

Artículo de investigación

Efecto de *Lactobacillus lactis* microencapsulado sobre *Klebsiella pneumoniae* bajo condiciones gastrointestinales *in-vitro*

Effect of microencapsulated *Lactobacillus lactis* on *Klebsiella pneumoniae* under *in-vitro* gastrointestinal conditions

Henry Jurado-Gómez¹ ✉, Jhon Fredy Ceron-Cordoba² ✉

¹Zoot. Ms.C, PhD. Profesor tiempo completo, Departamento de Producción y Procesamiento Animal, Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia

²Zoot. Ms.C. Investigador, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia.

Recepción: 12-feb-2024 **Aceptado:** 28-abril-2024 **Publicado:** 23-julio-2024

Cómo citar: Jurado-Gómez, H., & Ceron Cordoba, J. F. (2024). Efecto de *Lactobacillus lactis* microencapsulado sobre *Klebsiella pneumoniae* bajo condiciones gastrointestinales *in-vitro*. *Ciencia en Desarrollo*, 15(2). <https://doi.org/10.19053/uptc.01217488.v15.n2.2024.17201>

Resumen

K. pneumoniae se encuentra de forma nativa en el tracto respiratorio y gastrointestinal de humanos, animales domésticos y salvajes con posibles vínculos zoonóticos. Está comúnmente asociada con infecciones nosocomiales y en algunos alimentos se ha reportado como vector de transmisión. Los *Lactobacillus* se consideran una alternativa preventiva para el uso de antibióticos en salud animal y humana, gracias a la producción de ácido láctico, ácidos orgánicos, exopolisacáridos (EPS) y metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas, antioxidantes, reológicas y conservación de alimentos. El objetivo de la investigación es evaluar el potencial inhibitorio de *Lactobacillus lactis* microencapsulado mediante secado por aspersión sobre *Klebsiella pneumoniae* bajo condiciones gastrointestinales *in-vitro*. Se realizaron pruebas preliminares como crecimiento a diferente temperatura (37°C y 42°C), producción de gas y actividad de catalasa. Posteriormente se realizó cinética de fermentación donde se evaluó UFC/mL, consumo de azúcar (mg/L), producción de proteínas, pH y producción de ácido láctico. La microencapsulación se realizó mediante secado por aspersión con inulina (5%) y maltodextrina (5%), el producto resultante se almacenó por 50 días. El estudio estructural, de estabilidad y supervivencia en condiciones gastrointestinales *in-vitro* se realizaron después del periodo de almacén. Finalmente se efectuaron las pruebas de inhibición de *L. lactis* sobre *K. pneumoniae*. Los resultados permiten concluir que existe efecto protector sobre *L. lactis* microencapsulado y respuesta inhibitoria de la cepa láctica sobre *K. pneumoniae*.

Palabras Clave: *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus*, microencapsulación, salud humana, salud animal, zoonosis.

Abstract

K. pneumoniae is found natively in the respiratory and gastrointestinal tracts of humans, domestic and wild animals with possible zoonotic links. It is commonly associated with nosocomial infections and has been reported in some foods as a vector of transmission. *Lactobacillus* are considered a preventive alternative to the use of antibiotics in animal and human health, thanks to the production of lactic acid, organic acids, exopolysaccharides (EPS) and secondary metabolites with antibacterial, antioxidant, rheological and food preservation properties. The objective of the research is to evaluate the inhibitory potential of *Lactobacillus lactis* microencapsulated by spray drying on *Klebsiella pneumoniae* under gastrointestinal conditions *in-vitro*. Preliminary tests were conducted, including growth at different temperatures (37°C and 42°C), gas production, and catalase activity. Subsequently, fermentation kinetics were performed, evaluating CFU/mL, sugar consumption (mg/L), protein production, pH, and lactic acid production. Microencapsulation was carried out through spray drying with inulin (5%) and maltodextrin (5%), and the resulting product was stored for 50 days. Structural, stability, and survival studies under *in-vitro* gastrointestinal conditions were conducted after the storage period. Finally, inhibition tests of *L. lactis* on *K. pneumoniae* were performed. The results allow us to conclude that there is a protective effect on microencapsulated *L. lactis* and an inhibitory response of the lactic strain on *K. pneumoniae*.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus*, microencapsulation, human health, animal health, zoonosis.



1. Introducción

Las especies del género *Klebsiella* (*K.*) pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, bacterias Gram-negativas, no móviles, generalmente capsuladas, anaerobias facultativas, ubicuas y se encuentran distribuidas en el ambiente como el agua y el suelo [1]. El género comprende ocho especies pero se destaca *K. pneumoniae* por ser responsable de la mayoría de las infecciones animales, humanas y es considerado multirresistente a antibióticos [2], se encuentra de forma nativa en los tractos respiratorio y gastrointestinal de humanos, animales domésticos y salvajes con posibles vínculos zoonóticos [3], además, es catalogado como contaminante común en ambientes clínicos, alimentos crudos y listos para consumir como carne, verduras frescas, leche, pescado y alimentos callejeros [4].

Aunque *K. pneumoniae* está comúnmente asociada con infecciones nosocomiales, se han reportado algunos alimentos como vector de transmisión [5]. La infección por esta bacteria patógena causa enfermedades como meningitis, bronquitis, bacteriemia, neumonía e infecciones urinarias [2, 4, 5], que afectan principalmente a recién nacidos, personas mayores y pacientes con sistemas inmunológicos débiles [3].

Por otro lado, *K. pneumoniae* forma parte del microbioma causante de mastitis clínica y subclínica en ganado lechero [6]. Se transmite de animales infectados a sanas, siendo considerada la segunda causa más común de mastitis bovina y la más perjudicial en la disminución de la producción y calidad de la leche, así como en términos económicos [7]. Se han reportado cepas de *K. pneumoniae* en diversas matrices alimentarias y aislamientos de animales en producción resistente a antibióticos; la OMS ha clasificado a *K. pneumoniae* como patógenos prioritarios críticos en su lista de bacterias resistentes a los antibióticos que necesitan nuevos tratamientos [8, 9].

Los microorganismos probióticos alteran principalmente la homeostasis intestinal debido a la secreción de metabolitos con propiedades antimicrobianas que actúan como estimulantes inmunológicos, mejoran la resistencia y estimulan el proceso de digestión, lo que conduce al bienestar general [10, 11]. Además, se consideran una alternativa preventiva para el uso de antibióticos en salud animal y humana [12, 13]. Para lograr los beneficios en el hospedero las bacterias probióticas deben ser viables y estar disponibles en altas concentraciones (típicamente 10^6 - 10^7 UFC/g) [14].

Algunos autores mencionan que la incorporación en diversas matrices alimentarias es ideal para suministrar probióticos a los animales en comparación con la aplicación directa a los sistemas de cría [15]. Se ha demostrado en diversos estudios que algunas especies del género *Lactobacillus* (*L.*), modulan las poblaciones patógenas: *L. casei*, controla las poblaciones de coliformes en pollos [15]; *L. reuteri*, inhibe el crecimiento de *Helicobacter pylori* [16]; *L. plantarum*, contrarresta *Escherichia coli* [17]; y *L. lactis*, presenta potencial para disminuir poblaciones de bacterianas patógenas [11].

Los *Lactobacillus* tiene una amplia aplicación gracias a la producción de ácido láctico, ácidos orgánicos, PS) y, metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas, antioxidantes, reológicas y conservación de alimentos [18]. Además, se pue-

den encontrar en alimentos fermentados de forma natural o añadidos como yogurt, encurtidos, kéfir, kombucha, miso, tempeh, pan, kimchi, masa madre, quesos madurados, leche, productos cárnicos, chocolates, cereales, frutas y verduras [19-22].

Las células probióticas libres son menos eficientes y disminuye la biodisponibilidad bajo condiciones adversas (humedad, temperatura, presión y paso por el sistema gastrointestinal superior); sin embargo, la microencapsulación es una técnica que permite crear un ambiente que mejorar la supervivencia frente a medios inadecuados y aumentar el efecto de su actividad [23, 24]. Se han utilizado varias técnicas de encapsulación para la microencapsulación de probióticos, incluyendo extrusión, liofilización, secado por aspersión, emulsificación, coacervación, electrohilado y electropulverización [25], se usa ampliamente el secado por aspersión debido a su eficiencia, bajo costo operativo, es adecuada para aplicaciones industriales, es altamente reproducible, prolonga el tiempo de conservación, facilita liberación gradual y controlada de bioactivos [26].

Los métodos para la evaluación de digestión *in-vitro* son adecuados para simular la digestión de alimentos, su implementación permite simular de manera controlada y reproducible las condiciones del ambiente gastrointestinal, que facilita el estudio del comportamiento y eficacia de los probióticos [27]. El éxito de la implementación de probióticos en la alimentación depende de las evaluaciones *in-vitro* que permiten predecir respuestas *in-vivo* [28].

El objetivo de la investigación es evaluar el potencial inhibitorio de *Lactobacillus lactis* microencapsulado mediante secado por aspersión sobre *Klebsiella pneumoniae* bajo condiciones gastrointestinales *in-vitro*.

2. Metodología

En la investigación se usaron las cepas comerciales *L. lactis* ATCC 19435 y *K. pneumoniae* que se compraron a los distribuidores MDM Científica S.A, Medellín, Colombia.

Se realizaron estudios preliminares a la cepa láctica para caracterizar sus propiedades generales; para ello se evaluó crecimiento a dos temperaturas diferentes (34°C y 42°C) (anaerobiosis) [29], ensayos de producción de gas, y actividad de catalasa [29].

Se realizó cinética de fermentación de *L. lactis* por 24 horas a 37°C (anaerobiosis) y se tomaron muestras cada 3 horas para determinar las variables cinéticas UFC/mL, consumo de azúcar (mg/L) [30], producción de proteínas (mg/L) [31], pH y producción de ácido láctico [32].

La microencapsulación de *L. lactis* mediante spray-drying se hizo bajo los siguientes parámetros de equipo: temperatura de entrada 155 °C, temperatura de salida 75 °C en un ciclo de 2 horas. Se preparó 500 mL de suspensión en combinación con inóculo láctico + maltodextrina (5 % p/p = 25g) + inulina (5 % p/p = 25 g). El producto microencapsulado se acopió en bolsas metalizadas zipper a temperatura ambiente (18 °C) durante 50 días.

Para evaluar la estabilidad del microencapsulado después del proceso de secado por aspersión y almacen por 50 días, se evaluaron los parámetros fisicoquímicos viabilidad (%), humedad (%), A_w , humedad (%), solubilidad (%), humectabilidad (minutos), eficiencia de microencapsulación (%), morfología y tamaño de cápsula [33].

El microencapsulado se sometió a pruebas gastrointestinales in-vitro, de acuerdo a los métodos propuestos por Brodtkorb et al [27] y Guo et al [25]. Se incorporó 1 g de microencapsulado en 100 mL de agua destilada. Se introdujeron 25 mL de una solución tampón fosfato (0.1 M; pH 6) y 10 mL de HCl 0.2 M, seguido de una agitación durante 5 minutos (Fase I). El pH se ajustó a 2 mediante la adición de HCl 1 M, y se mezcló adecuadamente con la incorporación de 1 mL de una solución de pepsina en HCl 0,2 M (con una concentración de 25 mg/ml), el recipiente se selló y se incubó a 40°C durante 120 minutos (Fase II). Posteriormente, se añadieron 10 mL de una solución tamponada de fosfato (0,2 M; pH 6,8) y 5 mL de una solución de NaOH 0,6 M para mantener un pH constante de 6,8 (usando NaOH 1 M). Se agregó 1 mL de una solución de pancreatina de 100 mg/ml (porcina, grado VI, Sigma n.P-1750), y los recipientes se sellaron para ser incubados a 37 °C durante 300 minutos (Fase III). Se tomó 1 mL de muestra de cada fase para el recuento en placa.

Finalmente, se evaluó la capacidad inhibitoria de la cepa láctica frente a la cepa patógena, para ello se utilizaron 4 métodos: I. discos de agar impregnados, II. PADS impregnados, III. Capa sencilla, IV. difusión en doble capa con las concentraciones de 80 μ L, 90 μ L y 100 μ L, respectivamente, el criterio de selección como inhibición positiva fue halo mayor o igual a 2 mm, según lo establecido por Jurado-Gómez et al [34]. Un halo de inhibición son zonas sin crecimiento bacteriano que se forman alrededor de colonias y se miden en mm, lo cual es un indicio del control biológico de un microorganismo [35].

Para la evaluación de las variables fisicoquímicas de microencapsulación, simulación gástrica e inhibición se utilizó estadística descriptiva con un nivel de significancia del 5%. Para la cinética de fermentación se tomaron cinco muestras por cada parámetro en cada tiempo, y se utilizó un diseño de medidas repetidas en el tiempo con un tratamiento medio MRS como factores fijos y el tiempo como factor aleatorio a un nivel de significancia del 5%. Los resultados se organizaron en una hoja Excel® y los análisis se realizaron en el software estadístico R (4.0.0, 2018).

3. Resultados y discusión

La evaluación de crecimiento bacteriano a temperaturas diferentes mostró densidades de UFC iguales a $3,2 \times 10^{10}$ UFC/mL para 34 °C y $3,1 \times 10^8$ UFC/mL para 42 °C, y resultados negativos para la producción de gas y actividad de catalasa. Las pruebas mencionadas junto a la tinción de Gram, se usan para clasificar BAL por características fisiológicas y bioquímicas [36]. Las variaciones de las condiciones de temperatura para crecimiento de *Lactobacillus* tienen efecto directo sobre la población bacteriana, la producción de ácidos grasos de cadena corta (a. acético, a. propiónico y a. isovalérico) y producción de gas; sin embargo, las BAL responden a cambios

de temperatura como forma de adaptación a las condiciones ambientales [37, 38]. Si bien el crecimiento de BAL se da entre el rango 30 °C a 42°C, el máximo crecimiento se presenta a 37 °C, temperatura a la cual la producción de ácido láctico predomina. Estudios realizados por Hadinia et al [37] y Sánchez [39] presentan datos similares al presente estudio, donde el mayor crecimiento microbiano se expresa en torno a los 37 °C.

De acuerdo con lo expuesto por Zhang et al [40], factores como la temperatura, concentración de glucosa, cultivo iniciador y el tiempo de fermentación afectan significativamente la producción de *Lactobacillus*; además, indican que la fermentación a 37 °C potencializa la producción de EPS. Durante el proceso fermentativo se liberan EPS, polímeros ramificados de azúcares o derivados con valor comercial debido a sus propiedades como texturizantes alimentarios y sus atributos promotores de salud [41], los EPS se caracterizan por funcionar como una capsula protectora que envuelve las células como mecanismo de protección contra fagocitosis, desecación, estrés osmótico y para fines terapéuticos por sus propiedades antimicrobianas, inomoduladoras, antiinflamatorias, antioxidantes, antivirales y reducción de colesterol [42].

Los resultados correspondientes a la prueba de catalasa indican lo mencionado por Freire et al [36], quienes manifiestan que las BAL son las únicas carentes de catalasa (enzima que degrada el peróxido de hidrógeno H_2O_2) que pueden crecer en condiciones aeróbicas, es decir, no hay producción de burbujeo ni efervescencia cuando se exponen la BAL al peróxido de hidrógeno. Sánchez et al [39], obtuvieron resultados negativos para catalasa en 17 cepas de *Lactobacillus* aisladas, al igual que Alizadeh et al [43], quienes reportan catalasa negativa para *L. plantarum*. Las bacterias del género *Lactobacillus* generalmente no producen gas durante la fermentación de carbohidratos, por tanto, no se observa la formación de burbujas o cambios en el medio, tal como lo mencionan Minervini y Calasso [44].

Hu et al [45] suministraron *L. plantarum* a cerdos logrando disminuir la emisión de NH_3 fecal; además, la acción de probióticos en dietas reduce los niveles de amoníaco y de materia orgánica volátil en cerdos en fase de crecimiento [45]. Por otra parte, en la elaboración de queso estilo cheddar la producción de gases indeseables se presenta a temperaturas de 12 °C por la acción de *L. wasatchensis* [38]. La producción de gas se puede presentar a diferentes temperaturas entre cepas de BAL, por lo que es recomendable controlar y evaluar las condiciones de fermentación.

Los datos obtenidos de la cinética de fermentación indican que la fase exponencial de crecimiento para *L. lactis* ocurre a las 12 horas, con los siguientes valores: 23.30 Ln UFC/mL, consumo de azúcar de 6.32 mg/L, producción de proteína de 5.21 mg/L y un 1.34% de ácido láctico (Figura 1). Al igual que la cinética de fermentación realizada por Alvarez et al [46] para evaluar *L. casei* en suero de leche desproteinizado, el efecto de la acumulación de ácido láctico en el medio de cultivo inhibe el crecimiento de la biomasa y decrece en el tiempo después de alcanzar un punto máximo de UFC (Figura 1).

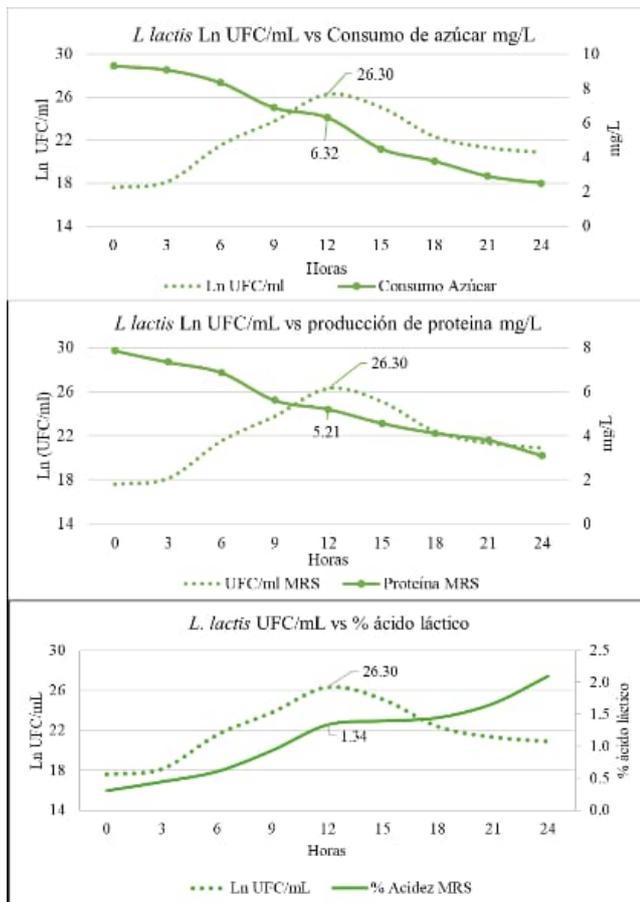


Figura 1: Parámetros de cinética de fermentación para la cepa *L. Lactis*: Ln UFC / mL, consumo de azúcar, consumo de proteína y % ácido láctico

El tiempo de latencia para *L. lactis* fue de 3 horas, similar a los resultados encontrados por Goranov et al [47] para las cepas *L. casei spp. rhamnosus* y *L. casei spp. casei*, periodo en el cual las células comienzan a sintetizar estructuras celulares y enzimas necesarias de adaptación al medio de cultivo y aprovechar las fuentes de nitrógeno y carbono para el crecimiento y desarrollo celular; además, los autores reportan una fase exponencial final a las 24 horas con crecimiento alrededor de los 10^{13} UFC/mL para las dos cepas estudiadas.

El consumo de azúcar como fuente de carbono en BAL crece a medida que incrementa la producción de UFC, donde se han reportado valores de consumo de azúcar en fase exponencial de 1.79 mg/L para *L. gasseri* [48] y 6.98 mg/L para *L. plantarum* [17]. Las bacterias absorben y utilizan todo tipo de fuentes de carbono como materia prima para la síntesis biomasa y como principal fuente de energía para el metabolismo bacteriano [49]. De acuerdo a lo mencionado por Bolívar-Jacobo et al [50], una mayor disponibilidad de proteínas y consumo de las mismas, principalmente proteínas séricas, favorecen el crecimiento de BAL. Romero- Benavides et al [48], reportan valores para consumo de proteína en *L. gasseri* de 0.66 mg/L y Jurado-Gámez et al [51] un consumo de 1.61 mg/mL para *L. plantarum*.

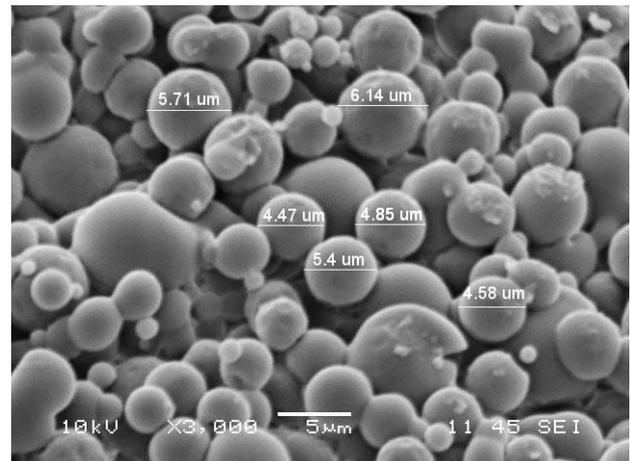


Figura 2: Microfotografía por microscopía electrónica de barrido - SEM

De acuerdo con Wu et al [52], las BAL producen grandes cantidades de ácidos orgánicos como el ácido láctico y el ácido acético en el proceso de metabolismo, lo que reduce el pH del medio de fermentación y mejora la ventaja de supervivencia frente a otras bacterias, tal como se presenta en la figura 1. Además, mencionan que el pH es un parámetro importante para la actividad enzimática, por lo que todo el metabolismo del microorganismo se ve afectado entorno a las diversas variables del proceso fermentativo, y sugieren que el control de pH puede mejorar la producción de ácido Gamma-aminobutírico (GABA).

Los parámetros fisicoquímicos del microencapsulado, evaluados bajo los criterios establecidos para el proceso de spray-drying, arrojaron los siguientes resultados: viabilidad del $2,8 \times 10^{10}$ UFC/mL, humedad del 4.3 %, Aw de 0.42, solubilidad del 82 %, humectabilidad en 1:56 minutos y una eficiencia de microencapsulación del 89 %. La caracterización mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) reveló que las partículas que componen el polvo microencapsulado son esféricas- regulares, con una capa externa lisa, y un diámetro de partícula que oscila entre 4.58 y 6.14 μm (Figura 2).

Yin et al [53], microencapsularon *L. rhamnosus* mediante secado por aspersión con proteína de suero lácteo y goma arábiga, como resultado obtuvieron tamaños de partícula desde los 20.25 μm hasta 38.16 μm , viabilidad de $1,25 \times 10^{10}$ UFC/g, humedad de 4.07 a 4.94 %, higroscopicidad de 6.42 a 9.06 g/100 g y Aw de 0.152 a 0.196. La higroscopicidad es la capacidad de los polvos para absorber la humedad del entorno, que afecta la estabilidad fisicoquímica, vida útil y fluides de polvos [54].

Sarabandi et al [54], reportan valores de solubilidad entre 94.31 a 98.78 % y humectabilidad de 7 a 262 segundos (s); además, mencionan que el tiempo de humectabilidad y los valores de solubilidad se ven influenciados por el tipo de material microencapsulado. Los valores obtenidos para Aw y humedad están por debajo de los límites críticos establecidos para alimentos o sustratos en polvo, previniendo la muerte

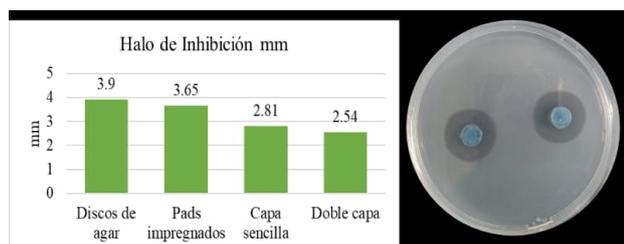


Figura 3: Halos de inhibición formados por *L. lactis* sobre *K. pneumoniae*. Halos formados por discos de agar.

celular por largos periodos de almacenamiento [53].

El recuento UFC en la evaluación gastrointestinal *in-vitro* indicó crecimientos de $3,2 \times 10^9$ UFC/mL, mayor al recomendado en literatura. Sultana et al [55], recomiendan que se deben suministrar probióticos en una concentración de 10^6 a 10^7 UFC/mL a través de los productos alimenticios, de esta manera garantizar colonización a nivel intestinal. Chen [56], demuestra la protección de *L. bulgaricus* mediante la microencapsulación por extrusión con leche y alginato y sometido a condiciones gastrointestinales (jugo gástrico 2.5 pH y sal biliar 1 %) con una tasa de supervivencia del 100 %.

El bajo nivel de pH (acidez) en tracto gástrico, enzimas digestivas y bilis en tracto intestinal afectan la cantidad de células probióticas viables que determina los beneficios en la salud humana [56]; sin embargo, la microencapsulación de probióticos ofrece protección contra factores limitantes de las células que surgen durante la producción alimentaria o en el tracto gastrointestinal humano y/o animal [57]. En este sentido, González et al [58], microencapsularon (secado por aspersión) oleuropeína (compuesto fenólico antioxidante, antihipertensivo, hipoglucemiante, actividad hipocolesterolémico y cardioprotector) con inulina y maltodextrina, obteniendo mayor disponibilidad del compuesto bioactivo después de someter a condiciones gastrointestinales con maltodextrina, posiblemente por la mayor solubilidad en agua. Al igual, Sultana et al [55], evaluaron células libres de *L. casei* y microencapsulados en jugo de naranja, en 30 días las células libres se redujeron de 7.88 log UFC/mL a 5.47 UFC/mL, en contraste, el material encapsulado no disminuyó significativamente.

Los resultados obtenidos en las pruebas de inhibición muestran el potencial inhibitorio de *L. lactis* sobre *K. pneumoniae* (Figura 3). El estudio de inhibición de *L. lactis* sobre *K. pneumoniae* indica que mediante los cuatro métodos evaluados la BAL tiene la capacidad de controlar el crecimiento de la bacteria patógena. El método con mayor inhibición fue el disco de agar y el de menor inhibición fue doble capa; todos los halos formados por los diferentes métodos, en diferentes condiciones y concentraciones, demuestran que tanto biomasa como el sobrenadante de *L. lactis* inhiben el crecimiento de *K. pneumoniae*.

Los microorganismos responsables de las ETA Enfermedades Transmitidas por Alimentos) corresponden a los géneros *Salmonella*, *Klebsiella* y *Shigella* [59], aunque se ha reportado que estas bacterias patógenas son resistentes a los antibióticos

existe la posibilidad de controlarlas con el uso de BAL [60], de esta forma los probióticos se convierten en un Sistema alternativo en salud preventiva y seguridad alimentaria. El potencial bactericida de las BAL se da gracias a la formación metabólica de ácidos orgánicos, la acidificación del ambiente, la adhesión celular, el biofilm y el control de genes virulentos (atpD, aguD) [61]. Las cepas probióticas tienen propiedades intrínsecas de cada especie y presentan mecanismos diferentes para la inhibición y el crecimiento de biomasa [34].

Khongkool [62], evaluó la actividad probiótica de *L. plantarum* dando como resultado la inhibición de bacterias patógenas como *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *S. typhimurium*. Liu et al [63], evaluaron el poder inhibitorio de *L. johnsonii* sobre *K. pneumoniae* obteniendo halos de inhibición de 1.955 cm a 1.755 cm, resultados similares a la presente investigación que sugieren que *Lactobacillus* podría competir por los sitios ecológicos limitados en el complejo ambiente intestinal; evitar que *Klebsiella* y otras bacterias patógenas se adhieran y se reproduzcan; y mejorar la capacidad de la mucosa intestinal para sintetizar y secretar péptidos antimicrobianos [63].

4. Conclusiones

La microencapsulación de *L. lactis* con inulina y maltodextrina como material encapsulante presentó parámetros de viabilidad y supervivencia aceptables, que al ser sometidos a condiciones gastrointestinales *In-vitro*, mostró una supervivencia del microorganismo mayor a 10^7 UFC/mL. *L. lactis* presentó actividad inhibitoria sobre *K. pneumoniae* y podría competir con *K. pneumoniae* por sitios ecológicos intestinales. Los halos de mayor inhibición se presentaron por discos de agar que se caracteriza por el contacto directo entre la cepa láctica y la cepa patógena, además, la evaluación con los pads impregnados indican que los productos generados por el crecimiento bacteriano contenidos en el sobrenadante tienen efecto sobre la bacteria patógena.

Contribución de los autores

Los autores confirman su contribución al artículo de la siguiente manera:

Todos los autores revisaron los resultados revisaron los resultados y aprobaron la versión final del manuscrito.

Declaración de fuentes de financiación

La presente investigación se llevó a cabo mediante la financiación del Grupo de Investigación PROBIOTEC-FORAPIS, de la Universidad de Nariño.

Declaración de conflicto de intereses:

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses respecto a la publicación del artículo.

Referencias

- [1] G. Wareth and H. Neubauer, "The Animal-foods-environment interface of *Klebsiella pneumoniae* in Germany: an observational study on pathogenicity, resistance development and the current situation," *Vet. Res.*, vol. 52, no. 1, pp. 1–14, 2021, doi:10.1186/s13567-020-00875-w.
- [2] K. Junaid, H. Ejaz, S. Younas, A. Alanazi, H. Yasmeen, and A. Rehman, "Detection of *Klebsiella pneumoniae* antibiotic-resistant genes: An impending source of multi-drug resistance dissemination through raw food," *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 29, no. 5, pp.3347–3353, 2022, doi: 10.1016/j.sjbs.2022.02.020.
- [3] E. Mario, D. Hamza, and K. Abdel-Moein, "Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* among diarrheic farm animals: A serious public health concern," *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 102, no. October, p. 102077, 2023, doi:10.1016/j.cimid.2023.102077.
- [4] S. H. P. Hartantyo et al., "Foodborne *klebsiella pneumoniae*: Virulence potential, antibiotic resistance, and risks to food safety," *J. Food Prot.*, vol. 83, no. 7, pp. 1096–1103, 2020, doi: 10.4315/JFP-19-520.
- [5] J. A. Bengoechea and J. Sa Pessoa, "Klebsiella pneumoniae infection biology: Living to counteract host defences," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 43, no. 2, pp. 123–144, 2019, doi: 10.1093/femsre/fuy043.
- [6] A. L. Morales-Ubaldo, N. Rivero-Perez, B. Valladares-Carranza, V. Velázquez- Ordoñez, L. Delgadillo-Ruiz, and A. Zaragoza-Bastida, "Bovine mastitis, a worldwide impact disease: Prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches," *Vet. Anim. Sci.*, vol. 21, no. July, 2023, doi: 10.1016/j.vas.2023.100306.
- [7] S. Fu et al., "Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance of Outbreaks of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Mastitis in Chinese Dairy Farms," *Microbiol. Spectr.*, vol. 10, no. 6, 2022, doi: 10.1128/spectrum.02997-22.
- [8] F. E. Montúfar-Andrade et al., "Experiencia clínica con infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa, en una institución de enseñanza universitaria en Medellín, Colombia," *Infectio*, vol. 20, no. 1, pp. 17–24, 2016, doi: 10.1016/j.infect.2015.07.003.
- [9] F. Esposito et al., "Expansion of healthcare-associated hypervirulent KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11/KL64 beyond hospital settings," *One Heal.*, vol. 17, 2023, doi: 10.1016/j.onehlt.2023.100594.
- [10] J. S. Yu et al., "Lactobacillus lactis and *Pediococcus pentosaceus* -driven reprogramming of gut microbiome and metabolome ameliorates the progression of non-alcoholic fatty liver disease," *Clin. Transl. Med.*, vol. 11, no. 12, 2021, doi:10.1002/ctm2.634.
- [11] M. A. Almalki, "Exopolysaccharide production by a new *Lactobacillus lactis* isolated from the fermented milk and its antioxidant properties," *J. King Saud Univ. - Sci.*, vol. 32, no. 2, pp. 1272–1277, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.JKSUS.2019.11.002.
- [12] M. Wirunpan, W. Savedboworn, and P. Wanchaitanawong, "Survival and shelf life of *Lactobacillus lactis* 1464 in shrimp feed pellet after fluidized bed drying," *Agric. Nat. Resour.*, vol. 50, no. 1, pp. 1–7, 2016, doi: 10.1016/j.anres.2016.01.001.
- [13] R. M. Jones, "The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology The Use of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* in Clinical Trials for the Improvement of Human Health," in *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*, 2017, pp.99–108. doi: 10.1016/B978-0-12-804024-9/00009-4.
- [14] H. A. El-Enshasy and S.-T. Yang, *Probiotics, the Natural Microbiota in Living Organisms*, 1st ed. CRC Press, 2021. doi: 10.1201/9781351027540.
- [15] E. J. Zambrano-Mora and H. Jurado-Gómez, "Efecto de *Lactobacillus casei* microencapsulado sobre la salud intestinal y parámetros bioquímicos y productivos en pollo de engorde TT - Effect of microencapsulated *Lactobacillus casei* on intestinal health and on biochemical and productive parameters in," *Rev. UdcA Actual. Divulg. Cient*, vol. 23, no. 2, pp. e1480–e1480, 2020, [Online].
- [16] C. Yang, L. Liu, J. K. Majaw, L. Liang, and Y. Chen, "Efficacy of *Lactobacillus reuteri* supplementation therapy for *Helicobacter pylori* eradication: A meta-analysis of randomised controlled trials," *Med. Microecol.*, p. 100036, Jul. 2021, doi: 10.1016/J.MEDMIC.2021.100036.
- [17] C. Fajardo-Argoti, H. Jurado-Gómez, and J. Parra-Suescún, "Viabilidad de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado bajo condiciones gastrointestinales simuladas e inhibición sobre *Escherichia coli* O157:H7 Viability of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* under simulated gastrointestinal conditions and inhibit," *Rev. U.D.C.A Actual. Divulg. Científica*, vol. 24, 2021, doi: 10.31910/rudca.v24.n1.2021.1733.
- [18] H. A. Jurado-Gómez, E. J. Zambrano-Mora, and A. Pazos-Moncayo, "Adición de un probiótico de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado en el alimento para pollos," *Univ. y Salud*, vol. 23, no. 2, pp. 151–161, Apr. 2021, doi: 10.22267/RUS.212302.227.
- [19] S. Divyashree, R. Ramu, and M. Y. Sreenivasa, "Evaluation of new candidate probiotic *lactobacillus* strains isolated from a traditional fermented food- multigrain-millet dosa batter," *Food Biosci.*, vol. 57, no. December 2023, p. 103450, 2024, doi: 10.1016/j.fbio.2023.103450.
- [20] M. Popović et al., "Characterization of potential probiotic strain, *L. reuteri* B2, and its microencapsulation using alginate-based biopolymers," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 183, pp. 423–434, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.177.
- [21] R. B. Civas-Limón, P. Ferreira-Santos, M. Cruz, J. A. Teixeira, R. Belmares, and C. Nobre, "Novel Bio-Functional Aloe vera Beverages Fermented by Probiotic *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus lactis*," *Molecules*, vol. 27, no. 8, pp. 1–23, 2022, doi: 10.3390/molecules27082473.
- [22] M. M. Essa et al., "Functional foods and their impact on health," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 60, no. 3, 2023, doi: 10.1007/s13197-021-05193-3.
- [23] S. Vimom, K. Angkanaporn, and C. Nuengjamnong, "Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* MB001 and its probiotic effect on growth performance , cecal

- microbiome and gut integrity of broiler chickens in a tropical climate," *Anim. Boiscience*, vol. 36, no. 8, pp. 1252–1262, 2023, doi: doi.org/10.5713/ab.22.0426.
- [24] L. Li et al., "Microencapsulation protected *Lactobacillus* viability and its activity in modulating the intestinal microbiota in newly weaned piglets," *J. Anim. Sci.*, vol. 101, p. skad193, Jan. 2023, doi: 10.1093/jas/skad193.
- [25] Q. Guo et al., "Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* by spray drying: Protective effects during simulated food processing, gastrointestinal conditions, and in kefir," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 194, pp. 539–545, 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.11.096.
- [26] L. K. Sarao and M. Arora, "Probiotics , prebiotics , and microencapsulation: A review," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 57, no. 2, pp. 344–371, 2017, doi: 10.1080/10408398.2014.887055.
- [27] A. Brodkorb et al., "INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion," *Nat. Protoc.*, vol. 14, no. 4, pp. 991–1014, Mar. 2019, doi: 10.1038/s41596-018-0119-1.
- [28] E. G. Melara, M. C. Avellaneda, M. Valdiviá, Y. García-Hernández, R. Aroche, and Y. Martínez, "Probiotics: Symbiotic Relationship with the Animal Host," *Animals*, vol. 12, no. 6, pp. 1–26, 2022, doi: 10.3390/ani12060719.
- [29] Y. Cai, S. Puangpen, S. Premsuda, and Y. Benno, "Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns," *J. Gen. Appl. Microbiol.*, vol. 45, no. 4, pp. 177–184, 1999, doi: 10.2323/JGAM.45.177.
- [30] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances," *Anal. Chem.*, vol. 28, no. 3, pp. 350–356, Mar. 1956.
- [31] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, "PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT*," *J Biol Chem.*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, Nov. 1951, doi: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6.
- [32] W. Crueger and A. Crueger, *Industrial microbiology manual*. Zaragoza España: Acribia, 1993.
- [33] Y. A. Rodríguez, A. F. Rojas, and S. Rodríguez, "ENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS PARA APLICACIONES ALIMENTICIAS," *Rev. Biosalud*, vol. 15, no. 2, 2016, doi: 10.17151/biosa.2016.15.2.10.
- [34] H. A. Jurado-Gómez, J.-F. Cerón-Córdoba, and J. C. Bolaños-Bolaños, "Effect of microencapsulated *Lactobacillus reuteri* under simulated gastric conditions and its inhibition on *Listeria monocytogenes*," *Rev. Ciencias Agrícolas*, vol. 40, no. 1, p. e1202, 2023, doi: 10.22267/rcia.20234001.202.
- [35] C. J. Mejía, "Efecto de las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas provenientes de yogurt probiótico sobre el crecimiento de *Salmonella* spp Y *Staphylococcus aureus*," Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca, 2022. Accessed: Apr. 28, 2023. [Online]. Available: <http://hdl.handle.net/20.500.14074/5362>
- [36] T. T. Freire, A. L. T. e Silva, B. K. O. Ferreira, and T. M. dos Santos, "Lactic acid bacteria its characteristics and importance: review," *Res. Soc. Dev.*, vol. 10, no. 11, pp. e513101119964–e513101119964, Sep. 2021, doi: 10.33448/RSD-V10I11.19964.
- [37] N. Hadinia, M. R. Edalatian Dovom, and M. Yavarmanesh, "The effect of fermentation conditions (temperature, salt concentration, and pH) with *Lactobacillus* strains for producing Short Chain Fatty Acids," *Food Sci. Technol.*, vol. 165, no. June, p. 113709, 2022, doi: 10.1016/j.lwt.2022.113709.
- [38] M. Culumber et al., "Hot topic: Geographical distribution and strain diversity of *Lactobacillus wasatchensis* isolated from cheese with unwanted gas formation," *J. Dairy Sci.*, vol. 100, no. 11, pp. 8764–8767, 2017, doi: 10.3168/jds.2017-13375.
- [39] L. Sánchez, M. Omura, A. Lucas, T. Pérez, and C. de L. Ferreira, "Cepas de *Lactobacillus* spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos," *Rev. Salud Anim.*, vol. 37, no. 2, pp. 94–104, May 2015, Accessed: Aug. 11, 2022. [Online]. Available: <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v37n2/rsa04215.pdf>
- [40] L. Zhang, B. Zhao, C. J. Liu, and E. Yang, "Optimization of Biosynthesis Conditions for the Production of Exopolysaccharides by *Lactobacillus plantarum* SP8 and the Exopolysaccharides Antioxidant Activity Test," *Indian J. Microbiol.*, vol. 60, no. 3, p. 335, Sep. 2020, doi: 10.1007/S12088-020-00865-8.
- [41] J. A. Mora-Villalobos et al., "Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review," *Fermentation*, vol. 6, no. 23, p. 21, 2020, doi: 10.3390/fermentation6010023.
- [42] S. Roldán Pérez et al., "Assessment of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an artisanal Colombian cheese," *Build. Environ.*, vol. 23, p. 27, 2023, doi:10.1016/j.heliyon.2023.e21558.
- [43] B. Alizadeh Behbahani, M. Noshad, and F. Falah, "Inhibition of *Escherichia coli* adhesion to human intestinal Caco-2 cells by probiotic candidate *Lactobacillus plantarum* strain L15," *Microb. Pathog.*, vol. 136, 2019, doi: 10.1016/j.micpath.2019.103677.
- [44] F. Minervini and M. Calasso, "Lactobacillus casei Group," *Encycl. Dairy Sci. Third Ed.*, vol. 4, pp. 275–286, Jan. 2016, doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.00853-2.
- [45] J. Hu, J. H. Park, and I. H. Kim, "Effect of dietary supplementation with *Lactobacillus plantarum* on growth performance, fecal score, fecal microbial counts, gas emission and nutrient digestibility in growing pigs," *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 290, no. November 2019, p. 115295, 2022, doi: 10.1016/j.anifeedsci.2022.115295.
- [46] M. M. Alvarez, E. J. Aguirre-Ezkauriatza, A. Ramírez-Medrano, and Á. Rodríguez-Sánchez, "Kinetic analysis and mathematical modeling of growth and lactic acid production of *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* in milk whey," *J. Dairy Sci.*, vol. 93, no. 12, pp. 5552–5560, 2010, doi: 10.3168/jds.2010-3116.
- [47] B. Goranov, R. Denkova-Kostova, Z. Denkova, and G. Kostov, "Growth kinetics of probiotic lactobacilli strains cultivated in a laboratory bioreactor with stirring," *BIO Web Conf.*, vol. 58, pp. 3–7, 2023, doi: 10.1051/bioconf/20235802003.

- [48] D. A. Romero-Benavides, J. A. Morillo-Garcés, and H. A. Jurado-Gámez, "Inhibición de *Lactobacillus gasseri* SOBRE *Yersinia pseudotuberculosis* bajo condiciones in vitro," *Rev. la Fac. Med. Vet. y Zootec.*, vol. 63, no. 2, pp. 95–112, May 2016, doi: 10.15446/RFMVZ.V63N2.59357.
- [49] F. Cheng, H. Chen, N. Lei, M. Zhang, and H. Wan, "Effects of carbon and nitrogen sources on activity of cell envelope by *Lactobacillus plantarum* LP69-Research paper," *Acta Univ. Cibiniensis Ser. E FOOD Technol.*, vol. 23, no. 1, pp. 11–19, 2019, doi: 10.2478/aucft-2019-0002.
- [50] N. A. Bolívar-Jacobo et al., "Culture Age, Growth Medium, Ultrasound Amplitude, and Time of Exposure Influence the Kinetic Growth of *Lactobacillus acidophilus*," *Fermentation*, vol. 9, no. 1, 2023, doi: 10.3390/fermentation9010063.
- [51] H. Jurado-Gámez, J. Martínez-Benavides, J. A. Morillo-Garcés, A. E. Orbes-Villacorte, and L. N. Mesías-Pantoja, "Cinética de fermentación, pruebas de desafío in vitro y efecto de inhibición de *Lactobacillus gasseri* ATCC 19992," *Vet. y Zootecnia*, vol. 10, no. 2, pp. 72–89, Dec. 2016, Accessed: Aug. 22, 2022. [Online]. Available: <http://vip.ucaldas.edu.co/vetzootec/downloads/v10n2a07.pdf>
- [52] M. Wu et al., "Kinetic modeling of gamma-aminobutyric acid production by *Lactobacillus brevis* based on pH-dependent model and rolling correction," *Chinese J. Chem. Eng.*, vol. 50, pp. 352–360, 2022, doi: 10.1016/j.cjche.2022.05.021.
- [53] M. Yin, M. Chen, Y. Yuan, F. Liu, and F. Zhong, "Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein isolate-shortening oil and gum Arabic by complex coacervation: Enhanced the viability of probiotics during spray drying and storage," *Food Hydrocoll.*, vol. 146, no. September 2023, 2024, doi: 10.1016/j.foodhyd.2023.109252.
- [54] K. Sarabandi, S. M. Jafari, A. S. Mahoonak, and A. Mohammadi, "Application of gum Arabic and maltodextrin for encapsulation of eggplant peel extract as a natural antioxidant and color source," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 140, pp. 59–68, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.133.
- [55] M. Sultana, E. S. Chan, P. Janarthanan, and W. S. Choo, "Functional orange juice with *Lactobacillus casei* and tocotrienol-enriched flaxseed oil co-encapsulation: Physicochemical properties, probiotic viability, oxidative stability, and sensorial acceptability," *Lwt*, vol. 188, no. October, 2023, doi: 10.1016/j.lwt.2023.115388.
- [56] W. Chen, *Lactic Acid Bacteria and Fermented Meat Products*. Singapore: Springer, 2019. doi: 10.1007/978-981-13-7283-4.
- [57] H. Thatoi, P. K. Das Mohapatra, S. Mohapatra, and K. C. Mondal, *Microbial Fermentation and Enzyme Technology*. CRC Press, 2020. doi: 10.1201/9780429061257.
- [58] E. González et al., "Role of maltodextrin and inulin as encapsulating agents on the protection of oleuropein during in vitro gastrointestinal digestion," *Food Chem.*, vol. 310, p. 125976, Apr. 2020, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2019.125976.
- [59] A. A. Vázquez-Ortiz, Vázquez-Ovando. Alfredo, S. Ruiz-González, G. López-Martínez, M. G. Gyves-Córdova, and J. D. Mejía-Reyes, "Capacidad probiótica preliminar de bacterias ácido lácticas aisladas de diferentes fuentes," *IBCENCIAS*, vol. 5, no. 2, pp. 18–25, 2022, Accessed: Apr. 28, 2023. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/368634761>
- [60] X. Xu et al., "Antibacterial potential of a novel *Lactobacillus casei* strain isolated from Chinese northeast sauerkraut and the antibiofilm activity of its exopolysaccharides," *Food Funct.*, vol. 11, no. 5, pp. 4697–4706, May 2020, doi: 10.1039/D0FO00905A.
- [61] Y. L. P. López, R. Torres-Rosas, and L. Argueta-Figueroa, "Mecanismos de acción de los probióticos en la inhibición de los microorganismos cariogénicos," *Rev. Medica Clin. Las Condes*, vol. 34, no. 3, pp. 216–223, 2023, doi: 10.1016/j.rmcl.2023.03.010.
- [62] K. Khongkool, B. Prakrit, R. Chaiyod, W. Chanasit, and M. Lertworapreecha, "Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Producing *Lactobacillus plantarum* TSUB-17 and Probiotic Properties for Using as Probiotics Additive in Swine Feed," *Trends Sci.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–10, 2024, doi: 10.48048/tis.2024.7198.
- [63] J. R. Liu et al., "Fingerprinting and characterization of the polysaccharides from *Polygonatum odoratum* and the in vitro fermented effects on *Lactobacillus johnsonii*," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 239, no. October 2023, pp. 1–12, 2024, doi: 10.1016/j.jpba.2023.115911.