

INOCUIDAD DE LACTOBACILOS POTENCIALMENTE PROBIÓTICOS AISLADOS DE HECES DE LACTANTE Y LECHE MATERNA.

Roselynn Moreno .¹, Elaysa J. Salas .², César . Pérez-Maldonado¹, José . Jiménez .³

1. Postgrado de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
2. Departamento de Biopatología, Cátedra de Microbiología, Facultad de Odontología, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
3. Sección de Biotecnología, Instituto de investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

CORRESPONDENCIA: Roselynn Moreno Baptista, Postgrado de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes. Mérida 5101, Venezuela. Teléfono: 0274-5111605.

Email: roselynn@ula.ve.

RESUMEN

Lactobacillus es un género muy amplio conocido por sus propiedades probióticas. Han sido reconocidos por ser microorganismos inocuos, debido a su relación con los alimentos, al hecho de formar parte de la microbiota humana y por su bajo potencial patógeno. El objetivo del presente estudio fue evaluar la inocuidad, mediante un ensayo *in vivo* de translocación bacteriana en hígado y bazo, de lactobacilos potencialmente probióticos aislados a partir de muestras de heces de lactante y leche materna, obtenidas en Mérida, Venezuela. Fueron evaluadas dos cepas de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, (66 y 71) y una cepa de *L. rhamnosus* (75), identificadas bioquímicamente y caracterizadas como potencialmente probióticas en estudios *in vitro* previos. Las bacterias fueron administradas a ratones BALB/c en el agua de bebida durante 7 días. Para el procesamiento estadístico, se utilizó el modelo ANOVA de una vía, seguido del test post hoc de Tukey, considerando a $p < 0,05$ como significativo. En ninguna de las cepas evaluadas se

observaron diferencias significativas con respecto a los controles, en el crecimiento del cultivo de las muestras de hígado y bazo de los ratones. Las cepas fueron consideradas inocuas para los ratones y seguras o aptas para el consumo humano.

PALABRAS CLAVE: Inocuidad, lactobacilos, probióticos, heces de lactante, leche materna.

SAFETY ASSESSMENT OF POTENCIALLY PROBIOTIC LACTOBACILLI FROM BREAST-FED INFANT STOOLS AND BREAST MILK.

ABSTRACT

Lactobacillus belongs to the Acid Lactic Bacteria group, which is known for their probiotic properties. These microorganisms are historically considered safe for their close association with food, they are inhabitants of the normal indigenous microbiota and their pathogenic potential is low. The objective of the present study was to evaluate the safety of potentially probiotic lactobacilli strains, isolated from breast-fed infant stools and breast milk in Mérida, Venezuela, through a bacterial translocation assay on liver and spleen. Two strains of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (66 and 71) and one strain of *L. rhamnosus* (75) were evaluated; these strains were described as potential probiotics microorganism according previous in vitro tests. Bacteria were orally administrated to BALB/c mice for 7 days. ANOVA one way test was used to assess the statistical significance of the differences between test and control groups. There were no significant differences in bacterial growth of liver and spleen between control mice and those receiving oral administration of lactobacilli strains. Therefore these strains are likely to be safe for human consumption.

KEY WORDS: Safety assessment, Lactobacilli, probiotics, breast-fed infant stools, breast milk.

INTRODUCCIÓN

Lactobacillus es un género muy amplio dentro de las bacterias ácido lácticas,

grupo conocido por sus propiedades probióticas, se pueden encontrar en hábitats tan variados como bebidas

fermentadas, leche, carne y sus derivados. Han sido reconocidos por ser microorganismos inocuos, debido a su relación con los alimentos, al hecho de formar parte de la microbiota de la boca, tracto intestinal y vagina del ser humano y por su bajo potencial patógeno. Sin embargo, algunas cepas de lactobacilos han sido asociadas a infecciones en individuos inmunosuprimidos. Por lo que se recomienda realizar estudios de inocuidad a todas las cepas probióticas que vayan a ser incorporadas en productos alimenticios (1, 2, 3, 4).

Por otra parte, la leche materna humana es un factor importante en la iniciación y desarrollo de la microbiota intestinal del neonato, ya que ha demostrado ser una fuente continua y excelente de bacterias comensales potencialmente probióticas incluyendo bacterias ácido lácticas. Por lo tanto, si una bacteria que provee beneficios en la salud es aislada de leche materna o tracto intestinal, cumple con los principales criterios recomendados para los probióticos humanos, tales como, origen humano y antecedente de un consumo seguro (5, 6, 7).

En consecuencia, el objetivo del presente estudio fue evaluar la inocuidad, mediante un ensayo *in vivo* de translocación bacteriana en hígado y

bazo, de cepas de lactobacilos potencialmente probióticas aisladas a partir de muestras de heces de lactante y leche materna, obtenidas en Mérida, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de lactobacilos

Las cepas de lactobacilos evaluadas fueron aisladas a partir de las heces de un lactante de 30 días de vida, alimentado exclusivamente con leche materna, nacido por parto natural y la leche materna de su madre. Las muestras fueron obtenidas en el Hospital Sor Juana Inés de la Cruz, Mérida, Estado Mérida, Venezuela, previo consentimiento oral y escrito de los participantes, directiva del hospital y comité de bioética de la Universidad de los Andes. Mediante el uso del medio API CHL y las galerías API 50 CH (BioMérieux) fueron identificadas bioquímicamente las cepas 66 (aislada de heces) y 71 (aislada de leche materna) como *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, y la cepa nro. 75 (aislada de heces) como *L. rhamnosus*. Estas cepas fueron caracterizadas como potencialmente probióticas en estudios previos a través de las pruebas *in vitro* de resistencia a la acidez gástrica, sales

biliares (8) y actividad antagónica contra microorganismos patógenos

Estandarización y elaboración de los inóculos bacterianos para la alimentación de los ratones

Para la estandarización del inóculo se realizó un cultivo de 24 horas de cada cepa en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) a 37°C, a partir del cual se hicieron diluciones seriadas en agua peptonada, las cuales fueron cultivadas en placas de agar MRS e incubadas durante 24 horas a 37°C, luego se realizó el conteo y estandarización del inóculo bacteriano, el cual debía tener una concentración final aproximada de 10^8 UFC/mL. Las dosis de las cepas estudiadas fueron preparadas diariamente a partir de cultivos en caldo MRS, los cuales fueron centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos, luego se descartaron los sobrenadantes y se resuspendió cada sedimento en 5 ml de leche descremada al 10% (9).

Animales de experimentación y periodos de administración

Como modelo experimental para el ensayo *in vivo*, se emplearon ratones sanos BALB/c de seis semanas de vida, los animales fueron provistos por el bioterio del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), en San Miguel

de Tucumán Argentina, y durante todo el estudio tuvieron libre acceso a una dieta convencional balanceada y agua (*ad libitum*). Las bacterias fueron administradas a los ratones en el agua de bebida durante un periodo de 7 días. Se utilizaron tres animales por cada cepa bacteriana y un grupo control (9).

Ensayo de translocación bacteriana para determinar la inocuidad de las cepas

Para la realización de esta prueba fue empleada la metodología descrita por Vinderola y col. (10), con algunas modificaciones establecidas por el Laboratorio de Inmunología del CERELA, donde fue realizado el ensayo. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y fueron extraídos el bazo e hígado, los cuales fueron colocados en sus respectivos tubos estériles con 5 mL de agua peptonada, debidamente rotulados y previamente pesados. Los tubos se pesaron nuevamente y se calculó el peso de cada órgano por diferencia. Los órganos fueron procesados en un disgregador mecánico, luego se tomó 100 µL de cada órgano disgregado y se diluyó en 100 µL de agua peptonada.

La dilución de cada órgano se cultivó en placas de agar Mac Conkey (MK) para

aislar bacterias gramnegativas, en agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) para el aislamiento de cualquier microorganismo y en agar MRS para el aislamiento de lactobacilos; todos los medios fueron incubados a 37°C en aerobiosis, por 24 horas para el agar MK y BHI; y por 72 horas para el agar MRS. Posteriormente se realizó el conteo de colonias y se calculó el logaritmo de UFC por gramo de muestra de cada órgano, en cada medio de cultivo.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron procesados con el programa SPSS para Windows (versión 15.0), se utilizó el modelo de

análisis de la varianza ANOVA de una vía, seguido del test post hoc de Tukey, para establecer diferencias significativas entre las medias de los valores obtenidos de las cepas y del grupo control; considerando a $p < 0,05$ como significativo.

RESULTADOS

En ninguna de las cepas evaluadas se observaron diferencias significativas con respecto a los controles, en el crecimiento del cultivo de las muestras de hígado y bazo de los ratones (Figuras 1 y 2). Bacterias viables fueron aisladas tanto de los animales alimentados con las cepas como de los del grupo control.

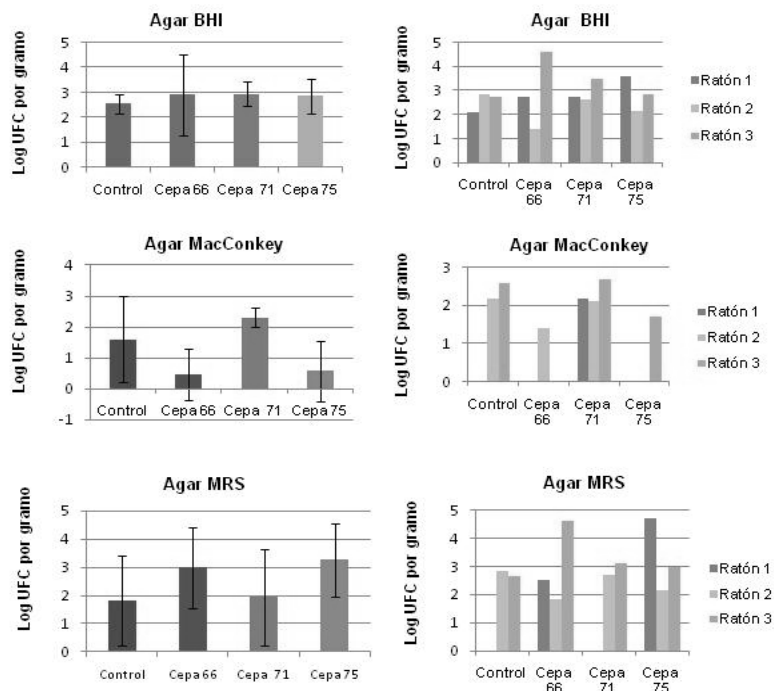


Figura 1. Medición de translocación bacteriana en el hígado de ratones después de la administración durante 7 días de las cepas de lactobacilos evaluadas. No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$)

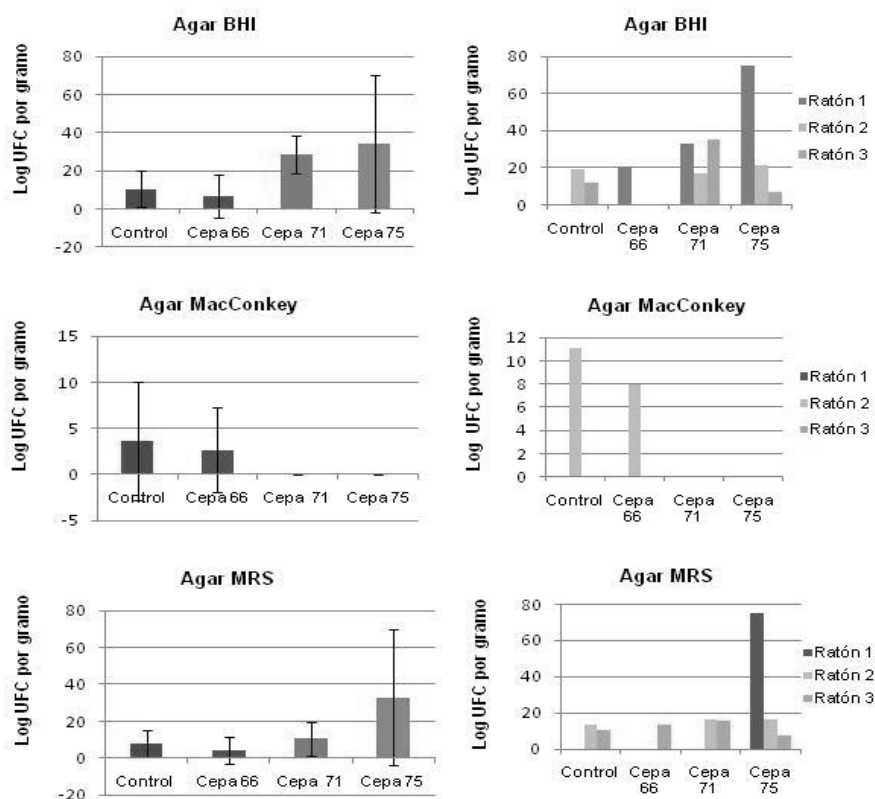


Figura 2. Medición de translocación bacteriana en el bazo de ratones después de la administración durante 7 días de las cepas de lactobacilos evaluadas. No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$)

DISCUSIÓN

La toxicidad oral es una de las pruebas más utilizadas para determinar la inocuidad de cepas probióticas, a su vez, la translocación bacteriana es un indicador importante de la toxicidad, debido a que constituye el primer paso en el proceso de patogénesis de muchos microorganismos oportunistas habitantes del intestino. Las bacterias de la

microbiota intestinal no son encontradas normalmente en localizaciones extra intestinales tales como, ganglios mesentéricos, bazo, hígado o sangre de ratones. Sin embargo, es probable que estas bacterias endógenas sean continuamente translocadas, en bajas proporciones, a través de la mucosa intestinal. No obstante, estas bacterias son

eliminadas por las células inmunes del hospedador asociadas al intestino (2, 10).

Los resultados obtenidos coinciden con estudios previos, en los cuales varias dosis de diferentes cepas de lactobacilos potencialmente probióticos fueron administradas a ratones BALB/c durante semanas o meses, y no fue observada translocación bacteriana en ganglios mesentéricos, hígado, bazo y sangre de los ratones. (2, 3, 11). En contraste, otros estudios han reportado que las bacterias ácido lácticas pueden inducir la translocación de microbiota normal al hígado y bazo solo en dosis altas (12).

Bajas proporciones de bacterias ácido lácticas han sido recuperadas tanto de animales alimentados con cepas de lactobacilos, como de los del grupo control. De forma similar, la presencia de bacterias en hígado y bazo de ratones sanos ha sido descrita previamente (2, 11). Lo anterior también fue observado en el presente estudio.

En base a esto, se considera que no hubo translocación bacteriana, los lactobacilos evaluados son inocuos para los ratones y seguros o aptos para el consumo humano, ya que no favorecieron la colonización de bacterias intestinales a nivel extra intestinal en el modelo *in vivo* ensayado.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes de la Universidad de los Andes, Venezuela (CDCHTA-ULA), por el financiamiento otorgado bajo el código FA-474-10-07-EM.

A la Dra. Gabriela Perdigón, Dra. Alejandra de Moreno de leBlanc y demás miembros del Laboratorio de Inmunología del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), en San Miguel de Tucumán Argentina, por el asesoramiento prestado en la ejecución de los ensayos.

REFERENCIAS

- 1 Delgado, S. Microbiota Intestinal Humana: Análisis y evolución de poblaciones representativas e identificación de bacterias probióticas. [Tesis doctoral]. España: Universidad de Oviedo. 2005.
- 2 Lara-Villoslada F, Sierra S, Díaz-Ropero M, Olivares M, Xaus J. Safety Assessment of the Human Milk-Isolated Probiotic *Lactobacillus salivarius*

- CECT5713. J of Dairy Sci 2007; 90: 3583-3589.
- 3 Mikelsaar M, Zilmer M. *Lactobacillus fermentum* ME-3 an antimicrobial and antioxidative probiotic. Microb Ecol Health Dis 2009; 1-27.
- 4 Rodríguez M. Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. [Tesis en línea]. Universidad Autónoma de Barcelona, España. 2009. Consultada el 15 de noviembre de 2010 en: www.tesisenxarxa.net/TESIS_UAB/.../TDX.../mrg1de1.pdf
- 5 Martín R, Langa S, Reviriegoa C, Jiménez E, Marin M, Olivares M, et al. The comensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. Trends in Food Sci & Tech 2004; 15: 121-27.
- 6 Martín R, Heilig H, Zoetendal E, Jiménez E, Fernández L, Smidt H, et al. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. Res Microbiol 2007; 158: 31-37.
- 7 Jiménez E, Delgado M, Fernández L, García N, Albújar M, Gómez A, et al. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. Res Microbiol 2008; 159: 595-601.
- 8 Moreno R, Salas E, Pérez-Maldonado C, Jiménez J. Evaluación del potencial probiótico de lactobacilos aislados de heces de lactantes y leche materna. Revista MedULA 2011; 20(2): 135-139.
- 9 Maldonado Galdeano C, Perdígón G. The Probiotic Bacterium *Lactobacillus casei* Induces Activation of the Gut Mucosal Immune System through Innate Immunity. Clin Vaccine Immunol 2006;13 (2): 219–226.
- 10 Vinderola G, Medici M, Perdígón G. Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. J Appl Microbiol 2004; 96: 230-243.



- 11 Zhou J, Shu Q, Rutherford K, Prasad J, Birtles M, Gopal P, et al. Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice. Int J Food Microbiol 2000; 56(1): 87-96.
- 12 Perdigón G, Fuller R, Raya R. Lactic Acid Bacteria and their Effect on the Immune System Curr Iss Intest Microbiol 2001; 2(1): 27-42.