

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE LACTOBACILOS AISLADOS DE HECES DE LACTANTES Y LECHE MATERNA.

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

¹Postgrado de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ²Departamento de Biopatología, Cátedra de Microbiología, Facultad de Odontología. ³Sección de Biotecnología, Instituto de investigaciones Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela. roselynn@ula.ve.

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

Resumen

Los probióticos son definidos como microorganismos vivos que cuando se consumen en cantidades apropiadas confieren efectos saludables al hospedador. Dentro los más utilizados se encuentran las bacterias del género *Lactobacillus*. Uno de los principales criterios que deben cumplir las bacterias para ser consideradas probióticas, es ser resistentes a las condiciones del tracto gastrointestinal. El objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial probiótico de lactobacilos aislados de muestras de heces de lactantes y leche materna. Fueron evaluadas cuatro cepas de *L. paracasei* ssp. *paracasei* y una cepa de *L. rhamnosus*. Se realizaron pruebas *in vitro* de resistencia a acidez gástrica, en caldo MRS suplementado con pepsina ajustado a pH 2, 3, 4, y resistencia a sales biliares a 0.05, 0.10, 0.15 y 0.30%, en caldo MRS. Las cepas evaluadas mostraron diferentes grados de resistencia a la acidez gástrica y fueron capaces de multiplicarse en medios con diferentes concentraciones de sales biliares. Los lactobacilos estudiados presentaron comportamientos favorables para ser considerados como potencialmente probióticos, una cepa de *L. paracasei* ssp. *paracasei* (71) y una cepa de *L. rhamnosus* (75) presentaron el mayor potencial.

Palabras claves: Lactobacilos, probióticos, heces de lactantes, leche materna.

Abstract

Evaluation of the probiotical ability of lactobacilli isolated from breast-fed infants stools and breast milk.

Probiotics are defined as live microorganisms that when ingested in appropriate quantities confer healthy effects to the host. The *Lactobacillus* gender is among those most used. For the successful administration of probiotic bacteria they have to resist specific conditions of the gastrointestinal tract. The objective of the present study was to evaluate the probiotical ability of isolated lactobacilli from samples of stools from nurslings and their mothers' breast milk. Four strains of *L. paracasei* ssp. *paracasei* and one strain of *L. rhamnosus* were evaluated. Tests for *in vitro* resistance to the gastric acidity in MRS broth with pepsin in adjusted pH (2, 3 and 4) and resistance to different concentrations (0.05, 0.10, 0.15 y 0.30%) of bile salts in MRS broth were carried out. All the evaluated strains showed different grades of resistance to the gastric acidity. Also, the evaluated strains were able to multiply in medium with different concentrations of bile salts. All the studied lactobacilli strains showed positive characteristics for their potential use as probiotic microorganisms; a strain of *L. paracasei* ssp. *paracasei* (71) and a strain of *L. rhamnosus* (75) hold the highest potential in accordance to the *in vitro* tests performed.

Key words: Lactobacilli, probiotics, nursling's stools, breast milk.

INTRODUCCIÓN

Los probióticos son definidos como microorganismos vivos que cuando se consumen en cantidades apropiadas confieren efectos saludables al hospedador. Dentro de los más utilizados se encuentran bacterias del género *Lactobacillus* (FAO/OMS 2001, Delgado 2005). Asimismo, ha sido probado el efecto de los probióticos en diarreas, infecciones urinarias, intolerancia a la lactosa, alergias, entre otros. No obstante, para que la administración de bacterias probióticas sea exitosa, estas tienen que ser resistentes a condiciones del tracto gastrointestinal, tales como la acidez gástrica y las sales biliares, siendo este uno de los principales criterios que debe cumplir cualquier microorganismo para ser considerado probiótico (FAO/OMS 2001, Delgado 2005, Cagigas et al. 2002, Mejía et al. 2007).

Por otra parte, la leche materna humana es un factor importante en el desarrollo de la microbiota intestinal del neonato, ya que representa una fuente continua de microorganismos (Rodríguez et al. 2008, Olivares et al. 2008). De modo que la microbiota de los lactantes alimentados con leche materna está constituida principalmente por bifidobacterias y lactobacilos; en contraste con los alimentados con fórmulas lácteas donde predominan bacterias coliformes. En este sentido, bacterias comensales como lactobacilos y bifidobacterias, al compartir una larga historia evolutiva con sus hospedadores, poseen atributos beneficiosos para la salud que pueden ser estudiados cuando son utilizadas como probióticos (Vitoria 2007, Walter 2008).

Con base en todo lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial probiótico de lactobacilos aislados a partir de muestras de heces de lactantes y leche materna de sus respectivas madres, obtenidas en Mérida, Estado Mérida, Venezuela; a través de las pruebas de capacidad probiótica *in vitro* de resistencia a la acidez gástrica y sales biliares.

METODOLOGÍA.

Recolección de las muestras.

Las cepas de lactobacilos fueron obtenidas a partir de muestras heces de seis lactantes sanos de un mes de vida, sin tratamiento con antimicrobianos, alimentados exclusivamente con leche materna y la leche materna de sus respectivas madres, seis mujeres sanas sin tratamiento con antimicrobianos. Previo consentimiento oral y escrito, de las mujeres participantes, directiva del Hospital "Sor Juana Inés de la Cruz" y Comité de Bioética de la Universidad de Los Andes. Las heces fueron colocadas en

recolectores estériles y una pequeña cantidad fue colocada en tubos con 5 ml de caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (Mejía et al. 2007). La leche materna fue recolectada en tubos de ensayo estériles, previa antisepsia del pezón y la piel del área cercana con clorhexidina al 0.12% (Peridont) y la aplicación de masajes suaves con guantes estériles y ligera presión para estimular la secreción natural de la leche (Jiménez et al. 2008). Las muestras fueron trasladadas inmediatamente al laboratorio y conservadas bajo refrigeración hasta su procesamiento.

Procesamiento de las muestras, medios y condiciones de cultivo.

Los tubos de caldo MRS (Hi media) con las muestras de heces y tubos con 5 ml de caldo MRS y 20 µl de cada muestra de leche materna, fueron incubados a 37 °C por 24 horas. Posteriormente se cultivaron en placas de agar MRS (Hi media) pH 6.5, incubadas a 37 °C en microaerobiosis hasta las 72 horas (Mejía et al. 2007, Salas 2004).

Aislamiento e identificación de las cepas de lactobacilos.

La selección de colonias bacterianas fue realizada en base a la tinción de Gram y las pruebas de catalasa y movilidad (Mejía et al. 2007, Salas 2004). La identificación bioquímica del género y la especie se realizó mediante la combinación del medio API CHL y las galerías API 50 CH (BioMérieux), siguiendo la metodología descrita en los insertos suministrados por el proveedor, utilizando el programa API LAB plus versión 3.2 (Salas 2004).

Estandarización del inóculo bacteriano.

Las cepas de lactobacilos fueron cultivadas en caldo MRS e incubadas a 37°C por 18-20 horas. Luego de la incubación fueron centrifugadas (4000 rpm por 10 minutos), se eliminó el sobrenadante y se lavaron en tres ocasiones con solución salina fisiológica estéril al 0,9% para eliminar los restos de medio de cultivo. Con las células obtenidas se prepararon suspensiones equivalentes al tubo nº 1 del Patrón de Mac Farland (BioMérieux), aproximadamente 3×10^8 bacterias/mL, las cuales se emplearon en las pruebas para evaluar el potencial probiótico (Salas 2004).

Resistencia a la acidez gástrica.

La metodología fue estandarizada a partir de lo descrito por Font de Valdez et al. 2001, Salas 2004 y Alvarado et al. 2009.

Para el desarrollo de esta prueba se utilizó jugo gástrico artificial compuesto por 1000 U/ml de pepsina, la cual fue esterilizada por filtración con un filtro Milipore de 0.22 mm, y caldo MRS, el cual fue ajustado a pH 2, 3 y 4 con HCl 1N y fue esterilizado en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Posteriormente la pepsina fue agregada al caldo MRS y el jugo gástrico artificial se conservó en refrigeración hasta su uso.

De cada una de las suspensiones de células se inoculó 50 µl en 5 ml de jugo gástrico artificial, se incubaron a 37 °C por 1, 2 y 3 horas. Transcurrido cada lapso de tiempo se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada y se cultivaron 100 µl de cada una sobre placas de MRS, incubando por 24 horas a 37 °C en microaerobiosis; luego de la incubación se realizó el conteo de colonias. Las cepas que no mostraron reducción de las unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) fueron consideradas como bacterias resistentes a la acidez gástrica.

Resistencia a sales biliares.

Para la realización de esta prueba se estandarizó la metodología, con base en los trabajos de Font de Valdez et al. 2001, Salas 2004 y Alvarado et al. 2009. Con cada una de las suspensiones de células se inocularon 50 µl en 5 ml de caldo MRS suplementado con sales biliares, (Ox bile, Himedia) a diferentes concentraciones (0.05; 0.10; 0.15 y 0.3%), se incubaron a 37 °C en una primera etapa por 1, 2 y 3 horas. Cumplido cada periodo se procedió a medir la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 560nm. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada y se cultivaron 100 µl de las diluciones sobre placas de MRS, incubadas en microaerobiosis por 24 horas a 37 °C. Se contaron las colonias presentes, las cepas que no mostraron reducción de las UFC/ml a diferentes concentraciones de sales biliares, fueron consideradas como bacterias resistentes.

En una segunda etapa, a las 4, 5, 6 y 24 horas de incubación a 37 °C se midió sólo la DO. Como control de las curvas de crecimiento se inoculó 50 µl de las suspensiones de células en 5 ml de caldo MRS sin sales biliares y se realizaron todas las mediciones de DO. La comparación entre las curvas de crecimiento se realizó en base al tiempo requerido para cada una de las cepas en incrementar 0.3 unidades de DO a 560 nm, en los cultivos a diferentes concentraciones de sales biliares y en el cultivo sin sales; a partir de allí se calculó el retraso en el crecimiento (D), definido como la diferencia de tiempo en minutos entre los cultivos con y sin sales

biliares. Considerando las cepas resistentes a sales biliares aquellas con menores valores de D.

RESULTADOS.

Aislamiento e identificación de las cepas de lactobacilos.

Se examinaron 138 colonias, de las cuales fueron descartadas 98 correspondientes a cocos grampositivos, conservando 40 colonias de bacilos o coco-bacilos grampositivos. Se seleccionaron aquellas colonias bacterianas con características propias del género *Lactobacillus*, tales como ausencia de actividad catalasa y movilidad negativa. Fueron procesadas 10 colonias con el medio API CHL y las galerías API 50 CH (BioMérieux) para la identificación bioquímica, utilizando como control la cepa *L. plantarum* ATCC 8014. Se evaluó el potencial probiótico de dos cepas aisladas de heces de lactantes (colonias 66 y 120), dos cepas aisladas de leche materna (colonias 71 y 128), identificadas como *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, y una cepa aislada de heces de lactante (colonia 75) identificada como *L. rhamnosus*.

Resistencia a la acidez gástrica.

La cepa 75 mostró la mayor resistencia a la acidez gástrica de todas las cepas evaluadas, presentando un crecimiento por encima de 5 log UFC/ml a pH 3 y 4. Seguida de las cepas 66 y 71 con crecimientos por encima de 5 log UFC/ml a pH 4; en contraste con las cepas 120 y 128 en donde se observaron crecimientos por debajo de 5 log UFC/ml a pH 4 (Tabla 1). Ninguna de las cepas evaluadas presentó crecimiento a pH 2.

Resistencia a sales biliares.

Las curvas de crecimiento de los lactobacilos estudiados se correlacionaron con los conteos de UFC/ml a diferentes concentraciones de sales biliares (datos no mostrados). De las 5 cepas evaluadas, la cepa 71 presentó la mayor resistencia a las sales biliares, con los menores valores (entre 0 y 60 minutos) de retraso en el crecimiento (D); seguida de la cepa 128 con valores de D entre 30 y 90 minutos. Por otra parte, la cepa 66 presentó valores de 60 minutos y mayores de 60 minutos (los cuales no pudieron ser determinados en este ensayo, debido a que la fase exponencial del crecimiento de dos de los cultivos de la bacteria no ocurrió durante las primeras 6 horas de incubación), un comportamiento similar fue observado en la cepa 120 con valores de retraso entre 90 minutos y mayores a 90 minutos. Por último, la cepa 75 mostró un crecimiento lento (fase

exponencial después de las 6 horas de incubación) en todos los cultivos, incluyendo la curva control, por lo que no fue posible calcular los valores de retraso en el crecimiento (D) (Tabla 2).

Tabla 1. Unidades formadoras de colonias de las cepas de lactobacilos aisladas de heces de lactantes y leche materna de sus respectivas madres, en presencia de jugo gástrico artificial a diferentes pH, en función del tiempo.

*Log UFC/ml			
Cepa	TIEMPO (horas)	pH 3	pH 4
66	1	0	6
	2	0	>6
	3	0	6
71	1	0	5
	2	0	>6
	3	0	5,7
75	1	5	5,3
	2	5,5	>6
	3	5,5	5,5
120	1	NE	NE
	2	0	5,6
	3	0	4,8
128	1	0	0
	2	0	4,9
	3	0	4,9

*Log UFC/ml= Logaritmo de las unidades formadoras de colonias por ml. NE= no evaluado > 6 = Colonias incontables.

Tabla 2. Retraso en el crecimiento (D) en minutos, para determinar la resistencia a diferentes concentraciones de sales biliares, de las cepas de lactobacilos aisladas de heces de lactantes y leche materna de sus respectivas madres.

Cepa	Retraso en el crecimiento D (minutos)			
	Concentraciones de sales biliares			
	0.05%	0.10%	0.15%	0.3%
66	60	60	>60	>60
71	12	0	60	60
75	NC	NC	NC	NC
120	90	90	>90	>90
128	30	90	60	90

D = diferencia entre el tiempo requerido en minutos para aumentar 0.3 unidades a DO₅₆₀ del cultivo con y sin sales biliares. NC= valores no calculados (fase exponencial de todos los cultivos después de las 6 horas)

Para que un microorganismo cumpla su función probiótica es necesario que sea capaz de colonizar el intestino delgado, pero antes debe superar el estrés generado por el bajo pH del estómago (muchas especies de lactobacilos pueden hacer frente a esta barrera porque son microorganismos acidúricos) y luego por el contacto con las sales biliares, en concentraciones aproximadas a 0,3% (inhibitorias para muchos microorganismos porque provocan lisis celular) (Salas 2004, Alvarado et al. 2009).

Todas las cepas evaluadas fueron capaces de resistir la acidez gástrica a pH 4 y solo la cepa 75 fue capaz de resistir la acidez a pH 3. Con respecto a las sales biliares, dos de las cepas estudiadas, 71 y 128, mostraron resistencia a las sales biliares, donde el crecimiento de la cepa 71 fue el menos afectado por la presencia de sales biliares en el medio, presentando los menores valores de retraso en el crecimiento (D). Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por diversos autores al estudiar lactobacilos potencialmente probióticos aislados a partir de productos lácteos, pastizal de fincas lecheras, vagina de mujeres sanas, tracto intestinal humano y animal (Delgado 2005, Mejía et al. 2007, Salas 2004, Alvarado et al. 2009, Khalil et al. 2007, Vinderola et al. 2008, Ávila et al. 2010).

En este sentido, Khalil et al. en 2007 reportaron que la viabilidad de algunas cepas aumentaba a medida que aumentaba la concentración de las sales biliares. Un comportamiento similar fue observado en la mayoría de las cepas estudiadas, en donde la mayor turbidez o DO a las 24 horas de incubación fue observada en la mayor concentración de sales. En general, los patrones reportados en la literatura de resistencia a pH ácido y sales biliares son muy variables, por lo cual, las características de estas pruebas *in vitro* suelen ser específicas de cada cepa y los resultados no pueden ser extrapolables (Delgado 2005, Khalil et al. 2007).

La cepa 75 mostró la mayor resistencia al pH ácido del grupo estudiado, sin embargo en el ensayo de sales biliares su crecimiento lento no hizo posible determinar la resistencia, a diferencia del resto de las cepas. En contraste, la cepa 71 presentó la mayor resistencia a las sales biliares pero no fue la cepa con mayor resistencia al ácido del grupo evaluado. No existe una cepa probiótica ideal, que posea todas las características deseables desde el punto de vista de tecnológico, antibacteriano, inmunológico y de viabilidad; por lo que la mayoría de los productos probióticos comerciales están compuestos de mezclas de microorganismos con diferentes características

DISCUSIÓN.

Moreno et al. 2011. Potencialprobiótico de lactobacilos aislados de heces de lactantes y leche materna MedULA 20: 135-139

que en conjunto provean los mayores beneficios al individuo.

La mayoría de los lactobacilos estudiados presentaron resistencia a las barreras del tracto gastrointestinal, característica favorable para su potencial uso como probióticos. Sin embargo, una cepa de *L. paracasei* ssp. *paracasei* de leche materna (71) y una cepa de *L. rhamnosus* (75) de heces de lactante, fueron consideradas las bacterias de mayor potencial probiótico del grupo estudiado según las pruebas *in vitro*.

REFERENCIAS.

Alvarado C, Díaz C. 2009. Estudio preliminar del potencial probiótico de lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera. Rev Fac Farm. 51: 8-14.

Ávila J, Ávila M, Tovar B et al. 2010. Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. Rev. Cientif. FCV-LUZ. 20: 161 – 169.

Cagigas A, Blanco A. 2002. Prebióticos y Probióticos, una relación beneficiosa. Revista Cubana Aliment Nutr. 16: 63-8.

Delgado S. 2005. Microbiota Intestinal Humana: Análisis y evolución de poblaciones representativas e identificación de bacterias probióticas. [Tesis doctoral]. Universidad de Oviedo. España.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)/ OMS (Organización Mundial de la Salud). 2001. Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico. Córdoba, Argentina.

Font de Valdez G, Taranto M. 2001. Probiotic Properties of Lactobacilli. En Food Microbiology

Protocols. In: Spencer J, Ragout de Spencer A. (Eds.). Humana Press, New Jersey. 173- 181.

Jiménez E, Delgado M, Fernández L et al. 2008. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. Res in Microbiol. 159: 595-601.

Khalil R, Mahrous H, El-Halafawy K et al. 2007. Evaluation of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from faeces of breast-fed infants in Egypt. Afr. J. Biotechnol. 6: 935-945.

Mejía J, Chacón Z, Otoniel J et al. 2007. Obtención de cepas de *Lactobacillus*: caracterización in-vitro como potenciales probióticas. Rev. Cientif. FCV-LUZ. 17: 178-185.

Olivares M, Lara-Villoslada F, Sierra S, Boza J et al. 2008. Efectos beneficiosos de los probióticos de la leche materna. Acta Pediatr Esp. 66: 183-188.

Rodríguez J, Jiménez E, Merino V et al. 2008. Microbiota de la leche humana en condiciones fisiológicas. Acta Pediatr Esp. 66: 77-82.

Salas E. 2004. Lactobacilos con potencial actividad probiótica a partir de queso fresco no pasteurizado elaborado en forma artesanal. (Tesis maestría). Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

Vinderola G, Capellini B, Villarreal F et al. 2008. Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. Food Sci Tech. 41: 1678-1688.

Vitoria M. 2007. Probióticos, prebióticos y simbióticos. Pediatr Integral. 11: 425-433.

Walter J. 2008. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. Appl Environ Microbiol. 74: 4985-4996.

Recibido: 15 nov 2011 Aceptado: 10 dic 2011

MedULA en Internet

Usted puede acceder y descargar todos los contenidos de la revista **MedULA**, a texto completo con figuras a todo color, desde algunas de las siguientes páginas

de la Web, entre otras: www.saber.ula.ve/medula; www.latindex.org; www.periodica.org; www.doaj.org; www.freemedicaljournals.com; www.fj4d.com; <http://dialnet.unirioja.es/servlet/extrev?codigo=7642>; www.portalesmedicos.com; <http://web5.infotrac.galegroup.com>; www.ebsco.com; www.monografias.com; www.imbiomed.com; www.indexcopernicus.com