

Estudio preliminar de la actividad antagónica sobre microorganismos patógenos de cepas de *Lactobacillus* aisladas a partir 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.

Recibido: 30-06-11 Aceptado: 20-04-12

Resumen

En los lactantes alimentados con leche materna la microbiota intestinal está constituida principalmente por bifidobacterias y lactobacilos; estas bacterias comensales poseen atributos beneficiosos, que pueden ser estudiados cuando son utilizadas como probióticos. Los probióticos ejercen diversas acciones mediante distintos mecanismos de acción; entre estos, la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos. Por otra parte, la leche materna humana representa una fuente importante de microorganismos hacia el neonato, especialmente bacterias potencialmente probióticas. El objetivo del presente estudio fue evaluar, a través de un ensayo de difusión en agar, la actividad antagónica preliminar de cepas de *Lactobacillus* aisladas a partir de muestras de heces de lactantes y leche materna, obtenidas en Mérida, Estado Mérida, Venezuela. Se evaluó la actividad de cuatro cepas de *L. paracasei* ssp. *paracasei*, una cepa de *L. rhamnosus* y una cepa de *L. acidophilus*. Todas las cepas evaluadas mostraron actividad antagónica frente a los microorganismos patógenos ensayados. Sin embargo, la cepa 66 (*L. paracasei* ssp. *paracasei*) fue capaz de inhibir a todos los patógenos con el mayor promedio de halos de inhibición, seguida de las cepas 71 (*L. paracasei* ssp. *paracasei*) y 75 (*L. rhamnosus*); por lo que son consideradas bacterias potencialmente probióticas.

Palabras clave: actividad antagónica, *Lactobacillus*, heces, leche materna.

Preliminary Antagonistic Activity of *Lactobacillus* strains isolated from stools of nurslings and breast milk on pathogen microorganisms

Abstract

The intestinal microbiota of breast milk's fed nurslings is constituted mainly by bifidobacteria and lactobacilli. These bacteria possess healthy attributes that can be assessed when they

* Autor para la correspondencia: roselynn@ula.ve

are used as probiotics. Diverse healthy actions are exerted by probiotics through different mechanisms; growth inhibition of pathogen microorganisms is one of them. On the other hand, human maternal milk represents an important source of microorganisms in behalf of the newborn, especially those bacteria with probiotic potential. The objective of the present study was to evaluate the preliminary antagonistic activity -through a diffusion assay in perforated agar- of *Lactobacillus* strains obtained and isolated in Merida, Venezuela from stool samples of nurslings and breast milk. All the evaluated strains showed antagonistic activity against the pathogen microorganisms. Strain 66 (*L. paracasei* ssp. *paracasei*) inhibited all the indicator strains with the highest mean of inhibition zones diameter, in addition, strain 71 (*L. paracasei* ssp. *paracasei*) and 75 (*L. rhamnosus*) were able to inhibit the growth of almost all the pathogens; which rate them as potentially probiotic microorganisms.

Keywords: antagonistic activity, *Lactobacillus*, stools, breast milk.

Introducción

La microbiota del tracto gastrointestinal está formada por un complejo ecosistema microbiano, que influye en el mantenimiento de la homeostasis del individuo. En los lactantes alimentados con leche materna la microbiota está constituida principalmente por bifidobacterias y lactobacilos; en contraste con los niños alimentados con fórmulas lácteas que tienden a desarrollar una microbiota más compleja constituida por bacterias coliformes. Por lo cual, bacterias comensales como lactobacilos y bifidobacterias comparten una larga historia evolutiva con sus hospedadores y poseen atributos beneficiosos para la salud, que pueden ser estudiados cuando son utilizadas como probióticos (1, 2).

Los probióticos son microorganismos vivos o componentes celulares microbianos, que tienen efectos beneficiosos sobre la salud y el bienestar del hospedador. Entre los microorganismos más utilizados como probióticos se encuentran las bacterias ácido lácticas (BAL), particularmente las pertenecientes al género *Lactobacillus*. Asimismo, se ha demostrado la eficacia de los probióticos en el tratamiento y prevención de diarreas, y otros estados patológicos como infecciones urinarias, intolerancia a la lactosa, alergias, entre otros (1-3).

En este sentido, los probióticos ejercen diversas acciones sobre la salud mediante distintos mecanismos de acción; entre los cuales se encuentra, la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos. Este efecto antagónico es una característica deseable en bacterias de uso probiótico, ya que uno de los principales beneficios terapéuticos aportados por estos microorganismos al hospedador es el equilibrio de la microbiota intestinal y el control de infecciones gastrointestinales (2, 4).

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 hacia el niño durante varias semanas posteriores a su nacimiento. Sin embargo existe una gran variabilidad interindividual, de tal manera que la leche de cada mujer tiene una composición bacteriana única, de forma análoga a lo que sucede con la microbiota intestinal de niños y adultos. Bacterias potencialmente probióticas han sido aisladas a partir de leche materna, incluyendo especies de lactobacilos, algunas ya forman parte de productos probióticos comerciales (5).

En consecuencia, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la actividad antagónica preliminar sobre microorganismos

patógenos, a través de un ensayo de difusión en agar, de cepas de *Lactobacillus* aisladas a partir de muestras de heces de lactantes y leche materna, obtenidas en Mérida, estado Mérida, Venezuela.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas

Se evaluaron un total de seis cepas; dos cepas de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* [66 y 120], una cepa de *L. rhamnosus* [75] y una cepa de *L. acidophilus* (34), aisladas de heces de lactantes de un mes de vida, alimentados exclusivamente con leche materna y sin tratamiento con antimicrobianos; y dos cepas de *L. paracasei* ssp. *paracasei* [71 y 128] aisladas de leche materna de mujeres sanas, sin tratamiento con antimicrobianos, previo consentimiento oral y escrito de los participantes, la directiva del Hospital Sor Juana Inés de la Cruz y el Comité de Bioética de la Universidad de los Andes. Las cepas fueron obtenidas de placas de agar Man Rogosa Sharpe MRS (HiMedia, India) pH 6,7 incubadas en microaerobiosis a 37°C e identificadas bioquímicamente a través del Sistema de Identificación API 50CH (BioMérieux).

Como microorganismos indicadores se utilizaron las cepas patógenas *Listeria monocytogenes* CVCM 446, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) CVCM 764, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Salmonella Typhi* CVCM 49, *Salmonella Typhimurium* LMA-ULA 36, *Salmonella Enteritidis* CVCM 497 y *Shigella dysenteriae* LMA-ULA 03; pertenecientes al Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Actividad antagónica preliminar sobre microorganismos patógenos

Se evaluó la actividad antagónica de los lactobacilos sobre las cepas de bacterias patógenas a través de un ensayo de difusión en

agar utilizando pozos, estandarizado a partir de diferentes metodologías descritas en la literatura (4, 6, 7).

Las bacterias patógenas, con 24 horas de crecimiento a 37°C en caldo Infusión Cerebro Corazón BHI (por sus siglas en inglés) (HiMedia, India), fueron centrifugadas a 4000 rpm × 10 min, el sobrenadante fue descartado y se lavó el sedimento celular con solución salina fisiológica al 0,9%. Posteriormente, fueron resuspendidas hasta alcanzar una suspensión de células equivalente al tubo n° 0,5 del Patrón de Mac Farland (BioMérieux), aproximadamente $1,5 \times 10^8$ bacterias/mL. Se inocularon 160 µL de cada suspensión en 8 mL de agar BHI (HiMedia, India) temperado a $\pm 45^\circ\text{C}$ para obtener el agar inoculado con cada patógeno.

Sobre placas de agar Mueller Hinton (BBL, USA) se colocaron cilindros estériles de acero inoxidable de 8 mm de diámetro, luego se vertió el agar BHI temperado inoculado con la cepa patógena. Una vez solidificado el agar se retiraron los cilindros con la formación de los pozos. Por último, para cada cepa de lactobacilos evaluada, se colocó en un pozo 80 µL de un cultivo de 24 horas en caldo MRS (HiMedia, India) y en otro pozo 80 µL del sobrenadante sin neutralizar obtenido de la centrifugación de un cultivo de 24 horas en caldo MRS (HiMedia, India). El ensayo se realizó por duplicado.

Todas las placas fueron incubadas a 37°C en aerobiosis por 48 horas, posteriormente se observaron y midieron los halos de inhibición. Se ha reportado como positiva un área de inhibición mínima alrededor de las colonias de 0,5 mm (8). Por lo que cualquier halo mayor o igual a 9 mm de diámetro presente (incluido los 8 mm del diámetro de cada pozo) fue considerado como positivo para actividad antagónica.

Resultados

Todas las cepas de lactobacilos evaluadas mostraron actividad antagónica frente a los microorganismos patógenos ensayados

con halos de inhibición mayores a 9 mm (tabla 1). El efecto antagónico se observó tanto en los cultivos de los lactobacilos, como en los sobrenadantes (fotografías 1 y 2).

De los seis lactobacilos estudiados, la cepa 66 fue capaz de inhibir el crecimiento de todos los patógenos ensayados con un promedio de halos de inhibición (A) de 10,4 mm por lo que fue considerada la cepa con el mayor efecto antagónico del grupo; seguida de las cepas 71 y 75 que presentaron valores de A iguales a 8,8 mm cada una, ya que inhibieron siete de los ocho patógenos. Por otro

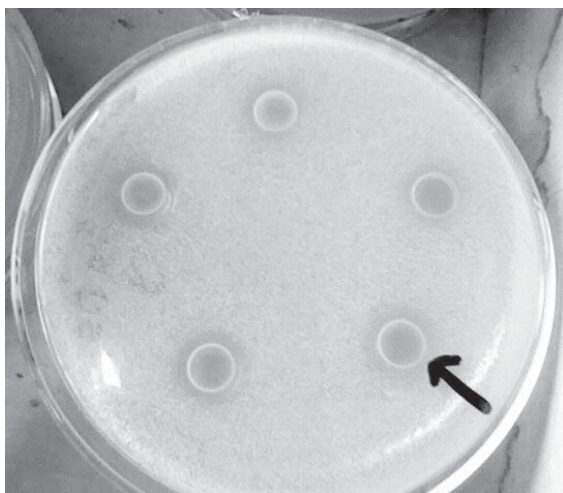
lado, en las cepas 120 y 128 se observaron valores de A de 7,3 mm en cada una, debido a que se observó antagonismo frente a seis de las ocho cepas patógenas. Por último, en la cepa 34 hubo inhibición solo en la mitad de los patógenos ensayados con un promedio (A) de 5,1 mm; por lo que fue considerada la cepa con la menor capacidad antagónica de todas las evaluadas en este estudio.

Todos los lactobacilos fueron capaces de inhibir tanto bacterias grampositivas como gramnegativas. Por lo que se puede deducir que no hubo diferencias en la activi-

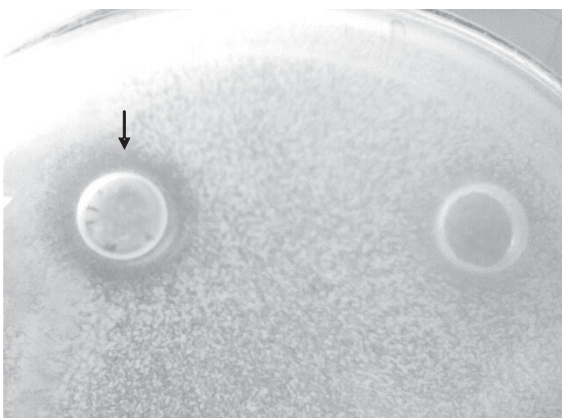
Tabla 1
Actividad antagónica preliminar sobre microorganismos patógenos de cepas de lactobacilos aisladas de heces de lactantes y leche materna

Cepas de lactobacilos	Halos de inhibición (mm)									A
	<i>Listeria monocitogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella Typhi</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Salmonella Enteritidis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>		
Cepa 34	C	0	10	0	0	20	0	12	13	5,1
	S	0	0	0	0	14	0	0	12	
Cepa 66	C	17	12	0	12	13	11	10	15	10,4
	S	11	12	10	11	11	10	0	12	
Cepa 71	C	12	11	10	11	16	11	0	13	8,8
	S	0	11	0	10	13	10	0	12	
Cepa 75	C	12	10	0	12	17	12	11	15	8,8
	S	0	0	0	0	16	11	11	14	
Cepa 120	C	11	10	0	0	13	12	10	13	7,3
	S	0	10	0	0	15	11	0	12	
Cepa 128	C	11	11	0	10	15	11	0	12	7,3
	S	0	10	0	0	14	10	0	12	
B		6,2	8,9	1,7	5,5	14,8	9,1	4,5	12,9	

SARM: *S. aureus* resistente a la meticilina. C= Cultivo en caldo MRS. S= Sobrenadante de cultivo en caldo MRS. A= Promedio de los halos de inhibición en cada cepa de lactobacilos evaluada. B= Promedio de los halos de inhibición en cada cepa patógena ensayada.



Fotografía 1. Ensayo de difusión en agar utilizando pozos para evaluar la actividad antagonista frente a microorganismos patógenos de cepas de *Lactobacillus*.



Fotografía 2. Halo de inhibición positivo para actividad antagonista (flecha).

dad antagonista con respecto al tipo de pared celular o grupo bacteriano de los microorganismos patógenos. Las bacterias patógenas más sensibles a la actividad antagonista de los lactobacilos fueron *Salmonella Thyphi* CVCM 49, *Shigella dysenteriae* LMA-ULA 03 y *Salmonella Typhimurium* LMA-ULA 36 (con promedios de halos de inhibición (B) de 14,8; 12,9 y 9,1 mm respectivamente). Por el

contrario, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina CVCM 764 fue la cepa patógena más resistente a la acción antagonista, ya que se observó inhibición solo frente a dos de las seis cepas de lactobacilos evaluadas, con un promedio de halos de inhibición (B) de 1,7 mm.

Discusión

Los probióticos deben ser capaces de competir selectivamente con otros microorganismos contribuyendo a su eliminación, control y regulación. Es ampliamente reconocida la capacidad de competencia de los lactobacilos frente a otras bacterias habitantes normales y eventuales del tracto gastrointestinal. Los efectos antagonistas de los probióticos contra microorganismos patógenos o alterantes se han atribuido principalmente a la producción de ácidos orgánicos. Sin embargo, son muchos los autores que han descrito la producción de compuestos antimicrobianos como las bacteriocinas (2, 6, 8, 9).

Los resultados obtenidos coinciden además, con los estudios de varios autores, quienes describen cepas de lactobacilos provenientes de pastizal de fincas lecheras, alimentos, tracto gastrointestinal de lactantes y leche materna humana, las cuales mostraron actividad inhibitoria o antagonista frente a patógenos como *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., entre otros, (2, 4, 10-12).

De manera similar, ha sido descrita la actividad antagonista de varias cepas de lactobacilos obtenidas de estomago de cordero y muestras de carne, frente a las bacterias patógenas antes mencionadas y a otras como *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, y *Yersinia* sp. (8, 9). Por otra parte, se ha reportado el efecto inhibitorio de cepas de lactobacilos y otras BAL, aisladas de heces de niños sanos, contra uropatógenos como *E. coli*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Citrobacter freundii* y *Proteus* spp. (3).

Aunque el efecto antagonico fue observado tanto frente al cultivo de los lactobacilos, como al sobrenadante, en líneas generales el mayor efecto siempre se observó al enfrentar a los patógenos con el cultivo de la bacteria; coincidiendo con un reporte previo (7). En el presente estudio, incluso en los casos donde la presencia del sobrenadante no alteró el crecimiento de los patógenos, se observó inhibición al enfrentar estos patógenos directamente con las cepas de lactobacilos, lo cual indica, que si bien la presencia de sustancias o metabolitos en el sobrenadante ejerce una actividad importante, el crecimiento directo de las bacterias produce un mayor antagonismo frente a los patógenos ensayados.

Las bacterias probióticas como los lactobacilos, además de modular el sistema inmunológico de sus hospedadores, pueden mantener la microbiota intestinal con predominio de las especies bacterianas beneficiosas e inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos por antagonismo directo, al establecer una competencia por el consumo de nutrientes y lugares de adhesión o receptores intestinales (3, 6, 9).

Conclusiones

Todas las cepas de lactobacilos evaluadas exhibieron actividad antagonica frente a microorganismos patógenos grampositivos y gramnegativos, donde las cepas 66, 71 (ambas *L. paracasei* ssp. *paracasei*) y 75 (*L. rhamnosus*) mostraron el mayor efecto inhibitorio. Por lo tanto, son consideradas bacterias potencialmente probióticas.

Agradecimientos

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

A las profesoras Cándida Díaz y Kiralba Sánchez, por la colaboración prestada en la

obtención de cepas patógenas de referencia y el uso del Laboratorio de Microbiología de Alimentos "Prof. Cándida Díaz" y el Laboratorio de Microbiología Clínica y Aplicada "Prof. Celina Araujo de Pérez", adscritos al Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, para la ejecución de este trabajo.

A la profesora Tulia Mariela Díaz del Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios "Prof. Luisa Vizcaya", Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, por la facilitación de cepas patógenas de referencia utilizadas en el ensayo.

Referencias bibliográficas

1. VITORIA M. Probióticos, prebióticos y simbióticos. *Pediatr Integral* 11(5): 425-433. 2007.
2. VANEGAS M., MARTÍNEZA., GONZÁLEZ L. *Alimentos Hoy* (15): 2-10. 2008.
3. SEOK LIM I., SEOK LEE H., YONG KIM W. *J Korean Med Sci* 24 (Suppl 1): S57-62. 2009.
4. ALVARADO C., DIAZ C. *RESPYN* 10(1). 2009.
5. RODRÍGUEZ J., JIMÉNEZ E., MERINO V., MALDONADO A., MARÍN M., FERNÁNDEZ L., MARTÍN R. *Acta Pediatr Esp* 66 (2): 77-82. 2008.
6. Salas E. Lactobacilos con potencial actividad probiótica a partir de queso fresco no pasteurizado elaborado en forma artesanal. (Para obtener el grado de Magister). Postgrado de Microbiología, Mención Microbiología en Alimentos. Universidad de los Andes, Mérida (Venezuela). 64 pp. 2004.
7. PAN X., CHEN F., WU T., TAN H., ZHAO, Z. *Food Control* 20: 598-602. 2009.
8. AL-ALLAF M., AL-RAWI A., AL-MOLA A. *Iraqi J of Vet Sci* 23 Suppl I: 115-117. 2009.

-
9. BILKOVA A., KINOVA SEPOVA H., BUKOVSKY M., BEZAKOVA L. **Veterinarni Medicina** 56(7): 319-324. 2011.
 10. VINDEROLA G., CAPELLINI B., VILLARREAL F., SUÁREZ V., QUIBERONI A., REINHEIMER J. **Food Sci Tech** 41: 1678-1688. 2008.
 11. OLIVARES M., DÍAZ-ROPERO M., MARTÍN R., RODRÍGUEZ J., XAUS J. **J Appl Microbiol** 101: 72-79. 2006.
 12. VANEGAS M., GONZÁLEZ L., ARÉVALO A. Evaluación del potencial probiótico de *Lactobacillus* aislados de heces de neonatos y leche materna. **XX Congreso Latinoamericano de Microbiología**. 50. Montevideo (Uruguay). 2010.