejores candidatas para utilizarse contra las bacterias que producen ETA. Sin embargo, como se reporta podrían ser más útiles aquellas que además de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas exhiban otras características probióticas como, tolerancia a pH ácido, tolerancia a sales biliares y sensibilidad a los antibióticos (Frakolaki et al., 2021). Por lo anterior el presente trabajo tuvo como objetivos, primero aislar bacterias ácido lácticas de diversas fuentes con capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas; posteriormente realizar pruebas adicionales para caracterizar el potencial probiótico tanto de las bacterias aisladas en este estudio como de bacterias aisladas en trabajos previos que exhiben actividad antimicrobiana.

2. Materiales y métodos

2.1. Bacterias ácido lácticas

Se colectaron 16 tipos de muestras diferentes. Estas incluyeron vegetales como tomate (*Solanum lycopersicum* L.), cebolla (*Allium cepa*), papa (*Solanum tuberosum*), lechuga (*Lactuca sativa*), zanahoria (*Daucus carota*), nopal (*Opuntia ficus-indica*), naranja (*Citrus X sinensis*). También se realizaron muestreos de bebidas fermentadas como el tepache (elaborada a partir de jugo y trozos de piña), tejuino (elaborado a base de atole de maíz fermentado) y aguamiel de cacao (líquido claro extraído de la fermentación del mucílago del cacao). Otras muestras incluyeron productos de la colmena (miel y propóleo de *Apis mellifera*); así como intestinos de abejas sin aguijón (*Scaptotrigona mexicana*) y

abejas europeas (*A. mellifera*). Para los aislamientos se siguió el procedimiento descrito por Fernández-Roblero et al. (2020).

Para las muestras vegetales, primeramente, se aseptizaron por 5 min con una solución de hipoclorito de sodio (200 ppm), luego se lavaron con alcohol al 70% y se enjuagaron con agua estéril. Posteriormente se cortaron 100 g de vegetal con un bisturí estéril, se maceró y se colocó en 100 mL de caldo MRS por 24 h. Transcurrido el tiempo, se tomaron 100 μ L de cada suspensión y se sembraron por triplicado en agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS). Todas las placas de Petri inoculadas fueron incubadas por 48 h a 37 °C en anaerobiosis.

Para el aislamiento de las BAL de las bebidas fermentadas, se tomaron directamente 100 μ L de los diferentes fermentos agua miel de cacao, tepache y tejuino y se inocularon por triplicado en placas de Petri conteniendo agar MRS. Este procedimiento se realizó por triplicado. Todas las placas de Petri inoculadas fueron incubadas por 48 h a 37 °C en anaerobiosis.

Para la extracción de biota intestinal primeramente se esterilizaron las abejas, sumergiéndolas en alcohol al 70% por 5 min, posteriormente se sumergieron en agua estéril durante 5 min. Seguidamente con un bisturí estéril se cortaron las extremidades dejando solamente el estómago para la extracción de los intestinos. Se tomaron 0.5 g de tejido intestinal y se colocaron en 100 μ L de agua peptonada, posteriormente se maceró con una varilla estéril y se homogenizó la mezcla. Se tomaron 100 μ L y se depositaron en placas de Petri conteniendo agar MRS. Todas las placas de Petri inoculadas fueron incubadas por 48 h a 37 °C en anaerobiosis. Este procedimiento se realizó por triplicado.

Al observar crecimiento bacteriano, se seleccionaron colonias diferentes basadas en su morfología (tamaño, forma y color). Estas colonias se sembraron de manera individual en placas con agar MRS hasta lograr cultivos axénicos. A cada una de las cepas se realizaron las pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa y tinción de Gram para seleccionar a las presuntas BAL (Barrios-Roblero et al., 2019).

Adicionalmente, se emplearon nueve cepas de BAL previamente aisladas de productos lácteos por Galvez-Medina et al. (2023) las cuales fueron seleccionadas con base en su capacidad para inhibir el crecimiento tanto de bacterias patógenas para el ser humano como de hongos que deterioran a los vegetales. Las cepas están codificadas como CM3.C2, FM4.C1.2, CM1.C1, QM1.C5, CM4.C2.2, QM2.C1, DCM3.C2.1, FM1.C3, FM1.C6.1. Estas cepas fueron proporcionadas por el cepario de Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas (IBC-UNACH) y cultivadas al menos dos veces en caldo y agar MRS hasta observar la morfología típica de la cepa y viabilidad.

2.2. Bacterias patógenas

Las cepas de bacterias patógenas al ser humano fueron proporcionadas por el cepario del IBC-UNACH. Para la reactivación de las cepas patógenas se siguió el método

descrito por Guzman-Hernandez et al. (2016). La cepa de *Salmonella* sp. fue reactivada en caldo selenito-cisteína y purificada en caldo tetrionato. Después de 24 h se tomó una asada de cada medio y se sembró por estría cruzada en los medios agar *Salmonella-Shigella*, agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y agar MacConkey incubándose a 37 °C por 24 h. Para la reactivación de *L. monocytogenes* las cepas fueron sembradas en medio selectivo Oxford, las placas sembradas fueron incubadas por 48 h a 37 °C. Para la reactivación de las cepas de *S. aureus* y *E. coli* se sembraron en placas de Petri conteniendo agar Baird-Parker (BPA) suplementado con telurito de potasio y emulsión de yema de huevo. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 48 h. Se seleccionaron aquellas colonias negras con halo transparente.

2.3. Capacidad antibacteriana de las BAL

Para las cepas de BAL aisladas en el presente estudio se evaluó la capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas por el método de la gota sobre la superficie (Galvez-Medina et al., 2023). Colonias puras se transfirieron a tubos que contenían 5 mL de caldo MRS y se incubaron a 37 °C durante 24 h, posteriormente fueron sembrados en forma de punto con una micropipeta (20 μ L) sobre placas de agar MRS e incubadas en condiciones anaerobias por 12 h a 37 °C.

Las bacterias patógenas se incubaron de manera individual en tubos con 5 mL de caldo infusión cerebro-corazón (BHI) (Oxoid) a 37 °C durante 12 h. Luego se transfirieron 100 μ L de la suspensión a 10 mL de caldo BHI fresco. La mezcla se completó con 0.75% de agar-agar y se colocó en baño María a 45 °C. Cada mezcla conteniendo células de la bacteria patógena se vertió (superpuso) en las placas con medio MRS previamente cultivadas con BAL. Después de la semi-solidificación completa de la capa superior, las placas fueron incubadas durante 24 h a 37 °C. La actividad antagónica de las BAL contra las bacterias patógenas se confirmó mediante la formación de halos de inhibición. Se midió el diámetro de la zona de inhibición (mm) alrededor de las colonias de las BAL con un calibrador vernier (tres veces en diferentes direcciones). Como control se utilizaron placas que contenían agar MRS a los que se agregaron 20 μ L de agua destilada en vez de cultivo de las BAL, vertiendo la suspensión de agar BHI conteniendo las bacterias patógenas. Las cepas de BAL que exhibieron actividad antibacteriana fueron elegidas para las pruebas posteriores.

2.4. Pruebas adicionales de potencial probiótico

Las cepas aisladas que dieron negativo a las pruebas de oxidasa y catalasa, coloración violeta en la tinción de Gram, morfología bacilar o bacilo-cocos, así como positivo en la prueba de inhibición de patógenos fueron seleccionadas para determinar otras características de potencial probiótico *in vitro*. Se incluyeron en esta prueba a las nueve cepas obtenidas del cepario provenientes del estudio de Galvez-Medina et al. (2023).

2.4.1. Tolerancia a pH ácido

De cada una de las cepas aisladas se tomaron dos asadas y se inocularon en 5 mL de caldo MRS contenido en tubos de ensayo con tapa rosca de 16 mL de capacidad y se dejó en agitación por 24 h a 30 °C. Posteriormente se centrifugó (Centrífuga 5403, Eppendorf) a 8800 g durante 10 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y el agregado celular se lavó dos veces con 5 mL (cada vez) de buffer fosfato salino (PBS, pH 7.2), centrifugando a 2380 g durante 5 min para finalmente obtener el sedimento y resuspenderlo en 1.5 mL de PBS. De esta suspensión de células, por triplicado se tomaron 50 µL para inocularlos en viales de 2 mL de capacidad conteniendo 950 µL de medio MRS fresco y ajustados a uno de tres pH, 2.5, 3.0 y 6.5 con HCl 1N. Los tubos se dejaron en agitación por 4 h a 30 °C, determinando cada 60 min el crecimiento celular (absorbancia a 560 nm) en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific GENESYS 20 (Noriega et al., 2004), usando caldo MRS fresco como blanco.

2.4.2. Resistencia a antibióticos

Se evaluó mediante la prueba de difusión en agar recomendada por *National Committee for Clinical Laboratory Standards* con las cepas activadas en caldo MRS a 37 °C durante 24 h y multidiscos combinados de antibióticos (BIO-Rad™) conteniendo amikacina (30 µg), ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cloranfenicol (30 µg), dicloxacilina (1 µg), enoxacina (10 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), netilmicina (30 µg), penicilina (10 µg), timetoprim-sulfametoxazol (25 µg).

2.5. Análisis de datos

Los datos obtenidos de las pruebas de inhibición fueron sometidos a análisis de varianza y posterior comparación múltiple de rangos por el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fischer ($\alpha=0.05$), usando el software estadístico Statgraphics Centurion XV Versión 15.2.06. Los demás datos se presentan como promedios de las repeticiones y, a partir de los datos de las cinéticas de crecimiento a distintos pH se calculó la velocidad de crecimiento (h^{-1}).

3. Resultados y Discusión

3.1. Aislamiento y selección de bacterias ácido lácticas

De las 14 muestras analizadas, se lograron aislar y purificar 34 cepas con características de colonia morfológicas presuntivas para bacterias ácido lácticas. Después de realizar las pruebas bioquímicas, se seleccionaron únicamente las cepas que dieron negativo a las pruebas de catalasa y oxidasa, así como positivo en la tinción Gram, quedando un total de 16 cepas. Las morfologías de colonia más comunes de las bacterias fueron formas circulares, puntiformes, de color blanco y de consistencias cremosa. Todas mostraron borde redondo y superficie plana, a excepción de las cepas N0m1 y NAm2 que mostraron forma fusiforme, color blanco, con texturas planas y consistencias cremosas. De las 16 cepas

seleccionadas, 3 cepas se aislaron de tejuino, 1 de tepache, 1 de aguamiel de cacao, 1 de tomate, 1 de cebolla, 1 de lechuga, 1 de papa, 1 de zanahoria, 1 de nopal, 1 de naranja, 2 de intestino de abeja, 1 de miel y 1 de propóleo. En nuestro grupo de trabajo previamente se han aislado BAL de muestras de tepache y tejuino con capacidad antifúngica (Barrios-Roblero et al., 2019), de miel de abejas sin aguijón con capacidad probiótica (Fernández-Roblero et al., 2020) pero no de frutas o de intestinos de abejas. Se aislaron BAL de tipo cocobacilos Gram positivos con forma oval del intestino de abejas meliponas, diplobacilos Gram positivos con forma ligeramente curvados del aguamiel de cacao y estreptobacilos Gram positivos con formas fusiformes reunidos en cadenas por los extremos de muestras de naranja y nopal. Estas morfologías son similares a las reportadas por Nuryshev et al. (2016).

3.2. Capacidad antibacteriana de las BAL

A las 16 cepas de BAL se realizaron pruebas de antagonismo. Todas las cepas presentaron actividad inhibitoria de los patógenos; la mayoría de las cepas presentaron actividad a más de un género de patógeno a excepción de la cepa T0m1 que solo presentó actividad contra *L. monocytogenes* (Cuadro 1).

Sobresalen por su capacidad las cepas N0m1, ZAm1, CE1m1, AGCm3, TEP5m3, TEJ1m3, TEJ7m3, TEJ10m3, ISMm4, IAMm4, MAMm5, PAMm5, mostrando actividad antagónica contra los cuatro géneros de patógenos probados en este estudio (Cuadro 1). Los halos de inhibición presentaron tamaños que van desde 1.67 mm hasta 25.37 mm. La cepa IAMm4 destaca por inhibir a los cuatro patógenos; con valores de 24.33 mm contra *L. monocytogenes*, además de obtener el valor más alto del halo de inhibición contra *S. aureus* (25.37 mm). La cepa TEJ10m3 presentó actividad antagónica contra los cuatro patógenos teniendo halos de inhibición hasta de 24.37 mm contra *Salmonella* sp. y 22.70 contra *E. coli*. Del mismo modo, la cepa AGCm3 provocó halos de 24.47 mm contra *E. coli* y 24.36 mm contra *L. monocytogenes* (Cuadro 1).

Los valores obtenidos fueron mayores a los valores reportado por Falfán-Cortés et al. (2022). De Medeiros et al. (2021) reportan cepas de *L. brevis* y *L. rossiae* aisladas de Chile jalapeño con actividad contra *E. coli* y *Salmonella* sp. con halos de inhibición similares a los reportados en nuestro estudio. Jung et al. (2021) aislaron cinco cepas de BAL que exhibieron actividad contra *E. coli* y *S. Typhi*, reportando diámetros mayores a los 17 mm. Existen muchos metabolitos responsables de la actividad antibacteriana de las BAL. Péptidos antimicrobianos (Fugaban et al. 2022), ácidos orgánicos, ácido fenil-láctico, y bacteriocinas son algunos de los metabolitos secundarios que actúan como mecanismo de defensa contra los patógenos (Chikindas et al., 2018; Todorov et al., 2019; Todorov et al., 2020).

Cuadro 1. Diámetro (mm) de las zonas de inhibición generadas por los aislados de bacterias del ácido láctico estudiadas contra microorganismos.

Cepa de BAL	<i>Salmonella sp.</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
TEJ10m3	24.37±0.73a	20.63±0.75bc	22.63±0.45b	22.70±0.47abc
AGCm3	23.78±0.73ab	24.36±0.75a	23.33±0.45ab	24.47±0.47a
CEm1	22.7±0.73ab	22.60±0.75ab	21.49±0.45bc	19.87±0.47def
TEJ7m3	22.24±0.73abc	22.82±0.75ab	16.55±0.45d	23.48±0.47ab
TEJ1m3	20.50±0.73bcd	22.36±0.75ab	21.50±0.45bc	20.27±0.47de
TEP5m3	18.82±0.73cd	21.13±0.75ab	22.23±0.45b	21.40±0.47bcd
IAMm4	18.08±0.73de	24.33±0.75a	25.37±0.45a	17.70±0.47fg
ISMm4	18.06±0.73de	9.62±0.75ef	19.73±0.45c	18.0±0.47efg
MAMm5	14.68±0.73ef	17.24±0.75c	22.63±0.45b	23.90±0.47a
PAMm5	13.84±0.73f	21.41±0.75ab	15.95±0.45d	16.12±0.47gh
NAm2	13.33±0.73f	11.29±0.75def	0.00±0.45e	16.65±0.47gh
NOm1	9.31±0.73g	11.39±0.75def	22.22±0.45b	21.54±0.47bcd
ZAm1	6.09±0.73g	13.56±0.75d	19.39±0.45c	14.46±0.47h
PAm1	1.67±0.73h	10.21±0.75Def	0.00±0.45e	21.17±0.47cd
LEm1	0.00±0.73h	8.12±0.75f	0.00±0.45e	17.94±0.47fg
TOm1	0.00±0.73h	12.27±0.75de	0.00±0.45e	0.00±0.47i

Medias ± error estándar. Valores con una letra común no son significativamente diferentes (P>0.05).

Los halos de inhibición de las cepas proporcionadas por el cepario del IBC-UNACH van de 7.25 mm a 26.50 mm contra los patógenos *Salmonella sp.*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*; los valores puntuales pueden ser consultados en Galvez-Medina et al. (2023).

3.3. Crecimiento a distintos pH

La acidez (pH bajo) es una de las barreras cruciales que las BAL probióticas deben enfrentar para sobrevivir durante el paso del estómago al intestino. Además, la presencia de BAL como probióticos en productos alimenticios con alto contenido de ácido (pH bajo), como el yogur ácido y los encurtidos, provoca un estrés grave en estas bacterias (Mbye et al., 2020). Algunas cepas no mostraron aumento en la absorbancia a pH 6.5. Los valores de cero en la velocidad de crecimiento (Cuadro 2) para varias cepas confirman la ausencia de crecimiento. Lo anterior puede estar sugiriendo mayor adaptación de las BAL a los pH ácidos. Sin embargo, la cepa FM1.C3 mostró mayor crecimiento después de 4 h de incubación sobrepasando los 0.9 unidades de absorbancia, seguida por la cepa CM4.C2.2 sobrepasando los 0.8 unidades de absorbancia igual que la cepa FM4.C1.2 con el mismo valor (Figura 1).

Algunas cepas sobrevivieron y crecieron a pH 3.0 después de 4 h de incubación, tal es el caso de la cepa CM4.C2.2 que logra crecer arriba de 0.9 unidades de absorbancia incluso crece mejor que a pH 6.5. Además, esta cepa presentó la velocidad de crecimiento más alta a pH 2.5 (Cuadro 2). La cepa AGCm3 muestra un crecimiento exponencial ya que alcanza los 0.6 unidades de absorbancia partiendo de los 0.1 en el tiempo cero. Se ha reportado que algunas cepas de BAL cuentan con mecanismos que les permiten sobrevivir en condiciones tan ácidas como pH de 2 (Mbye et al., 2020). La cepa FM4.C1.2 también logra alcanzar los 0.7 unidades de absorbancia partiendo de 0.4 en el tiempo cero como se muestra en la Figura 3. La disminución del crecimiento de las bacterias que mostraron poca sobrevivencia a pH 2.5 y 3

podría deberse a que algunas de las bacterias necesitan mayor tiempo de adaptación, ya que al disminuir el pH también se desequilibra la actividad metabólica. Las BAL generalmente son acidófilas, lo que significa que pueden tolerar pH's bajo, pero cuando existen una gran cantidad de ácidos libres (H⁺), la sobrevivencia puede verse comprometida.

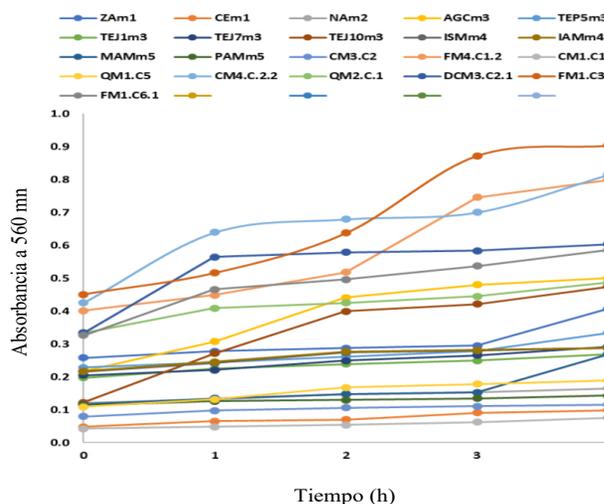


Figura 1. Cinéticas de crecimiento (absorbancia a 560 nm) a pH 6.5 de las cepas aisladas de diferentes fuentes.

Al comparar la cinética de crecimiento entre el pH 3.0 (Figura 2) y pH 2.5 (Figura 3) se observa similitud en el comportamiento de adaptación de las BAL. La cepa AGCm3 exhibió mayor tolerancia al ácido a pH 2.5, presentando valores de absorbancia de 0.1 en el tiempo cero y alcanzando los 0.8 unidades de absorbancia a pH 2.5 (Figura 4), alcanzando a este pH la mayor velocidad de crecimiento de entre todas las cepas (Cuadro 2). La cepa QM2C1 también mostró adaptación significativa a pH 2.5, superando las 0.6 unidades de absorbancia a las 4 h, partiendo de una

absorbancia de 0.1 en el tiempo cero, pero su velocidad de crecimiento es baja (Cuadro 2).

Cuadro 2. Velocidad de crecimiento (h^{-1}) de cada cepa de BAL aisladas de diferentes fuentes a tres condiciones de pH.

Cepa	pH 2.5	pH 3.0	pH 6.5
PAM1	0.00	0.02	0.01
NOM1	0.01	0.03	0.07
LEM1	0.05	0.04	0.08
TOM1	0.00	0.02	0.02
ZAM1	0.08	0.07	0.03
CEM1	0.07	0.02	0.01
NAM2	0.10	0.03	0.01
AGCm3	0.18	0.10	0.07
TEP5m3	0.01	0.02	0.02
TEJ1m3	0.02	0.02	0.01
TEJ7m3	0.02	0.02	0.02
TEJ10m3	0.02	0.02	0.08
ISMm4	0.09	0.09	0.01
IAMm4	0.04	0.05	0.01
MAMm5	0.04	0.05	0.03
PAMm5	0.07	0.02	0.00
CM3.C2	0.03	0.03	0.00
FM4.C1.2	0.10	0.09	0.09
CM1.C1	0.00	0.02	0.00
QM1.C5	0.03	0.01	0.02
CM4.C2.2	0.09	0.13	0.09
QM2.C1	0.13	0.05	0.03
DCM3.C2.1	0.12	0.04	0.06
FM1.C3	0.06	0.05	0.11
FM1.C6.1	0.04	0.07	0.06

Este crecimiento se debe a que algunas BAL cuentan con moléculas protectoras que previenen la destrucción celular interna o mejoran la fuerza celular para permitir la tolerancia de entornos hostiles. Una de esas moléculas es la ATPasa de translocación de protones que ayuda a estabilizar el pH celular interno en respuesta a un pH externo mu y bajo (Mbye et al., 2020).

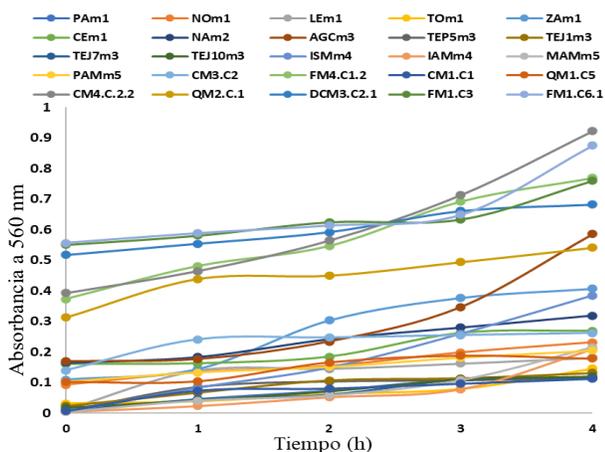


Figura 2. Cinéticas de crecimiento (absorbancia a 560 nm) a pH 3.0 de las cepas aisladas de diferentes fuentes.

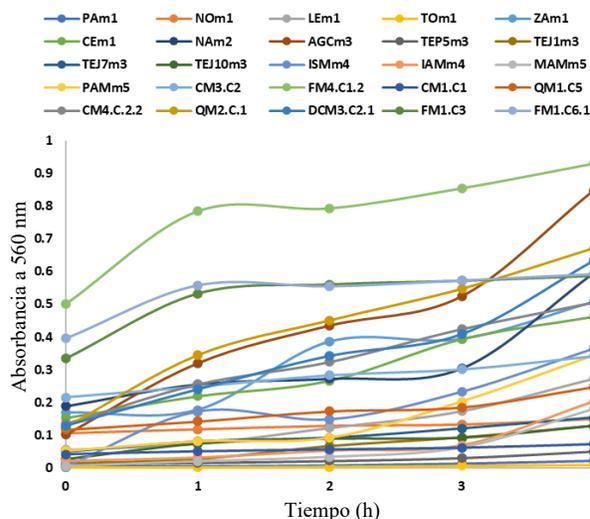


Figura 3. Cinéticas de crecimiento (absorbancia a 560 nm) a pH 2.5 de las cepas aisladas de diferentes fuentes.

Los resultados del presente estudio son similares a los reportados por Dogra et al. (2021) quienes además, sugieren que las cepas con capacidad de tolerar e incluso crecer a pH ácidos en una propiedad probióticas que ayudará a que las bacterias lleguen a los intestinos y colon y contribuyan al equilibrio de la microbiota intestinal. Fernández-Roblero et al. (2020) aislaron 10 cepas de bacterias lácticas de miel de abejas *Meliponas* probadas a pH 6.5 y 2.5 y reportan valores parecidos a los obtenidos en el presente estudio, esta similitud puede deberse a que ambos trabajos fueron realizados en la misma región.

3.4. Resistencia a antibióticos

Los resultados obtenidos en la prueba de resistencia a antibióticos se muestran en el Cuadro 3. A excepción de las cepas CEM1 y DCM3.C2.1, las demás presentaron sensibilidad a cloranfenicol. Las cepas NAM2, AGCm3, TEJ1m3 mostraron moderada sensibilidad (I) al mismo antibiótico. Las cepas TEP5m3, ISMm4, IAMm4, MAMm5, CM3.C2, FM4.C1.2, CM1.C1, QM1.C5, FM1.C3, FM1.C6.1 mostraron sensibilidad a todos los antibióticos. La mayoría de las cepas muestran moderada susceptibilidad a la ampicilina. La cepa ZAM1 muestra sensibilidad a todos los antibióticos excepto a trimetoprim-sulfametoxazol que mostró resistencia. Para ninguno de los antibióticos empleados se observó resistencia en el total de las 25 cepas evaluadas, es decir que todas las cepas sean resistentes al mismo antibiótico. Sin embargo, para aquellos antibióticos donde una alta proporción de cepas fue resistente, tal es el caso de las cepas CEM1, NAM2, TEJ1m3 Y DCM3.C2.1 mostraron resistencia a 4 o más del total de los 12 antibióticos, las otras cepas evaluadas fueron moderadamente sensibles. La transmisión de genes de resistencia a antibióticos hacia bacterias patógenas en el intestino es un problema de salud importante; por lo tanto, es deseable que los probióticos sean sensibles a los antibióticos

o que la resistencia que exhiban sea inherente al microorganismo y no haya riesgo de transferencia de genes de resistencia (Fernández-Roblero et al., 2020). Debido a

ello, la OMS sugiere en la medida de lo posible trabajar con cepas susceptibles a los antibióticos (Álvarez-Cisneros y Ponce-Alquicira, 2018).

Cuadro 3. Susceptibilidad a antibióticos de las bacterias aisladas de diferentes fuentes.

Cepa	PE	DC	ENX	NET	GE	CRO	SXT	AK	AM	E	CL	CF
PAM1	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
NOM1	I	I	R	S	I	I	S	S	I	I	S	R
LEM1	S	S	I	I	S	S	S	S	S	I	S	I
TOM1	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
ZAM1	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
CEM1	I	R	R	I	I	I	R	R	I	I	R	R
NAM2	I	I	R	R	I	I	R	R	I	I	I	S
AGCm3	S	S	S	S	I	I	I	S	S	I	I	S
TEP5m3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TEJ1m3	R	R	I	I	R	S	S	I	I	R	I	R
TEJ7m3	I	I	S	S	I	S	I	I	S	S	S	S
TEJ10m3	S	I	S	I	R	I	S	I	I	S	S	S
ISMm4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IAMm4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MAMm5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PAMm5	S	S	S	I	I	I	S	I	I	I	S	S
CM3.C2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
FM4.C1.2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CM1.C1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
QM1.C5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CM4.C2.2	I	I	S	S	I	S	S	I	I	I	S	S
QM2.C1	S	I	I	S	I	I	S	S	I	S	S	I
DCM3.C2.1	S	R	I	I	S	R	I	R	S	S	R	R
FM1.C3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
FM1.C6.1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S: susceptible; I: moderada susceptibilidad; R: resistente.
 PE: penicilina (10 µg), DC: dicloxacilina (1 µg), ENX: enoxacina (10 µg), NET: netilmicina (30 µg), GE: gentamicina (10 µg), CRO: ceftriaxona (30 µg), SXT: trimetoprim-sulfametoxazol (25 µg), AK: amikacina (30 µg), AM: ampicilina (10 µg), E: eritromicina (15 µg), Cl: cloranfenicol (30 µg), CF: cefalotina (30 µg).

4. Conclusión

Las cepas de BAL analizadas en el presente estudio, exhibieron más de una característica de interés probiótico. Solo algunas cepas (CEM1, NAM2, TEJ1m3 Y DCM3.C2.1) presentaron resistencia a 4 o más antibióticos, por lo que su uso como probiótico podría requerir de otros estudios que evidencien la naturaleza de la resistencia. La cepa AGCm3 (proveniente de aguamiel de cacao) que destacó por mayores halos de inhibición para los cuatro patógenos, creció a pH ácido y es sensible a los antibióticos se muestra como una candidata interesante para usarse como probiótico. Otros estudios complementarios pueden validar los hallazgos aquí presentados.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias

Álvarez-Cisneros YM, Ponce-Alquicira E. 2018. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria. IntechOpen 10.5772/intechopen.80624.

- Bai X, Nakatsu CH, Bhunia AK. 2021. Bacterial biofilms and their implications in pathogenesis and food safety. *Foods* 10(9): 2117.
- Barrios-Roblero C, Rosas-Quijano R, Salvador-Figueroa M, Gálvez-López D, Vázquez-Ovando A. 2019. Antifungal lactic acid bacteria isolated from fermented beverages with activity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Food Bioscience* 29: 47-54.
- Bulgasem YB, Lani MN, Hassan Z, Yusoff WMW, Fnaish SG. 2016. Antifungal activity of lactic acid bacteria strains isolated from natural honey against pathogenic *Candida* species. *Mycobiology* 44(4): 302-309.
- Chikindas ML, Weeks R, Drider D, Chistyakov VA, Dicks LM. 2018. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology* 49: 23–28.
- De Medeiros JC, Leandro EDS, Maldonado IR, de Alencar ER, Ribeiro CSDC, Ragassi CF. 2021. Characterization of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of jalapeno peppers (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Food Processing and Preservation* 45(12): e16025.
- Dos Santos LE, Ginani VC, de Alencar ER, Pereira OG, Rose ECP, do Vale HMM, Pratesi R, Hecht MM, Cavalcanti MH, Tavares CSO. 2021. Isolation, identification, and screening of lactic acid bacteria with probiotic potential in

- silage of different species of forage plants, cocoa beans, and artisanal salami. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 13(1): 173-186.
- Dogra T, Mehra R, Kumar H, Thakur M. 2021. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented food “maleda” of northern Indian state. *Annals. Food Science and Technology* 22(1): 54-60.
- Falfán-Cortés RN, Mora-Peñaflor N, Gómez-Aldapa CA, Rangel-Vargas E, Acevedo-Sandoval OA, Franco-Fernández MJ, Castro-Rosas J. 2022. Characterization and evaluation of the probiotic potential *in vitro* and *in situ* of *Lactocaseibacillus paracasei* isolated from Tenate cheese. *Journal of Food Protection* 85(1): 112-121.
- Fernández-Roblero S, Grajales-Conesa J, Rincón-Rabanales M, Coronel-Niño R, Vázquez-Ovando A. 2020. Lactic acid bacteria isolated from the Stingless bee *Scaptotrigona mexicana* and partial characterization of their probiotic activity. *Bio Ciencias* 7: e979.
- Frakolaki G, Giannou V, Kekos D, Tzia C. 2021. A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 61(9): 1515-1536.
- Fugaban JII, Holzapfel WH, Todorov S. 2022. The overview of natural by-products of beneficial lactic acid bacteria as promising antimicrobial agents. *Applied Food Biotechnology* 9(2): 127-143.
- Galvez-Medina A, Mejía-Reyes D, Ruiz-González S, De Gyves-Córdova G, Vázquez-Ovando A. 2023. Isolation of antimicrobial lactic acid bacteria with potential use as a protective culture for ‘Queso Fresco’. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* sometido.
- Guzman-Hernandez R, Contreras-Rodriguez A, Hernandez-Velez R, Perez-Martinez I, Lopez-Merino A, Zaidi MB, Estrada-Garcia T. 2016. Mexican unpasteurised fresh cheeses are contaminated with *Salmonella spp.*, non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* and potential uropathogenic *E. coli* strains: A public health risk. *International Journal of Food Microbiology* 237: 10–16.
- Hamdy AA, Elattal NA, Amin MA, Ali AE, Mansour NM, Awad GEA, Awad HM, Esawy MA. 2017. Possible correlation between levansucrase production and probiotic activity of *Bacillus sp.* isolated from honey and honey bee. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33(4): 69.
- Jung JY, Han S-S, Kim Z-H, Kim MH, Kang HK, Jin HM, Lee MH. 2021. *In-vitro* characterization of growth inhibition against the gut pathogen of potentially probiotic lactic acid bacteria strains isolated from fermented products. *Microorganisms* 10): 2141.
- Karami S, Roayaei M, Hamzavi H, Bahmani M, Hassanzad-Azar H, Leila M, Rafieian-Kopaei M. 2017. Isolation and identification of probiotic *Lactobacillus* from local dairy and evaluating their antagonistic effect on pathogens. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 7(3):137-141.
- Lavermicocca P, Reguant C, Bautista-Gallego J. 2021. Editorial: Lactic acid bacteria within the food industry: What is new on their technological and functional role. *Frontiers in Microbiology* 12: 711013.
- Lemme-Dumit JM, Cazorla SI, Perdígón GDV and Maldonado-Galdeano C. 2021. Probiotic bacteria and their cell walls induce th1-type immunity against *Salmonella Typhimurium* challenge. *Frontiers in Immunology* 12: 660854.
- Mbye M, Baig MA, AbuQamar SF, El-Tarabily KA, Obaid RS, Osaili TM, Al-Nabulsi AA, Turner MS, Shah NP, Ayyash MM. 2020. Updates on understanding of probiotic lactic acid bacteria responses to environmental stresses and highlights on proteomic analyses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19: 1110–1124.
- Noriega L, Gueimonde M, Sánchez B, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG. 2004. Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glucosydic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology* 94(1): 79-86.
- Nuryshev MZ, Stoyanova LG, Netrusov AI. 2016. New probiotic culture of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*: Effective opportunities and prospects. *Journal of Microbiol and Biochemical Technology* 8: 290-295.
- Olea A, Díaz J, Fuentes R, Vaquero A, García M. 2019. Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Chile. *Revista Chilena de Infectología* 29(5): 504-510.
- Sakandar HA, Kubow S, Sadiq FA. 2019. Isolation and *in-vitro* probiotic characterization of fructophilic lactic acid bacteria from Chinese fruits and flowers. *LWT* 104: 70-75.
- Swain MR, Anandharaj M, Ray RC, Rani RP. 2014. Fermented fruits and vegetables of Asia: A potential source of probiotics. *Biotechnology Research International* 2014: 250424.
- Szutowska J, Gwiazdowska D. 2021. Probiotic potential of lactic acid bacteria obtained from fermented curly kale juice. *Archives of Microbiology* 203: 975-988.
- Todorov SD, Cavicchioli VQ, Ananieva M, Bivolarski VP, Vasileva TA, Hinkov AV, Todorov DG, Shishkov S, Haertlé T, Iliev IN, Nero LA, Ivanova IV. 2020. Expression of coagulin A with low cytotoxic activity by *Pediococcus pentosaceus* ST65ACC isolated from raw milk cheese. *Journal of Applied Microbiology* 128(2): 458–472.
- Todorov SD, de Melo Franco BDG, Tagg JR. 2019. Bacteriocins of Gram-positive bacteria having activity spectra extending beyond closely-related species. *Beneficial Microbes* 10(3): 315-328.
- Verón HE, Di Risio HD, Isla MI, Torres S. 2017. Isolation and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from *Opuntia ficus-indica* fruits that grow in Northwest Argentina. *LWT* 84: 231-240.
- Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, O’Toole PW, Pot B, Vandamme P, Walter J, Watanabe K, Wuyts S, Felis GE, Gänzle MG, Lebeer S. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70(4):2782-2858.
- Zúñiga C, Iván R, Lozano C, Vaquero J. 2017. Enfermedades transmitidas por los alimentos: una mirada puntual para el personal de salud. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 95: 94-103.