

Artículo científico

Potencial probiótico *in vitro* de cepas de *Lactobacillus* spp. procedentes de la vagina de vacas lecheras

In vitro probiotic potential of *Lactobacillus* spp. strains from the vagina of dairy cows

Marta Laurencio-Silva¹, Fátima Arteaga², Ana Julia Rondón-Castillo¹, José Ormaza², Jessica Pinto², Diego Pazmiño² e Ignacio Macías²

¹Universidad de Matanzas, autopista a Varadero km 3, Matanzas, Cuba

²Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Ecuador

Correo electrónico: marta.laurencio@umcc.cu

Resumen

El estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial probiótico *in vitro* de 28 cepas de *Lactobacillus* spp., aisladas de la vagina de vacas lecheras criollas de la región de Manabí –Ecuador–, para su utilización como probiótico en hembras con trastornos urogenitales. Se determinó la disminución de pH y la capacidad de crecimiento a las 24 h, y se evaluó la sobrevivencia a pH (6, 8 y 9) y a temperatura (38, 39 y 40 °C), la adherencia a hidrocarburos –mediante ensayo de hidrofobicidad de la superficie celular–, la capacidad de autoagregación, la congregación, la actividad antimicrobiana y la resistencia a 14 antibióticos. A los datos se les realizó análisis de varianza con el programa estadístico INFOTAT, y para verificar las diferencias entre medias se empleó la prueba de comparación de Duncan. Quince cepas crecieron a diferentes pH y disminuyeron su crecimiento a valores iguales o inferiores a 5 y a la temperatura óptima del ecosistema vaginal de las vacas, y tuvieron alta capacidad de crecimiento a las 24 h. Las cepas LvB-38, 39, 42, 45, 46, 52, 54 y 90 mostraron capacidad de adherencia a hidrocarburos (tolueno y xileno), superior al 80 %; autoagregaron por encima del 50 %; coagregaron con *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers, *Staphylococcus aureus* Rosenbach y *Klebsiella* spp., por encima del 75 %; inhibieron el crecimiento a estos patógenos por la presencia de ácidos; y fueron sensibles a diez antimicrobianos. Se concluye que las ocho cepas seleccionadas pueden considerarse como candidatas a probióticos, para su utilización en la prevención de trastornos urogenitales de la hembra bovina.

Palabras clave: bacterias acidolácticas, ganado bovino, hidrofobicidad

Abstract

The objective of the study was to evaluate the *in vitro* probiotic potential of 28 *Lactobacillus* spp. strains, isolated from the vagina of creole dairy cows of the Manabí region –Ecuador–, for its utilization as probiotic in cows with urogenital disorders. The pH decrease and growth capacity at 24 h was determined, and the survival to pH (6, 8 and 9) and temperature (38, 39 and 40 °C), the adherence to hydrocarbons –through hydrophobicity essay of the cell surface–, the self-aggregation capacity, congregation, antimicrobial activity and resistance to 14 antibiotics, were evaluated. Variance analysis was performed on the data with the statistical program INFOTAT, and to verify the differences among means Duncan's comparison test was used. Fifteen strains grew at different pH and decreased their growth at values equal or lower than 5 and at the optimum temperature of the vaginal ecosystem of the cows, and had high growth capacity at 24 h. The strains LvB-38, 39, 42, 45, 46, 52, 54 and 90 showed capacity of adherence to hydrocarbons (toluene and xylene), higher than 80 %; self-aggregated over 50 %; co-aggregated with *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers, *Staphylococcus aureus* Rosenbach and *Klebsiella* spp., over 75 %; inhibited the growth of these pathogens due to the presence of acids; and were sensitive to ten antimicrobial drugs. It is concluded that the eight selected strains can be considered as candidates to be probiotics, for their utilization in the prevention of urogenital disorders of cows.

Keywords: acid-lactic bacteria, cattle, hydrophobicity

Introducción

Desde el siglo pasado se desarrollaron y utilizaron nuevos productos biotecnológicos en los sistemas de producción animal intensiva, con el fin de amortiguar pérdidas en la producción de carne y leche, así como evitar la contaminación de estos

alimentos para el consumo humano. Con estos fines se desarrollan los probióticos, que son microorganismos vivos, fundamentalmente del género *Lactobacillus*, que suministrados en pequeñas dosis favorecen el equilibrio microbiano, tanto a nivel del intestino como de la vagina. Tales productos no

crean los problemas de resistencia microbiana o los efectos residuales que producen los antibióticos, de forma tal que contribuyen al fomento de una ganadería sostenible y ecológica.

En el mundo se comercializan productos con efectos probióticos, entre los que se destacan por su eficacia: ProBiotics®, Biomin®, Biomax 5® e HY-DROYEAST®; sin embargo, hay pocos reportes del uso de probióticos vaginales en vacas lecheras para prevenir trastornos uterinos. Estas infecciones se relacionan con el crecimiento excesivo de bacterias patógenas durante las tres primeras semanas después del parto, lo cual provoca una disminución en la producción de leche (Sheldon *et al.*, 2006). Leccese *et al.* (2012) consideran que estas alteraciones pueden convertirse en infecciones sistémicas y afectar la fertilidad o gestación de la hembra del bovino. No obstante, si se establece la microbiota beneficiosa, conformada fundamentalmente por lactobacilos, puede ocurrir que estas bacterias se adhieran a las células epiteliales y produzcan sustancias antimicrobianas como ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, las cuales impiden la proliferación de patógenos (Nazef *et al.*, 2008).

Los lactobacilos representan el grupo de bacterias ácido lácticas (BAL) más abundante en la naturaleza y son predominantes en el tracto vaginal humano y en el de algunos animales homeotermos. Se desarrollan en ecosistemas que contienen azúcares fermentables, vitaminas, productos hidrolizados de proteínas, baja tensión de oxígeno, entre otros factores (Orla-Jensen, 1917; Falentin *et al.*, 2016). Este grupo es denominado «guardianes de la vagina», y contribuye a mantener el equilibrio microbiano adecuado en tal ecosistema (De Gregorio *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). De ahí que el estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial probiótico *in vitro* de 28 cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas de la vagina de vacas lecheras criollas de la región de Manabí, Ecuador, para su utilización como probiótico en hembras con trastornos urogenitales.

Materiales y Métodos

Material biológico. De 15 vacas lecheras criollas de la región Manabí, se tomaron muestras del cérvix y de la vagina para el aislamiento de cepas con potencial probiótico, específicamente de *Lactobacillus* spp.; con estas 28 cepas se realizó el experimento. Estas fueron incorporadas al banco de cepas del laboratorio de biología molecular de

la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, y conservadas en leche (10 %) y glicerol (20 %) en condiciones de criopreservación a -80 °C, según lo recomendado por Vera (2013).

Selección de cepas de *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico *in vitro*

Determinación del pH. Las 28 cepas seleccionadas se cultivaron por separado en tubos con 10 mL de caldo MRS (Mann Rogosa Sharpe) (De Mann *et al.*, 1960), a 37 °C por 24 h, de acuerdo con la metodología de Rondón (2009). De cada réplica se tomaron muestras para medir el pH de los cultivos a las 24 h, con un pHmetro digital (Sartorius Meter PP-25).

Sobrevivencia a diferentes pH y temperatura

pH. Las cepas aisladas se cultivaron en caldo MRS, al que se le ajustó el pH a 6, 8 y 9 con NaOH al 2 %, y se replicaron tres veces. Los cultivos fueron incubados a 37 °C durante 24 h. Se midió el crecimiento mediante la determinación de la absorbancia (A_{560nm}).

Temperatura. Se cultivaron las cepas en caldo MRS y se incubaron a 38, 39 y 40 °C durante 24 horas. El crecimiento se midió mediante el mismo procedimiento utilizado para el pH.

Capacidad de crecimiento. Para determinar si existían diferencias entre las cepas en la capacidad de crecimiento a las 0 y 24 horas, se utilizó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 18 x 2, con tres repeticiones. Las cepas se cultivaron por 18 h (10 Log UFC.mL⁻¹) en caldo MRS con pH 6,5 a 37 °C. Posteriormente se inocularon a razón de 1:10 (v/v) en frascos con 45 mL del mismo medio y se incubaron a 37 °C durante 24 horas en condiciones estáticas. El conteo de *Lactobacillus* spp. se realizó por el método de diluciones seriadas, y las placas se incubaron a 37 °C en condiciones de anaerobiosis por 48 h.

Ensayo de hidrofobicidad de superficie celular (HSC). Se determinó la HSC mediante el método bifásico agua-hidrocarburo MATH (test de adhesión microbiana-hidrocarburos), según la metodología de Pérez *et al.* (1998). La hidrofobicidad de la superficie celular se calculó con la siguiente fórmula: % $H = (A_0 - A)/A_0 \times 100$, donde A_0 y A representan la densidad óptica (DO) antes y después de la extracción con tolueno y xileno, respectivamente. Se tomó como criterio de selección las cepas que mostraran más de 80 % de hidrofobicidad.

Capacidad de autoagregación. Para determinar la capacidad de autoagregación se utilizó el método de Kos *et al.* (2003), y para ello fueron elegidas todas las cepas de *Lactobacillus* spp. que alcanzaron el porcentaje de hidrofobicidad indicado anteriormente. Se evaluó durante 5 h de incubación, a temperatura ambiente. Cada hora se extrajo 1 mL de la capa superior y se transfirió a tubos que contenían 3 mL de *buffer* PBS. A esta mezcla se le midió la absorbancia, y el porcentaje de autoagregación se determinó a través de la fórmula: $A = 1 - (A_t/A_0) \times 100$, donde A_t representa la DO a las diferentes horas: 1, 2, 3, 4 y 5, y A_0 , la DO a la hora cero.

Nivel de coagregación. Se utilizó la técnica descrita por Orłowski y Bielecka (2006). Las cepas salvajes de *E. coli*, *S. aureus* y *Klebsiella* spp. se aislaron del ecosistema vaginal de vacas enfermas y se identificaron en el laboratorio de microbiología de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí. Se escogieron las cepas que tenían más de 80 % de hidrofobicidad, y se les determinó la absorbancia (A) a 560 nm, antes y después de 5 h, a los cultivos puros de lactobacilos, patógenos y a la mezcla de ambos. La incubación se realizó a temperatura ambiente. Para determinar el porcentaje de coagregación se utilizó la siguiente ecuación: % coagregación = $[(Ax_i + Ay_i)/2 - A_i(x+y) / (Ax_i + Ay_i)/2] \times 100$.

Donde:

Ax_i : absorbancia a las 5 h de los cultivos puros de *Lactobacillus* spp.

Ay_i : absorbancia a las 5 h de los cultivos puros de *E. coli*, *S. aureus* y *Klebsiella* spp.

$A_i(x + y)$: absorbancia de la mezcla de *Lactobacillus* spp. + *E. coli*, *S. aureus* y *Klebsiella* spp.

Ax_i : absorbancia de los cultivos puros de *Lactobacillus* spp. en el tiempo inicial.

Ay_i : absorbancia de los cultivos puros de *E. coli*, *S. aureus* y *Klebsiella* spp. en el tiempo inicial.

Determinación de la actividad antimicrobiana. Se empleó la técnica de difusión de sustancias en agar, propuesta por Schillinger y Lücke (1989). Como cepas indicadoras se usaron *E. coli*, *S. aureus* y *Klebsiella* spp., las que se inocularon en caldo nutriente y se incubaron en zaranda termostata durante 18 h a 37 °C. Las cepas productoras (lactobacilos) se cultivaron en 10 mL de caldo MRS a 37 °C, en condiciones estáticas, por 18 h (10 Log UFC mL⁻¹). Se tomaron muestras a las 8, 18 y 24 horas; se centrifugaron a 15 000 rpm, a 5 °C por 10 min.; y se esterilizaron a través de filtros de acetato

de celulosa, con poros de 0,22 μm (Minisart, Sartorius 600 kPa max). El sobrenadante no se modificó.

Técnica de difusión en agar. De los cultivos de cepas indicadoras se tomaron 200 μL y se inocularon en tubos con 20 mL de agar nutriente (con 10 % de ión-agar, OXOID), los que fueron vertidos en placas para su solidificación. En cada placa que contenía cepas indicadoras se abrieron pocillos de 5 mm de diámetro, y en ellos se depositaron 60 μL de las muestras de cepas productoras, controles positivos (caldo MRS + ácido láctico 1N hasta alcanzar pH 3) y controles negativos (caldo MRS pH 6,2). Las placas se mantuvieron a 5 °C por 4 h, para una mejor difusión de las sustancias en agar. Luego se incubaron a 37 °C, entre 24 y 48 h, hasta detectar el crecimiento y la aparición de los halos de inhibición. El diámetro de los halos se midió con una regla milimetrada. A cada valor se le restó el diámetro de los pocillos.

Determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos. La determinación de la sensibilidad de las cepas seleccionadas a 14 antibióticos diferentes (NEO-SENSITABS™) se realizó por el método de difusión en discos (Bauer *et al.*, 1966), en agar MRS a 37 °C en condiciones de anaerobiosis, debido a las exigencias nutricionales y fisiológicas de los lactobacilos. La presencia de sensibilidad se observó al detectarse los halos de inhibición. La prueba con los antibióticos se realizó por duplicado.

Análisis estadístico. A los datos se les realizó un análisis de varianza con el programa estadístico INFOSTAT versión 1 (Balzarini *et al.*, 2001). Las diferencias entre medias se verificaron a través de la prueba de comparación de Duncan (1955).

Resultados y Discusión

De las 28 cepas con características del grupo de los lactobacilos 15 acidificaron el medio a pH < 5 (tabla 1), por lo que fueron seleccionadas. Las BAL tienen la capacidad de producir ácido láctico y disminuir el pH del sustrato, característica primordial dentro del grupo de los lactobacilos con capacidad probiótica. Resultados similares obtuvieron Vallejo *et al.* (2008) al evaluar 20 cepas de lactobacilos aisladas de queso ovino, 10 de las cuales sobrevivieron a condiciones de pH ácido. Rondón (2009) aisló 75 cepas de ciego de pollos, y de estas solo 42 disminuyeron el pH; mientras que Sánchez *et al.* (2011) aislaron un total de 24 cepas de vagina de mujeres sanas y solo el 16,6 % resistieron pH ácidos. Por

Tabla 1. Acidificación del medio de cultivo a las 24 horas

Cepa	pH	Cepa	pH
21 LvB	5,40 ^{cd}	49 LvB	5,20 ^c
23 LvB	5,70 ^d	50 LvB	3,80 ^a
36 LvB	5,50 ^{cd}	51 LvB	4,20 ^{ab}
37 LvB	4,35 ^b	52 LvB	4,00 ^{ab}
38 LvB	4,31 ^b	53 LvB	4,20 ^{ab}
39 LvB	4,31 ^b	54 LvB	4,20 ^{ab}
40 LvB	5,50 ^{cd}	60 LvB	4,30 ^b
41 LvB	5,90 ^d	62 LvB	5,60 ^{cd}
42 LvB	4,00 ^{ab}	63 LvB	6,37 ^e
43 LvB	4,25 ^{ab}	78 LvB	5,60 ^{cd}
44 LvB	4,37 ^b	81 LvB	5,60 ^{cd}
45 LvB	4,32 ^b	84 LvB	5,50 ^{cd}
46 LvB	4,32 ^b	88 LvB	5,7 ^d
47 LvB	5,50 ^{cd}	90 LvB	4,35 ^b
EE ±		0,15 **	

a, b, c, d, e: valores con superíndices diferentes difieren a $p < 0,05$ (Duncan, 1955).
** $p < 0,01$

su parte, Vera (2013) aisló 54 cepas de vagina de vacas, y 17 cepas acidificaron el medio.

En la tabla 2 se puede notar que todas las cepas tuvieron buen crecimiento, tanto para los diferentes

pH como para las distintas temperaturas. Ello indica que la adaptación de los *Lactobacillus* a las condiciones del ecosistema vaginal es una característica esencial para la supervivencia de tales microorganismos en este ambiente (Redondo-López *et al.*, 1990; Bouchard *et al.*, 2015). En la selección de cepas con efecto probiótico en el tracto urogenital, es importante comprobar la capacidad de resistencia a estas condiciones extremas para considerar que esas cepas sean capaces de crecer y colonizar la mucosa vaginal (Zárate *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2015).

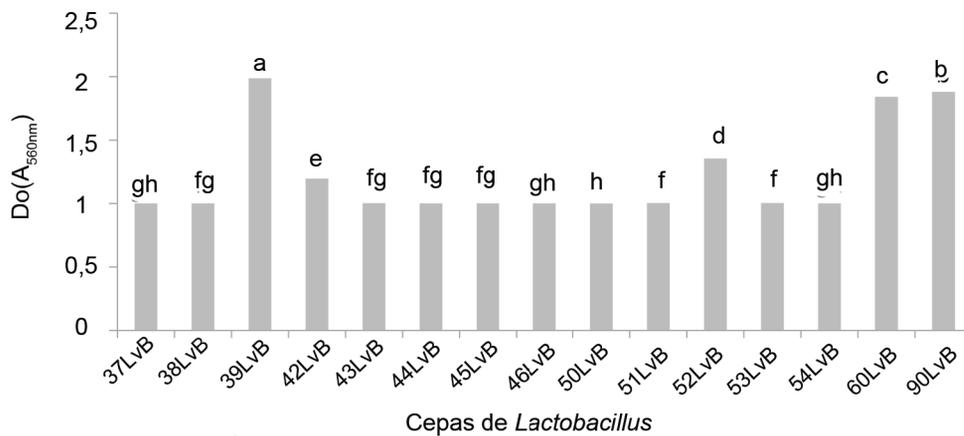
Se puede observar en la figura 1 el crecimiento de las 15 cepas seleccionadas en caldo MRS, con pH 6,5 a 37 °C. Todas alcanzaron altos valores, propiedad que debe caracterizar a las cepas probióticas para ser capaces de establecerse y lograr una alta población en la mucosa vaginal. Resultados similares obtuvieron Brolazo *et al.* (2009) al evaluar 37 cepas de *Lactobacillus* spp. de vagina de mujeres, con alta capacidad de crecimiento y fueron las que más acidificaron el pH. Por su parte, Sánchez *et al.* (2011) obtuvieron 24 cepas de *Lactobacillus* spp., también de vagina de mujeres, de las cuales nueve presentaron las mejores características probióticas.

En las figuras 2 y 3 aparecen los resultados de adherencia de los lactobacilos a los solventes orgánicos tolueno y xileno; solo las cepas 38LvB,

Tabla 2. Crecimiento (DO A_{560nm}) de las cepas aisladas a diferentes pH y temperaturas en caldo MRS, a las 24 horas

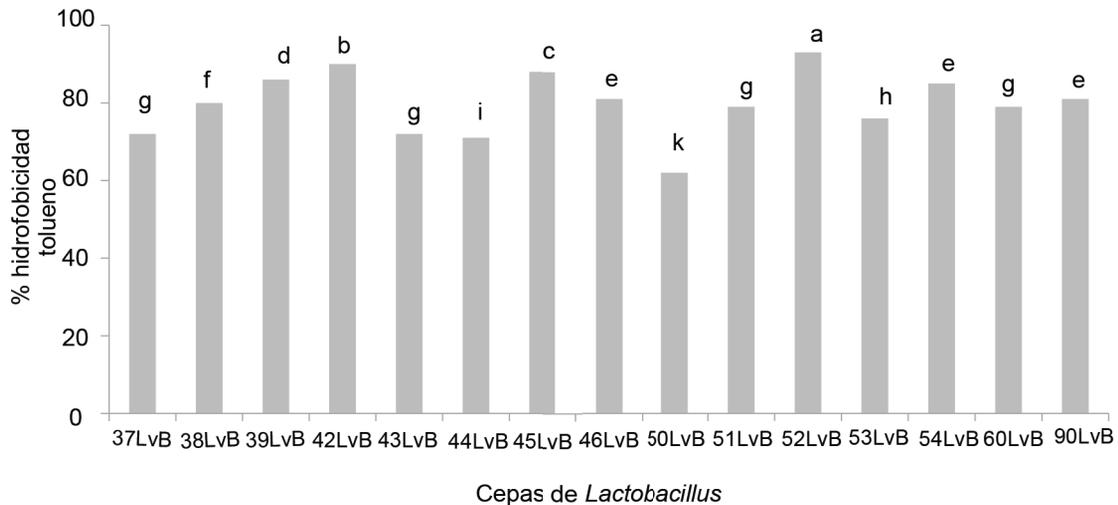
Cepa	38 °C			39 °C			40 °C		
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 6	pH 7	pH 8	pH 6	pH 7	pH 8
37	1,36 ^d	0,29 ^{def}	0,20 ^c	1,90 ^{ab}	0,24 ^f	0,21 ^l	1,32 ^{abcde}	0,17 ^c	0,14 ^c
38	1,96 ^a	1,59 ^{bcdef}	1,45 ^{bc}	1,94 ^b	1,54 ^b	1,30 ^f	0,53 ^{bcde}	1,45 ^{bcd}	1,23 ^c
39	1,97 ^a	1,55 ^a	1,33 ^{ab}	1,95 ^a	1,91 ^a	1,09 ^g	1,52 ^c	1,45 ^a	1,43 ^{ab}
42	1,68 ^c	1,58 ^{ab}	1,56 ^{ab}	1,94 ^a	1,90 ^a	1,86 ^b	1,63 ^{abc}	1,60 ^{ab}	1,52 ^{abc}
43	1,43 ^d	0,62 ^{abcde}	0,55 ^{abc}	1,88 ^{ab}	0,65 ^{de}	0,71 ⁱ	1,53 ^{abc}	0,50 ^{ab}	0,50 ^{abc}
44	1,26 ^c	0,14 ^{ef}	0,33 ^c	1,94 ^a	0,91 ^c	0,85 ⁱ	1,68 ^{abc}	0,61 ^{bcd}	0,66 ^{bc}
45	1,32 ^c	0,30 ^f	0,63 ^c	1,34 ^{cd}	0,51 ^e	0,46 ^k	1,69 ^a	0,59 ^{abcd}	0,60 ^{bc}
46	1,76 ^b	1,94 ^{abcdef}	1,83 ^{abc}	1,46 ^c	1,73 ^{ab}	1,62 ^e	1,54 ^{ab}	1,52 ^{abcd}	1,51 ^{abc}
50	0,86 ^f	0,61 ^{abc}	0,51 ^{ab}	0,34 ^f	0,03 ^f	0,18 ^m	0,63 ^{abcde}	0,57 ^{abc}	0,48 ^{abc}
51	0,72 ^g	0,60 ^{def}	0,61 ^c	0,17 ^e	0,04 ^f	0,07 ⁿ	0,97 ^e	0,82 ^{abcd}	0,81 ^c
52	1,49 ^d	1,43 ^{abcdef}	1,41 ^{abc}	1,22 ^d	1,07 ^{cd}	1,05 ^h	1,04 ^{cde}	1,03 ^{abcd}	0,01 ^c
53	1,49 ^d	1,41 ^{abcd}	1,51 ^a	1,77 ^b	1,73 ^{ab}	1,63 ^b	1,51 ^{de}	1,53 ^{abc}	1,68 ^c
54	1,50 ^d	1,41 ^{abcd}	1,51 ^a	1,85 ^{ab}	1,66 ^b	1,73 ^c	1,49 ^{abcd}	1,58 ^a	1,68 ^a
60	0,34 ^h	0,32 ^{abcde}	0,29 ^{abc}	0,98 ^d	0,61 ^{de}	0,46 ^k	0,64 ^{abcde}	0,64 ^{ab}	0,60 ^{abc}
90	1,48 ^d	1,52 ^{cdef}	1,69 ^{abc}	1,92 ^{ab}	1,93 ^a	1,95 ^a	1,53 ^{de}	1,69 ^{abcd}	1,88 ^{abc}

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n: valores con superíndices diferentes difieren a $p < 0,05$ (Duncan, 1955).



a, b, c, d, e, f, g, h: columnas con letras diferentes difieren para $p < 0,001$ (Duncan, 1955).

Figura 1. Capacidad de crecimiento de cepas de *Lactobacillus* spp. en caldo MRS, a las 24 h.



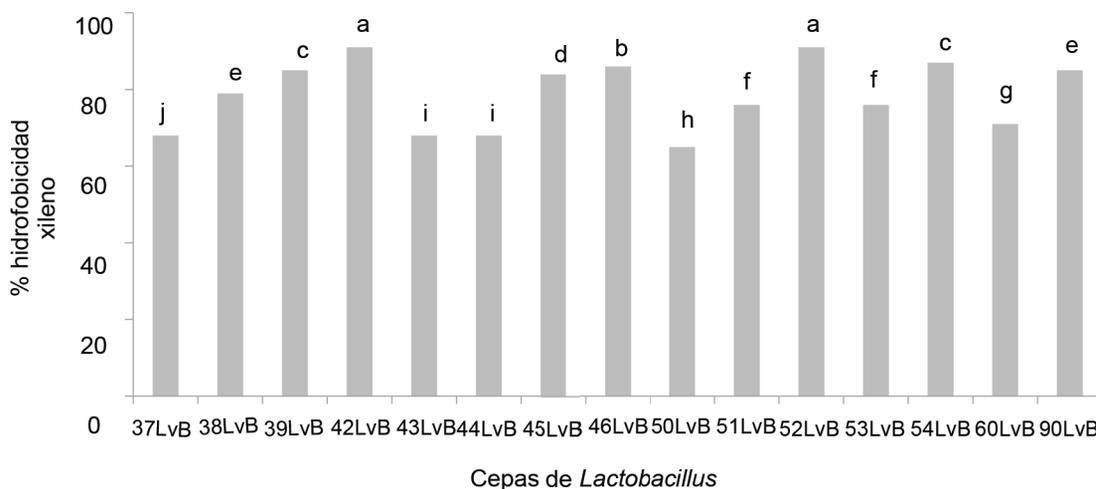
a, b, c, d, e, f, g, h, i: columnas con superíndices diferentes difieren a $p < 0,05$ (Duncan, 1955).

Figura 2. Comportamiento de la hidrofobicidad en presencia de tolueno.

39LvB, 42LvB, 45LvB, 46LvB, 52LvB, 54LvB, 60LvB y 90LvB alcanzaron valores de hidrofobicidad por encima del 80 %. La capacidad de adherencia de las bacterias al epitelio del tracto vaginal involucra diferentes mecanismos, entre los que se destaca la presencia de adhesinas en la superficie de las células bacterianas. Las adhesinas son mayoritariamente proteínas que pueden unirse a los carbohidratos que se encuentran en el glicocalix de las células epiteliales; estos carbohidratos funcionan como sitios de anclaje para las bacterias (Savage, 1992; Jewell *et al.*, 2015). Resultados similares obtuvieron Vallejo *et al.* (2008), pues las cepas de lactobacilos aisladas de queso ovino alcanzaron altos porcentajes de hidrofobicidad.

Sánchez *et al.* (2011), en cepas aisladas de vagina humana, solo encontraron nueve con las mejores características en las pruebas de hidrofobicidad. Esta propiedad es una medida que evalúa la capacidad de adherencia de los lactobacilos al epitelio o mucosa vaginal, y consiste en interacciones físicas no específicas entre dos superficies. Tal criterio de selección es el más importante, ya que, según refieren Tuomola *et al.* (2001) y Rodrigues *et al.* (2015), sin adherencia la concentración de probióticos sería baja y su efecto insuficiente.

Para determinar la capacidad de autoagregación se seleccionaron las cepas que alcanzaron más del 80 % de hidrofobicidad (38LvB, 39LvB, 42LvB,



a, b, c, d, e, f, g, h, i, j: columnas con superíndices diferentes difieren a $p < 0,05$ (Duncan, 1955).

Figura 3. Comportamiento de la hidrofobicidad en presencia de xileno.

45LvB, 46LvB, 52LvB, 54LvB y 90LvB). En la figura 4 se pueden observar los valores de sedimentación de las ocho cepas que mostraron fenotipos de fuerte autoagregación, medidos durante un período de incubación de 5 h; de estas, superaron el 80 % las cepas 38LvB y 52LvB, seguidas de 42LvB, 45LvB, 46LvB y 54LvB que alcanzaron entre 60 y 70 %.

Según García *et al.* (2007), la autoagregación en las bacterias se puede definir como el fenómeno de la agregación entre células de la misma cepa. La capacidad de autoagregación está relacionada con los componentes de la superficie celular, propiedad que no se afectó luego del lavado y suspensión de las células en *buffer* PBS. La autoagregación de

las cepas probióticas parece ser necesaria para que se dé la adhesión a células epiteliales (Kos *et al.*, 2003). La adhesión de los probióticos a las células intestinales y a la mucosa vaginal es también considerada muy importante en la estimulación del sistema inmune, y actúa como barrera frente a microorganismos patógenos (Bouridane *et al.*, 2016).

La coagregación es la agregación que ocurre entre diferentes especies. En la tabla 3 se muestra el porcentaje de coagregación que alcanzaron las células de *Lactobacillus* spp. a las paredes celulares de *E. coli*, *S. aureus* y *Klebsiella* spp., en el caldo nutriente. Todas las cepas evaluadas mostraron una coagregación mayor al 50 %, excepto LvB-52 frente

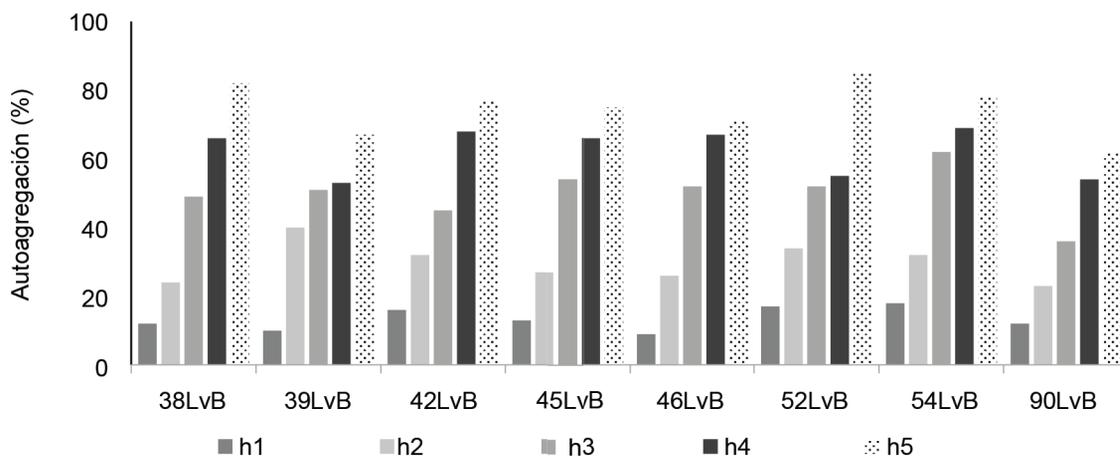


Figura 4. Capacidad de autoagregación en cepas de *Lactobacillus* spp. seleccionadas.

Tabla 3. Coagregación de las células de *Lactobacillus* spp. frente a bacterias indicadoras

Cepa indicadora	% de coagregación							
	38LvB	39LvB	42LvB	45LvB	46LvB	52LvB	54LvB	90LvB
<i>E. coli</i>	65 ^d	85 ^a	72 ^b	58 ^c	57 ^f	18 ^h	42 ^g	66 ^c
<i>S. aureus</i>	62 ^e	85 ^b	58 ^f	80 ^c	57 ^g	86 ^a	48 ^h	65 ^d
<i>Klebsiella</i> spp.	66 ^e	85 ^a	77 ^b	75 ^c	60 ^g	70 ^d	63 ^f	77 ^b

a, b, c, d, e, f, g, h: valores con superíndices diferentes difieren a $p < 0,05$ (Duncan, 1955).

a *E. coli* (18 %). La capacidad de agregación es una característica importante para cualquier estudio de las interacciones microbianas, y existe una asociación entre la habilidad de los lactobacilos para adherirse al epitelio vaginal, la agregación y la hidrofobicidad (Williams *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2015).

El hecho de que las bacterias evaluadas presentaran una alta coagregación indica que estos lactobacilos pueden tener un efecto importante sobre la regulación y equilibrio del ecosistema vaginal, y también en la estimulación del sistema inmune (De Gregorio *et al.*, 2012; Sandes, 2013). Autores como Swartz *et al.* (2014) y Minuti *et al.* (2015) describen que el efecto protector de estos microorganismos se realiza mediante dos mecanismos: antagonismo y producción de toxinas.

En la tabla 4 se muestran los resultados de la actividad antimicrobiana; a partir de las 8 hasta las

24 h, la cepa 38LvB produjo halos de inhibición superiores ($p \leq 0,001$) en los tres microorganismos indicadores. En este ensayo se utilizó el sobrenadante sin modificar, o sea, estaban presentes todas las posibles sustancias que inhibieron el crecimiento. Los mayores halos de inhibición se apreciaron en las cepas de *E. coli* ATCC-25922 y *E. coli* salvaje, a las 8, 18 y 24 h, seguidas de *Klebsiella* spp.; sin embargo, *S. aureus* no mostró inhibición.

Se conoce que la microbiota beneficiosa vaginal participa en el mantenimiento del equilibrio ecológico del área y ejerce resistencia a la colonización de patógenos causantes de la metritis bovina, como reportan Sánchez *et al.* (2011) y Zhang *et al.* (2015). Estudios realizados por Wang *et al.* (2013) y Otero *et al.* (2006) sugieren que, por su complejidad, se debe seguir investigando el ecosistema

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de las cepas indicadoras

Cepa indicadora	Cepas de lactobacilos productoras por presencia de ácidos (halo, en mm)							
	38LvB	39LvB	42LvB	45LvB	46LvB	52LvB	54LvB	90LvB
Hora 8								
<i>S. aureus</i> ATCC-29213	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. coli</i> ATCC-25922	14,0 ^f	9,65 ^a	9,89 ^b	11,45 ^c	10,75 ^c	11,45 ^c	10,74 ^c	11,25 ^d
<i>E. coli</i> spp.	13,7 ^g	5,7 ^b	5,26 ^a	11,67 ^c	5,26 ^a	13,43 ^f	6,70 ^c	9,60 ^d
<i>Klebsiella</i> spp.	8,30 ^g	7,30 ^c	7,03 ^b	8,03 ^c	7,70 ^d	8,27 ^f	6,65 ^a	8,90 ^h
Hora 18								
<i>S. aureus</i> TCC-29213	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. coli</i> ATCC-25922	10,53 ^g	8,27 ^a	8,3 ^b	10,00 ^c	9,73 ^d	10,30 ^f	9,65 ^c	10,0 ^c
<i>E. coli</i> spp.	9,17 ^h	8,70 ^c	7,70 ^b	8,90 ^f	8,30 ^d	9,03 ^g	7,68 ^a	8,20 ^c
<i>Klebsiella</i> spp.	13,43 ^f	12,03 ^{cd}	12,03 ^c	12,67 ^{de}	12,03 ^{cd}	13,37 ^{ef}	7,50 ^a	9,84 ^b
Hora 24								
<i>S. aureus</i> ATCC-29213	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. coli</i> ATCC-25922	13,80 ^h	13,27 ^f	12,03 ^d	12,30 ^e	11,03 ^c	13,73 ^g	0,25 ^a	10,30 ^b
<i>E. coli</i> spp.	10,70 ^f	10,00 ^c	9,30 ^a	9,70 ^{cd}	9,70 ^{cd}	10,53 ^f	9,80 ^d	9,50 ^{ab}
<i>Klebsiella</i> spp.	17,99 ^f	16,03 ^c	16,33 ^c	17,03 ^c	16,70 ^d	18,03 ^f	8,10 ^a	9,00 ^b

a, b, c, d, e, f, g, h: valores con superíndices diferentes en una misma columna difieren a $p < 0,05$ (Duncan, 1955).

vaginal de las vacas lecheras, la cual se asemeja a la del ecosistema humano. .

En la tabla 5 se muestra que las ocho cepas fueron resistentes a cuatro antibióticos: Amikacina, Acitromicina, Vancomicina y Neomicina. En este sentido Souza *et al.* (2007) informaron que, al realizar antibiogramas a cepas de *Lactobacillus* frente a 12 antibióticos, todas eran resistentes a la Vancomicina y al Nalidixan, y que un alto porcentaje de las cepas era resistente a la Gentamicina, resultados muy similares a los que de este estudio. En el caso específico de la Vancomicina, se demostró que la resistencia a este antibiótico es intrínseca a los integrantes del género *Lactobacillus* y que está condicionada genéticamente (Danielsen y Wind, 2003; Wage, 2003).

Sánchez *et al.* (2011), al evaluar 17 antimicrobianos frente a cepas de lactobacilos de vagina de mujeres, hallaron que siete de ellas fueron resistentes. Se conoce que el mal uso de los antibióticos puede provocar que bacterias que no eran resistentes alcancen esta condición de manera accidental, debido a que captan el ADN de las que son resistentes (Martin *et al.*, 2008). No obstante, se hace necesario el empleo de métodos genéticos específicos para depurar la presencia de plásmidos con resistencia a los antimicrobianos, como la hibridación por PRC (Tenover y Rasheed, 1999; Martina *et al.*, 2015).

De ahí la importancia del uso de probióticos como alternativa para la prevención de enfermedades

urogenitales en las vacas, que permitiría restringir el uso de los antibióticos solo a casos profilácticos, para así contribuir a la disminución de la resistencia a los antimicrobianos que también afectan al humano.

Conclusiones

Las cepas de *Lactobacillus* spp. 38LvB, 39LvB, 42LvB, 45LvB, 46LvB, 52LvB, 54LvB y 90LvB, aisladas del cérvix y la vagina de vacas criollas sanas, poseen potencial para usarse en la prevención de infecciones del tracto reproductor de la hembra del bovino, ya que estas demostraron, *in vitro*, resistencia a pH ácido, amplio espectro de actividad antimicrobiana y alta capacidad de adhesión al epitelio de la mucosa vaginal.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria Manuel Félix López, de Manabí–Ecuador– por el financiamiento del proyecto «Obtención de biopreparados probióticos con *Lactobacillus* aislados de vacas sanas para tratamientos de infecciones urogenitales en la hembra bovina».

Referencias bibliográficas

Balzarini, M. G.; Casanoves, F.; Di Rienzo, J. A.; González, L. A. & Robledo, C. W. *INFOSTAT*. Versión 1. Córdoba, Argentina, 2001.

Tabla 5. Resistencia de las cepas a diferentes antibióticos

Antimicrobiano	(µg)	Cepas de lactobacilos de vagina de vacas lecheras							
		38	39	42	45	46	52	54	90
Kanamicina	100	S	S	S	S	S	S	S	S
Amikacina	30	R	R	R	R	R	R	R	R
Ampicilina	33	S	S	S	S	S	S	S	S
Acitromicina	15	R	R	R	R	R	R	R	R
Eritromicina	200	S	S	S	S	S	S	S	S
Amoxicilina	30	S	S	S	S	S	S	S	S
Ciprofloxacina	0,5	S	S	S	S	S	S	S	S
Estreptomina	100	S	S	S	S	S	S	S	S
Vancomicina	5	R	R	R	R	R	R	R	R
Apramicina	40	S	S	S	S	S	S	S	S
Bacitracina	40	S	S	S	S	S	S	S	S
Neomicina	120	R	R	R	R	R	R	R	R
Lincomicina	19	S	S	S	S	S	S	S	S
Estreotomicina	200	S	S	S	S	S	S	S	S

S: sensible, R: resistente.

- Bauer, A. W.; Kirby, W. M.; Sherris, J. C. & Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45 (4):493-496, 1966.
- Bouchard, D. S.; Seridan, B.; Saraoui, T.; Rault, L.; Germon, P. & Gonzalez-Moreno, C. *et al.* Lactic acid bacteria isolated from bovine mammary microbiota: potential allies against bovine mastitis. *PLoS One.* 10 (12):e0144831, 2015.
- Bouridane, H.; Sifour, M.; Idoui, T.; Annick, L. & Thonard, P. Technological and probiotic traits of the *Lactobacilli* isolated from vaginal tract of the healthy women for probiotic use. *Iran. J. Biotechnol.* 14 (3):192-201, 2016.
- Brolazo, E.; Simoes, J. A.; Nader, M. E. F.; Juárez, T. M. S.; Bueno, G. & Marconi, C. Prevalencia y caracterización de especies de lactobacilos vaginales en las mujeres en edad reproductiva sin vulvovaginitis. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 31:189-189, 2009.
- Danielsen, M. & Wind, A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 82 (1):1-11, 2003.
- De Gregorio, Priscilla R.; Juárez, M.; Santosa, V. & Nader-Macias, M. E. F. Lactobacilos beneficiosos: efectos en el tracto vaginal en un modelo experimental murino. *Antonie van Leeuwenhoek.* 102 (4):569-580, 2012.
- De Mann, J. C.; Rogosa, M. A. & Sharpe, M. Elizabeth. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23 (1):130-135, 1960.
- Duncan, D. B. Multiple ranges and multiple F test. *Biometrics.* 11 (1):1-55, 1955.
- Falentin, Hélène; Rault, Lucie; Nicolas, Aurélie; Bouchard, D. S.; Lassalas, J.; Lambertson, P. *et al.* Bovine teat microbiome analysis revealed reduced alpha diversity and significant changes in taxonomic profiles in quarters with a history of mastitis. *Front Microbiol.* <http://10.3389/fmicb.2016.00480>, 2016.
- García, Y.; Boucourt, R.; Albelo, N. & Núñez, O. Fermentación de inulina por bacterias ácido lácticas con características probióticas. *Rev. cubana Cienc. agríc.* 41 (3):263-266, 2007.
- Jewell, Kelsea A.; McCormick, Caroline A.; Odt, Christine L.; Weimer, P. J. & Suen, G. Ruminant bacterial community composition in dairy cows is dynamic over the course of two lactations and correlates with feed efficiency. *Appl. Environ. Microbiol.* 81 (14):4697-4710, 2015.
- Kos, B.; Susković, J.; Vuković, S.; Simpraga, M.; Frece, J. & Matosić, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* 94 (6):891-987, 2003.
- Leccese, M. C.; Terraf, M. S.; Juárez, T.; Nader-Macias, M. E. F. & Silva, C. Detección de la formación de biopelículas por lactobacilos vaginales beneficioso y la influencia de los componentes de medios de cultivos. *Revista Microbiología Aplicada.* 113:1517-1521, 2012.
- Martín, R.; Soberón, N.; Vanechoutte, M.; Flórez, A. B.; Vázquez, F. & Suárez, J. E. Characterization of indigenous vaginal lactobacilli from healthy women as probiotic candidates. *Int. Microbiol.* 11 (4):261-266, 2008.
- Martina, A.; Gärtner, A. B.; Nicole, B.; Markus, J.; Ralf, E. & Christoph, G. Detection and characterisation of *Lactobacillus* spp. in the bovine uterus and their influence on bovine endometrial epithelial cells *in vitro*. *PLoS One.* 10 (3), 2015.
- Minuti, A.; Palladino, A.; Khan, M. J.; Alqarni, S.; Agrawal, A.; Piccioli-Capelli, F. *et al.* Abundance of ruminal bacteria, epithelial gene expression, and systemic biomarkers of metabolism and inflammation are altered during the periparturition period in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98 (12):8940-8951, 2015.
- Nazef, L.; Belguesmia, Y.; Tani, A.; Prévost, H. & Drider, D. Identification of lactic acid bacteria from poultry feces: evidence on anti-campylobacter and anti-listeria activities. *Poult. Sci.* 87 (2):329-334, 2008.
- Orla-Jensen, S. La classification des bacterias lactiques. *Lait.* 4:468-472, 1917.
- Orlowski, A. & Bielecka, Maria. Preliminary characteristics of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains as probiotic candidates. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 15/56 (3):269-275, 2006.
- Otero, M. C.; Morelli, L. & Nader-Macias, M. E. Probiotic properties of vaginal lactic acid bacteria to prevent metritis in cattle. *Lett. Appl. Microbiol.* 43 (1):91-97, 2006.
- Pérez, P. F.; Minnaard, Yessica; Disalvo, E. A. & De Antoni, Graciela L. Surface properties of *Bifidobacterium* strain of human origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1):21-26, 1998.
- Redondo-López, V.; Cook, R. L. & Sobel, J. D. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev. Infect. Dis.* 12 (5):856-872, 1990.
- Rodrigues, N. F.; Kästle, J.; Coutinho, T. J.; Amorim, A. T.; Campos, G. B.; Santos, V. M. *et al.* Qualitative analysis of the vaginal microbiota of healthy cattle and cattle with genital-tract disease. *Genet. Mol. Res.* 14 (2):6518-6528, 2015.
- Rondón, A. J. *Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de pollos y evaluación de su efecto probiótico en estos animales.* Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias, 2009.
- Sánchez, Lilian; Omura, Michele; Lucas, A.; Pérez, Tania; Llanes, Marisleidys & Ferreira, Celia de

- L. Cepas de *Lactobacillus* spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. *Rev. Salud Anim.* 37 (2):94-104, 2015.
- Sandes, S. H. *Selección de bacterias lácticas con potencial para uso como promotor de crecimiento y como adyuvante inmune en mucosa de vagina bovina*. Tesis de maestría. Brasil: Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Federal de Minas Gerais, 2013.
- Savage, D. C. Growth phase, cellular hydrophobicity, and adhesion *in vitro* of lactobacilli colonizing the keratinizing gastric epithelium in the mouse. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (6):1992-1995, 1992.
- Schillinger, U. & Lücke, F. K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (8):1901-1906, 1989.
- Sheldon, I. M.; Lewis, G. S.; LeBlanc, S. & Gilbert, R. O. Defining post partum uterine disease in cattle. *Theriogenology.* 65:1516-1530, 2006.
- Souza, M. R.; Moreira, J. L.; Barbosa, F. H. F.; Cerqueira, M. M. O.; Nunes, A. C. & Nicoli, J. R. Influence of intensive and extensive breeding on lactic acid bacteria isolated from *Gallus gallus domesticus* ceca. *Vet. Microbiol.* 120:142-150, 2007.
- Swartz, J. D.; Lachman, Medora; Westveer, Kelsey; O'Neill, T.; Geary, T.; Kott, R. W. *et al.* Characterization of the vaginal microbiota of ewes and cows reveals a unique microbiota with low levels of Lactobacilli and near-neutral pH. *Front Vet. Sci.* 1:19, 2014.
- Tenover, F. C. & Rasheed, J. K. Genetic methods for detecting antibacterial and antiviral resistance genes. In: P. R. Murray, ed. *Manual of Clinical Microbiology.* 7th ed. Washington, D.C: ASM Press. p. 1578-1592, 1999.
- Tuomola, E.; Crittenden, R.; Playne, E.; Isolauri, E. & Salminen, R. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (2 suppl.):393S-398S, 2001.
- Vallejo, M.; Marguet, E. R. & Etchehoury, V. E. Potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus* aisladas de quesos ovinos patagónicos. *RESPYN.* 9 (4):24-30, 2008.
- Vera, A. *Aislamiento de cepas de Lactobacillus spp. de vaginas de la hembra bovino*. Tesis presentada en opción a título de Médico Veterinario, 2013.
- Wage, S. W. *The role of enteric antibiotics in livestock production*. Canberra, Australia: Avcare Limited, 2003.
- Wang, Yvonne; Ametaj, B. N.; Ambrose, D. J. & Gänzle, M. G. Characterisation of the bacterial microbiota of the vagina of dairy cows and isolation of pediocin-producing *Pediococcus acidilactici*. *BMC Microbiology.* 13:1-11. <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1471-2180-13-19?site=bmcmicrobiol.biomedcentral.com>, 2013.
- Williams, E. J.; Fischer, D. P.; Noakes, D. E.; England, G. C. W.; Rycroft, A. & Sheldon, I. M. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology.* 68 (4):549-859, 2007.
- Zárate, Gabriela; Juárez, María S. & Nader-Macias, María E. Effect of some pharmaceutical excipients on the survival of probiotic vaginal lactobacilli. *Can. J. Microbiol.* 51 (6):483-489, 2005.
- Zhang, R.; Huo, W.; Zhu, W. & Mao, S. Characterization of bacterial community of raw milk from dairy cows during subacute ruminal acidosis challenge by high-throughput sequencing. *J. Sci. Food Agric.* 95 (5):1072-1079, 2015.

Recibido el 9 de noviembre del 2016

Aceptado el 3 de julio del 2017